

# **VENTAJAS DEL MÉTODO DE LAO PARA LA APLICACIÓN ELECTROACUPUNTURAL EN RATAS. EXPERIENCIA EN CUBA.**

**AUTORES:** Dres. Beatriz Garrido Suárez \*, Fe Bosch Valdés \*\*, Gabino Garrido Garrido \*\*\*, Lic. Ivones Hernández Balmaseda \*\*\*\* y Dr. René Delgado Hernández \*\*\*\*\*

## **Clínica del Dolor Hospital Docente Clínico Quirúrgico 10 de Octubre**

\* Especialista de Primer Grado en Anestesiología y Reanimación. Aspirante a Doctora en Ciencias Médicas. HDCQ Díez de Octubre. E-mail: [beatriz.garrido@infomed.sld.cu](mailto:beatriz.garrido@infomed.sld.cu)

\*\* Especialista de Segundo Grado en Anestesiología y Reanimación. Doctor en Ciencias. Profesora Principal de Medicina Tradicional y Natural del Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana. Presidenta del Comité Académico de la Maestría en Medicina Bioenergética y Naturalista. Jefa de la Clínica del Dolor HDCQ 10 de Octubre.

\*\*\* Licenciado en Ciencias Farmacéuticas. Doctor en Ciencias Farmacéuticas. Investigador Auxiliar. Jefe del Laboratorio de Farmacología, Departamento de Investigaciones Biomédicas, Centro de Química Farmacéutica.

\*\*\*\* Licenciado en Ciencias Farmacéuticas. Aspirante a investigador. Laboratorio de Farmacología, Departamento de Investigaciones Biomédicas, Centro de Química Farmacéutica.

\*\*\*\*\* Licenciado en Educación en la Especialidad de Química y Licenciado en Bioquímica. Doctor en Ciencias Biológicas. Investigador Titular, Jefe del Departamento de Investigaciones Biomédicas e Investigador del Laboratorio de Farmacología del Centro de Química Farmacéutica.

## **RESUMEN**

La prueba de la formalina desencadena un dolor prolongado de moderada intensidad, que mimetiza el observado en humanos con dolor crónico. La electroacupuntura experimental es un proceder parámetro-dependiente, que produce efectos diferentes sobre los sistemas bioquímicos manipulados en condiciones fisiológicas o patológicas. Es influenciada por la analgesia inducida por estrés, entre otras limitaciones que causan una instrumentación difícil; por lo que el diseño de los modelos experimentales se convierte en una tarea compleja. **Objetivos:** Aplicar el método electroacupuntural de Lao en un modelo de dolor patológico inducido con formalina, así como examinar el efecto analgésico de la electroacupuntura en estas condiciones. **Método:** Utilizamos ratas Sprague Dawley divididas en dos grupos de 5 animales cada uno: grupo EA, el cual recibió estímulos de 2Hz y 2-3mA por 30 minutos, previo a la inyección intraplantar de formalina y el grupo control que recibió formalina solamente. **Resultados:** El animal consciente y no restringido se mostró cooperador al proceder. Los signos de estrés fueron mínimos al inicio. A los 20 minutos de estimulación se mostró quieto o dormido. La electroacupuntura a 2Hz aplicada bilateralmente en los puntos VB30, no provocó supresión significativa de la respuesta bifásica comparada con el grupo control. **Conclusiones:** Se sugiere que el método de Lao es muy funcional para utilizar en el laboratorio, afín a las condiciones clínicas de aplicación del proceder en humanos. La electroacupuntura sola no mostró efecto analgésico suficiente para reducir el tiempo de lamido en las fases I y II de la prueba de formalina.

**PALABRAS CLAVE:** modelo animal, dolor, nocicepción, electroacupuntura, formalina.

## **INTRODUCCIÓN**

Los modelos animales de dolor han permitido en las últimas décadas un salto en el conocimiento de la neurobiología del dolor y en el desarrollo de nuevos fármacos <sup>1-4</sup>, pero los sistemas biológicos no son exactos y hay múltiples factores que pueden determinar resultados contradictorios inherentes a la selección y al diseño del modelo, al desempeño en el laboratorio, al cuidado del animal y a la observación de las características de la especie <sup>1</sup>. Dificultades que se exacerban al aplicar un proceder como la electroacupuntura (EA) donde existe una variabilidad paramétrica para la liberación de mediadores, también para la acción sobre los sistemas bioquímicos manipulados, ya sea en condiciones fisiológicas o patológicas <sup>5-7</sup> moléculas que pueden desencadenar efectos fisiológicos contrapuestos en dependencia de su concentración, de sus acción al interactuar sobre diferentes subtipos de receptores de variadas localizaciones, la participación de sistemas periféricos, segmentarios y suprasegmentarios, unos inhibidores y otros facilitadores <sup>8-10</sup> marcada influencia de la analgesia inducida por estrés (SIA, por sus siglas en inglés) <sup>10-11</sup> dificultades con el grupo control adecuado para la técnica<sup>12-17</sup>, con la técnica en sí en el momento de la colocación de las agujas, la localización de los puntos correctamente y la tolerabilidad por el animal de las agujas, con un estímulo eléctrico por un período prolongado de 20 a 30 minutos, en ocasiones de varias exposiciones. Evidentemente, algo más engorroso que la administración de un fármaco por vía oral o intraperitoneal (ip) 30 o 20 minutos antes de aplicar una prueba. También existe la disyuntiva del momento en que se debe aplicar la EA, antes o después de la inducción del daño, según el modelo aplicado <sup>6,16</sup>.

Generalmente se utilizan ratas, pero la selección de la subespecie es importante, por ejemplo, las ratas Wistar por sus características conductuales son menos cooperadoras que las Sprague Dawley (SD), más dóciles por naturaleza; la edad y el peso también son considerables, pues las jóvenes, con un peso entre 250 y 350 gramos, poseen la piel suave, con menos panículo adiposo que facilita la colocación de las agujas. No está indicado ayuno el día anterior como en otros experimentos, se debe mantener el alimento y el agua a libre demanda, pues el proceder tiene efecto hipoglicemiante.<sup>4-17</sup>

Lixing Lao en su laboratorio en los años 2001 y 2004,<sup>6-7</sup> aplicó la EA en ratas SD conscientes y no restringidas con resultados favorables, en un modelo inflamatorio inducido con adyuvante completo de Freund (CFA), unilateralmente en la pata trasera; para estudiar los parámetros ideales de la EA en condiciones patológicas; **testando** la latencia de retirada de la pata (PWL) ante una fuente de calor, así como la expresión de proteína Fos en cuerno posterior.

La demostración de estos parámetros óptimos para la aplicación clínica, en condiciones que mimetizan el dolor crónico, irrumpe dialécticamente sobre muchos criterios pre-establecidos en la neurobiología de estas técnicas, pues la mayoría de los estudios anteriores informaron acerca del parámetro-dependencia de la analgesia electroacupuntural, se realizaron en animales no agredidos, que no presentaban sensibilización de sus nociceptores periféricos ni hiperexcitabilidad del sistema nervioso central<sup>18-21</sup>, que determinarían la alteración del procesamiento nociceptivo y que se expresarían clínicamente en los fenómenos de hiperalgesia o alodinea,<sup>19,22-23</sup> que observamos en nuestros pacientes. También los estudios se realizaron en animales restringidos e

influenciados por la SIA<sup>10-11</sup> o sedados, en condiciones que pudieron soportar intensidades de estímulo muy superiores, a las que puede tolerar un animal consciente y estas terapias se realizan en el humano conciente, por lo que la extrapolación de estos resultados en animales, a humanos con dolor patológico, de alta incidencia en nuestras clínicas<sup>24,25</sup>, están evidentemente más cerca de la verdad.

La prueba de la formalina es considerada por Dalal<sup>1</sup> y Melzack<sup>4</sup>, como un excelente modelo de dolor prolongado de moderada intensidad, que semeja al dolor clínico en humanos, cabalga sobre los modelos de dolor agudo y crónico, pues desencadenan una respuesta bifásica conductual que en un primer tiempo refleja un dolor nociceptivo en respuesta a la noxa química aguda y en un segundo tiempo refleja un dolor inflamatorio con la sensibilización espinal inducida por la agresión<sup>1,4,18</sup>, donde median estructuras espinales y supraespinales, mientras que en la prueba de retirada de la cola, por ejemplo, la organización de la respuesta es fundamentalmente espinal<sup>1,4</sup>.

El propósito de nuestra investigación, fue analizar críticamente el método electroacupuntural de Lao, en un modelo de dolor inflamatorio inducido con formalina en ratas, con la finalidad de estudiar el efecto de la EA sobre el tiempo de lamido en ambas fases de la prueba.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

**ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y MODELO DE DOLOR:** Se utilizaron ratas jóvenes SD entre 250-350g de peso que se mantuvieron bajo condiciones de  $22 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  de temperatura y humedad relativa de 40-60%, con ciclos alternos de luz-oscuridad de 7:00am a 7:00 p.m., el agua y los alimentos se mantienen a libre demanda.<sup>4-17</sup>

Se administró 50  $\mu\text{l}$  de Formalina al 1 % por vía s/c en la superficie plantar de la pata trasera derecha de la rata usando una aguja calibre 27-G. Inmediatamente se colocó en un cilindro transparente de cristal de 20x30 cm. sobre una rejilla.<sup>4,11,26</sup>

El tiempo de lamedura se midió con cronómetro manual por el experimentador:

Consideramos el tiempo de 0-5 min. (Fase 1). Una latencia de 10 min.

De 15 a 30 min. (Fase 2) Foto 1.



**Foto 1: Observación de la respuesta conductual bifásica en la prueba de formalina  
Laboratorio Centro de Química Farmacéutica**

Los animales fueron sacrificados bajo anestesia general al concluir el experimento.

## **DISEÑO EXPERIMENTAL**

Las ratas fueron divididas en dos grupos de 5 ratas (n = 5): grupo 1 (EA), el cual recibió el estímulo de 2Hz y 2-3mA por 30 minutos, previo a la inyección intraplantar (ipl.) de formalina que se administró inmediatamente al concluir el proceder y el grupo 2 (control) que recibió formalina solamente, según la técnica descrita.

## **APLICACIÓN DE LA ELECTROACUPUNTURA (EA)**

La EA se condujo según el método aplicado por Lixing Lao.<sup>6-7</sup> Se seleccionó el punto equivalente a VB30 en humanos, según la teoría de los meridianos de la Medicina Tradicional China. En el hombre se describe localizado en la unión del tercio lateral y medial, tras dividir en tres partes iguales la distancia entre el trocánter mayor y el hiato sacro, por encima del nervio ciático, las referencias anatómicas equivalentes fueron usadas para localizar el punto en las patas traseras de la rata <sup>6-7</sup>. Los animales fueron gentilmente entrenados por 30 minutos/día durante 3 días y habituados al tratamiento con EA antes del experimento <sup>7</sup> previo asepsia y antisepsia de la piel con alcohol, se colocan las agujas calibre 32 G y 0,5 pulgadas de longitud, bilateralmente en los puntos VB30, con electrodos soldados en sus extremos distales, estabilizados con cinta adhesiva, los cables se fijaron en la espalda para evitar que fueran mordidos por el animal, lo que demora unos 20 seg. y causa poco estrés en él, posteriormente se coloca en una caja transparente plástica invertida de 5x8x11cm, no restringida, anestesiada ni sedada <sup>6-7</sup>. Los parámetros utilizados fueron una frecuencia de estimulación de 2 Hz y se procedió a aumentar lentamente la intensidad del estímulo a niveles soportables por el animal

conciente injuriado, entre 2 a 3 mA, suficiente para producir contracción rítmica muscular de las patas traseras <sup>6-7,15-16</sup> para estos fines trabajamos con un Electroestimulador Tipo Gran Muralla, seleccionamos la onda 1 (continua analgésica, duración de los pulsos de 0,5 m/s). Foto 2



**Foto 2: Aplicación de la electroacupuntura (EA) según método de Lao en ratas  
Laboratorio Centro de Química Farmacéutica**

## RESULTADOS

Los animales se mostraron tranquilos durante el proceder y manifestaron el mismo patrón de conducta temporal:

0-5 minutos: Reconocimiento del lugar, tendencia al lamido de la aguja y la cinta adhesiva.

5-10 minutos: Acicalado, reconocimiento.

10-15 minutos: Acicalado con tendencia a mayor estabilización en el lugar.

15-20 minutos: Echada sobre sus patas, quieta, sedada.

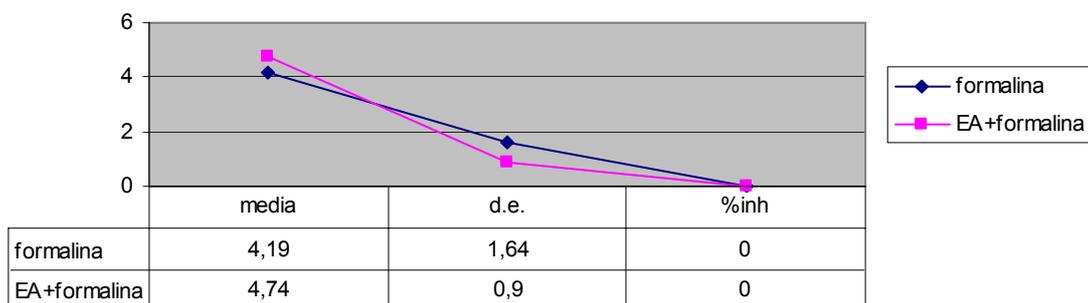
20-30 minutos: Quieta o dormida.

La EA en este modelo de dolor patológico con formalina no mostró un efecto significativo sobre el tiempo de lamido de la rata, en la fase I, tampoco en la fase II, que expresa los cambios en el procesamiento nociceptivo espinal. Para la fase I el control tuvo una media de 1,76 minutos y para el grupo con EA fue de 1,66 minutos. Para la fase II la media del control fue de 4,19 minutos y para el grupo con EA previa de 4,74 minutos, en ambas fases el porcentaje de inhibición respecto al control fue de valor 0. (Figuras 1 y 2)

Tiempo de lamido inducido por formalina (1%/50µl) en ratas de 0-5 minutos (FASE I) Efecto de la EA (Figura 1)



Tiempo de lamido inducido por formalina (1%/50μl) en ratas de 15-30min (FASE II) Efecto de la EA (Figura 2)



## **DISCUSIÓN**

Estudios previos con el animal no agredido y restringido, con marcada influencia de la SIA, se utilizaron para estudiar la EA; pero la relevancia clínica de estos fue limitada<sup>27-28</sup>. Este modelo resolvió las dificultades en gran medida, al concebirse bajo condiciones patológicas y al aplicar la EA con el animal consciente, como a los humanos y sin restricción. La liberación de neurotransmisores secundaria a la restricción aguda está anulada, por lo que puede asumirse que los efectos analgésicos presentados son en gran medida consecuencia del estímulo electroacupuntural. El animal se observó tranquilo, sometido a un grado menor de estrés por el proceder<sup>6-7</sup>.

En nuestro experimento, la EA no mostró un efecto significativo al reducir la respuesta bifásica a la prueba de la formalina; lo que es congruente con otros que aplican la EA a 2Hz en ratas agredidas con formalina, bilateralmente pero en los puntos E36 en ambas patas traseras,<sup>4</sup> un acupunto también de uso frecuente en el tratamiento del dolor y en estudios experimentales, sin embargo, en el mismo estudio este proceder fue capaz de incrementar la latencia de retirada de la cola.<sup>4</sup> Los mismos autores establecieron con anterioridad que la DE<sub>50</sub> de opiodes (dosis efectiva para producir la reducción del dolor en 50 % del grupo control) es significativamente menor en esta prueba de dolor nociceptivo, que en la prueba de formalina donde debió suprimir la sensibilización central.<sup>29</sup>

La EA actúa a través de complejos mecanismos neurofisiológicos<sup>27-31</sup>, entre ellos: Estimula los sistemas descendentes inhibitorios que frenan la transmisión de los impulsos nociceptivos a escala espinal y supraespinal<sup>4,12-13,16,32</sup>. Está bien

documentado que la EA a baja frecuencia (2Hz) incrementa la liberación de encefalinas y beta endorfina que activan receptores *delta* y *mu* en el SNC <sup>4,27-28</sup>. El tercer miembro de opioides que participa es la endomorfina-1, descrito más recientemente tras estudiar la reducción de la analgesia electroacupuntural de baja frecuencia con antisuero de endomorfina-1 <sup>4</sup>. La EA a alta frecuencia (100 Hz) induce incremento de dinorfina que actúa en receptores *kappa* en el cuerno posterior <sup>4,31</sup>. Los opioides intratecales pueden suprimir la sensibilización central inducida por formalina <sup>32,33</sup>. Estos autores, postularon que el incremento de péptidos opioides endógenos que produce la EA, no es suficiente para suprimir la respuesta nociceptiva conductual inducida por la formalina, pero es capaz de producir antinocicepción en un modelo de dolor agudo, no patológico como la prueba de retirada de la cola <sup>4,33</sup>. En cambio, al combinar la EA a 2Hz con la administración intratecal de endomorfina-1, se observó una desviación a la izquierda de la curva dosis respuesta en comparación con la curva para la endomorfina-1 sola, por lo que la EA incrementa los efectos antinociceptivos de la endomorfina-1 <sup>4</sup>. La combinación clínica de drogas con la EA en humanos puede aumentar la analgesia y disminuir los efectos indeseables al permitir reducir las dosis utilizadas, por estos efectos sinérgicos y aditivos, lo que puede ser de elección en pacientes ancianos y oncológicos.

En la literatura se encuentran pocos estudios que utilizaran la prueba de la formalina con estos fines<sup>4,11</sup>. Observamos con mayor frecuencia el modelo de artritis con CFA, los modelos agudos (placa caliente y presión de la cola) superpuestos a este para objetivizar las alteraciones del umbral nociceptivo.<sup>6-7,15</sup> La inflamación inducida con carragenina y los modelos de dolor neuropático asociados a modelos agudos térmicos y mecánicos<sup>16,33-36</sup>. De este sencillo

estudio de concepto, concluimos que el método de Lao es muy funcional para utilizar en el laboratorio y más cercano a las condiciones clínicas de aplicación del proceder en humanos. Que la EA de 2Hz aplicada en el punto VB30 bilateralmente con el animal consciente y no restringido tampoco mostró efecto analgésico para reducir el tiempo de lamido en las fases I y II de la prueba de formalina; similar a lo observado por otros autores al aplicarla bilateralmente pero en el punto E36 con el animal en otras condiciones.

Se deben promover estudios en este campo, con modelos diseñados con mayor objetividad y hacia la búsqueda de los efectos de la EA sobre las alteraciones del procesamiento nociceptivo, que aparecen en el dolor patológico.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

1. Ortega A, Roca A, Micó JA. Modelos animales de dolor. Una visión crítica. *Rev.Soc.Esp. Dolor* 2002; 9:447-453
2. Lima Mompo G, Aldana L, Casanova PI. Inducción y medición del dolor experimental. *Rev Cub Med Milit.*2003; 32(1): 12-23
3. Zelenka M. Intraneural injection of interleukin-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  into rat sciatic nerve at physiological doses induces signs of neuropathic pain. *Pain* 2005; 116:257-263
4. Hao S, Takahata O, Iwasaki H. Electroacupuncture potentiates the antinociceptive effect of intrathecal endomorphin-1 in the rat formalin test. *Neuroscience Letters* 2000; 287:9-12
5. Jang MH, Shiu EH, Koo GS, Lee ChY, Kim EH, Kim ChJ. Acupuncture decreases nitric oxide synthase expression in Periaqueductal gray area of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Neuroscience Letters* 2003; 337:155-158
6. Lao L, Zhang RX, Zhang G, Wang X, Berman BM, Ren K. A parametric study of Electroacupuncture on persistent hyperalgesia and Fos protein expression in rats. *Brain Research* 2004; 1020:18-29
7. Lao L, Zhang G, Wei F, Berman B, Ren K. Effect of electroacupuncture on hyperalgesia and Fos protein expression in rats with persistent inflammation- a new animal model. *Clin. Acupunct.Orient.Med* 2000; 1:112-113

8. Kim HW, Kwon YB, Han HJ, Yang IS, Beitz AJ, Lee JH. Antinociceptive mechanisms associated with diluted bee venom acupuncture (apupuncture) in the rat formalin test: involved of descending adrenergic and serotonergic pathways. *Pharmacological research* 2005; 51:183-188
9. Sakurada Ch. Antinociceptive effect of spinally injected L-NAME on the acute nociceptive response induced by low concentrations of formalin. *Neurochemistry International* 2001; 28(5):417-423
10. Yang Ch. Effect of electroacupuncture on response to immobilization stress. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2002; 72:847-855
11. Aloisi AM et al. Behavioural and hormonal effects of restraint stress and formalin test in male and female rats. *Brain Research Bulletin* 1998; 47(1):57-62
12. Young K, Myung K, Chon A. Effect of High or Low frequency EA of the cellular activity of catecholaminergic neurons in the Brain System. *Acup.* 2000; 25:27-36.
13. Choi BT, Lee JH, Wan J, Han S. Involvement of ionotropic glutamate receptors in low frequency electroacupuncture analgesia in rats. *Neuroscience Letters* 2005;377:185-188
14. Huang Ch, Long H, Shi YS, Han JS, Wan Y. Ketamine enhances the efficacy and delays the development of tolerance to electroacupuncture induced antinociception in rats. *Neuroscience Letters* 2005;375:138-142
15. Zang RX, Lao L, Wang KR, Bernir BB. Electroacupuncture combined with indomethacin enhances antihyperalgesia in inflammatory rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2004; 78:793-797

16. Zhang SP, Zhang JS, Ken KL, Zhang HQ. Non-opioid-dependent anti-inflammatory effects of low frequency electroacupuncture. *Brain Research Bulletin* 2004;62:327-334
17. Zhang RX. Involvement of opioid receptors in electroacupuncture produced anti-hyperalgesia in rats with peripheral inflammation. *Brain Research* 2004;1020:12-17
18. Kidd BL, Urban LA. Mecanismos del dolor inflamatorio. *British Journal of Anaesthesia* 2001;87(1): 3-11
19. Woolf, CJ., Salter, MW. Plasticidad neuronal. Amplificación de la sensación de dolor. *Science* 2000; 88:1765-1768.
20. Ferreira J, Triches KM, Medeiros R, Calixto JB. Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase c activation in mice. *Pain* 2005;117:171-181
21. Ventura R. Peripheral involvement of the nitric oxide-cGMP pathway in the indomethacin induced antinociception in rat. *European J Pharmac* 2004;503:43-48
22. Tao F. Differential roles of neuronal and Endothelial nitric oxide synthases during Carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia. *Neuroscience* 2004;128:421-430
23. Gao X, Kee H, Chung JM, Chung K. Enhancement of NMDA receptor phosphorylation of the spinal dorsal horn and nucleus gracilis neurons in neuropathic rats. *Pain* 2005;116:62-72
24. Sjölund BH. Acupuncture or acupuncture. *Pain* 2005;114:311-312
25. Bosch F. Pain Clinic: The impact of Traditional and Natural Medicine [en línea] 2003 [consultado 1 de septiembre 2003]; V(1):URL disponible en:

- <http://www.Medicc.org/medicc%20review/V/1/cmr.html>.
26. Nishiyama T. Interaction between intrathecal morphine and glutamate receptor antagonists in formalin test. *Eur. J.Pharmacol.*2000;395:203-210
27. Han JS. Acupuncture: neuropeptide release produced by electrical stimulation of different frequencies. *Trends Neurosci.*2003;26:17-22
28. Han Z. Endomorphin-1 mediates 2Hz but not 100Hz electroacupuncture analgesia in the rat. *Neurosci.Lett.*1999,274:75-78
29. Hao S, Sakurai K Su; Suzuki a, Takahata O and Iwasaki H. Antinociceptive effects of intrathecally administered endomorphin-1 on the thermal mechanical and inflammatory stimuli in the rat. *Anesthesiology* 1999;91 A777
30. Xing Ma S, Ma J, Moise G, Yan Li X. Resposes of neuronal nitric oxide synthase expresión in the brainstem to electroacupuncture Zusanli (ST 36) in rats. *Brain Research* 2005;1037:70-77
31. Wu LZ et al. Suppression of morphine withdrawal by electroacupuncture in rats: dynorphin and k opioid receptor implicated. *Brain Research* 1999;851:290-296
32. Hurley RW, Hammond DL. The analgesic effects of supraspinal mu and delta opioid receptor agonists are potentiated during persistent inflammation. *J Neurosci.* 2000; 20:1249-1259
33. Zhang YQ et al. Excitatory amino acid receptor antagonists and electroacupuncture synergetically inhibit carregeenan-induced behavioral hyperalgesia and spinal fos expression in rats. *Pain* 2002;99:525-535

34. Ren K. The intrathecal administration of excitatory amino acid receptor antagonists selectively attenuated carrageenan-induced behavioral hyperalgesia in rats. *Eur. J.Pharmacol.*1992;219:235-243
35. Hwang BG, Min B, Kim JH, Na HS, Park DS. Effects of Electroacupuncture on the mechanical allodynia in the rat model neuropathic pain. *Neuroscience Letters* 2002;320:49-52
36. Dong Z. Changes of expression of glial cell line-derived neurotrophic factor and its receptor in dorsal roots ganglions and spinal dorsal horn during EA treatment in neuropathic pain rats. *Res Letters* 2005; 376:143-148.