

Influência do anabolizante decanoato de nandrolona sobre a viabilidade de células satélites musculares em processo de diferenciação

Effects of nandrolone decanoate on the viability of muscle satellite cells during the differentiation process

Influencia del anabolizante decanoato de nandrolona en la viabilidad de las células satélites musculares en el proceso de diferenciación

Beatriz Guimaraes Ribeiro¹, Kristianne Porta Santos Fernandes^{1,2}, Mikaele Tavares Silva³, Simone Oliveira Sierra¹, Sandra Kalil Bussadori^{1,2}, Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari^{1,2}

RESUMO | Os anabolizantes são utilizados, especialmente por atletas, com o intuito de aumento da massa muscular e melhora do desempenho. Este estudo objetivou avaliar o efeito do anabolizante Deca-Durabolin® sobre a viabilidade (proliferação) de células satélites musculares C2C12 induzidas à diferenciação, mimetizando o processo de reparo após lesão. As células foram cultivadas em Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e submetidas à diferenciação pela adição de 2% de soro de cavalo e concomitantemente incubadas com o anabolizante nas concentrações de 5, 10, 25 e 50 µM. Os grupos que não receberam o anabolizante nem o veículo serviram como controle. A viabilidade (proliferação) foi avaliada após um, três e cinco dias, utilizando o método de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio). Foram realizados três experimentos independentes, em cada condição citada, e os resultados submetidos à análise estatística com nível de significância de $p \leq 0,05\%$ (ANOVA/Dunnet). Os resultados permitiram verificar que não houve diferença na viabilidade entre células musculares tratadas com o anabolizante e induzidas à diferenciação e as culturas controles que somente foram induzidas à diferenciação, em todos os parâmetros avaliados. Em conclusão, o anabolizante

decanoato de nandrolona, nas concentrações avaliadas, não foi capaz de alterar a viabilidade de células musculares C2C12 durante o processo de diferenciação.

Descritores | Anabolizantes; Atletas; Células Musculares; Nandrolona; Proliferação de Células; Diferenciação Celular.

ABSTRACT | Studies indicate that the anabolic nandrolone decanoate (Deca-Durabolin®) can modulate cell cycle regulation, but little is known about its effects on muscle cells. Anabolic steroids are used, especially by athletes, to improve muscle mass and performance in the practice of exercises. The aim of this study was to evaluate the effect of the anabolic Deca-Durabolin® on the proliferation of skeletal muscle precursor cells C2C12. Cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), being supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and subjected to differentiation by the addition of 2% horse serum. They were incubated with anabolic at concentrations of 5, 10, 25 and 50 µM. The groups that received no anabolic or vehicle served as controls. The viability (proliferation) was evaluated by the MTT method (3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) after one, three and five days of incubation. Three independent experiments were performed in each of the mentioned

Estudo desenvolvido no Laboratório de Pesquisa de Biologia Celular e Molecular da Universidade Nove de Julho (UNINOVE) – São Paulo (SP), Brasil.

¹Programa de Mestrado e Doutorado em Ciências da Reabilitação pela UNINOVE – São Paulo (SP), Brasil.

²Programa de Mestrado e Doutorado em Biofotônica aplicada às Ciências da Saúde da UNINOVE – São Paulo (SP), Brasil.

³Curso de Fisioterapia da UNINOVE – São Paulo (SP), Brasil.

Endereço para correspondência: Raquel Agnelli Mesquita Ferrari – Programa de Mestrado e Doutorado em Ciências da Reabilitação – UNINOVE – Rua Vergueiro, 249 – CEP: 01504-001 – São Paulo (SP), Brasil – E-mail: raquel.mesquita@gmail.com

Apresentação: dez. 2012 – Aceito para publicação: fev. 2014 – Fonte de financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2011/18592-6) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (473710/2011-0; 303662/2012-3) – Conflito de interesses: nada a declarar.

conditions, and the results were submitted to statistical analysis with significance level of $p \leq 0.05$ (ANOVA/Dunnett). Results showed no difference in viability between muscle cells treated with anabolic and the control cultures in all parameters. In conclusion, nandrolone, at the used concentrations, was not able to alter the viability of muscle C2C12 satellite cells.

Keywords | Anabolic; Athletes; Muscle Cells; Nandrolone; Cell Proliferation; Cell Differentiation.

RESUMEN | Se utilizan los anabolizantes, en particular por atletas con el objetivo de aumentar la masa muscular y mejoría del desempeño. Este estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto del anabolizante Deca- Durabolin® sobre la viabilidad (proliferación) de las células satélites musculares C2C12 inducidas a la diferenciación, imitando el proceso de reparación tras una lesión. Las células fueron cultivadas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y sometidas a diferenciación mediante la adición de 2% de

suero de caballo y, simultáneamente, incubadas con el anabolizante en las concentraciones de 5 , 10 , 25 y 50 μM . En los grupos que no recibieron el anabolizante, ni el vehículo sirvió como control. La viabilidad (proliferación) se evaluó después de uno, tres y cinco días, utilizando el método de MTT (3 - [4,5 - dimetiltriazol - 2 - il] - 2,5 difeniltetrazolio) . Se realizaron tres experimentos independientes, en cada condición citada, y los resultados sometidos al análisis estadístico con nivel de significación de $p \leq 0,05$ % (ANOVA/Dunnett). Los resultados permitieron verificar que no hubo diferencia en la viabilidad entre células musculares tratadas con anabolizante e inducidas a diferenciación y culturas de controles que sólo fueron inducidas a diferenciación en todos los parámetros evaluados. En conclusión, el anabolizante decanoato de nandrolona, en las concentraciones evaluadas, no fue capaz de alterar la viabilidad de células musculares C2C12 durante el proceso de diferenciación.

Palabras clave | Anabolizantes; Atletas; Células Musculares; Nandrolona; Proliferación de la Célula; Diferenciación Celular.

INTRODUÇÃO

O sistema endócrino influencia o crescimento e o desenvolvimento muscular ao longo da vida e o excesso ou a deficiência hormonal podem afetar a estrutura e a função muscular¹. Diversos estudos realizados em animais demonstram que os andrógenos apresentam efeitos positivos sobre o aumento da massa e força muscular através dos Receptores Androgênicos (RA)² e na determinação da massa corporal magra³.

Dessa forma, os Esteroides Anabólicos Androgênicos (EAA) são utilizados em grandes quantidades por atletas das mais diversas modalidades desportivas, com o intuito de melhorar a massa muscular e o desempenho⁴. O uso prolongado⁵ de tal substância muitas vezes leva a consequências negativas à saúde, como alteração na reprodução, na função endócrina hepática e também sobre as características músculo-esqueléticas⁴.

O decanoato de nandrolona, um derivado da testosterona, está entre os EAA mais consumidos, de acordo com o *National Institute on Drug Abuse* (NIDA), devido ao seu moderado potencial androgênico associado às boas propriedades anabólicas. A nandrolona sofre a ação da enzima 5 α -redutase e produz um metabólito que tem baixa afinidade pelo receptor, fazendo a própria nandrolona interagir com os receptores para esteroides, produzindo respostas anabólicas relativamente maiores⁶. Alguns estudos apontam que o decanoato de nandrolona pode modular a regulação do ciclo celular e, assim, alterar a

massa muscular, mas os processos intramusculares ainda não estão bem esclarecidos^{7,8}.

O músculo esquelético possui a capacidade de responder a diversos estímulos, levando a um conjunto de adaptações metabólicas e morfológicas. Essa excelente capacidade de regeneração muscular é atribuída à presença de células precursoras miogênicas chamadas de Células Satélites (CS) que são afetadas por vários elementos, como estimulação mecânica, envelhecimento e também os fatores endócrinos⁹.

Sabe-se que as CS, numa situação de lesão, são ativadas e passam a ser denominadas mioblastos. Estes se proliferam, diferenciam e se fundem, gerando miotubos que se unem a uma fibra preexistente ou formam uma nova fibra muscular funcional¹⁰⁻¹². Para isso, um conjunto complexo de respostas celulares é ativado, resultando em uma regeneração adequada do tecido lesionado e em um músculo bem innervado, vascularizado e com aparelho contrátil íntegro¹³. Portanto, o processo de reparo muscular já está bem descrito na literatura, mas a sua associação ao uso de anabolizante ainda não está muito clara.

Assim, em virtude da alta incidência de lesões em atletas, é imprescindível o conhecimento dos efeitos e consequências da utilização de anabolizantes durante o processo de reparo, já que seu uso é frequente para a melhora do desempenho esportivo. Dessa forma, este estudo avaliou, *in vitro*, o efeito do anabolizante Decanoato de Nandrolona (Deca-Durabolin®), em diferentes concentrações, sobre a viabilidade de células satélites musculares em processo de diferenciação.

METODOLOGIA

Cultura celular

A linhagem celular C2C12 utilizada no presente trabalho é um subclone da linhagem celular de mioblastos C2, células derivadas de CS de camundongos adultos, e apresenta a maioria das características de células musculares normais¹⁴⁻¹⁶. As células foram cultivadas no Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 1% antibiótico solução antimicótica (Cultilab) e mantidas em estufa 37°C, numa atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. O monitoramento do crescimento celular foi feito a cada 24 horas e, quando a monocamada celular se tornava subconfluente para a perpetuação da linhagem celular, foi realizado o subcultivo com lavagem tampão PBS1X (NaCl 140 mM; KCl 2,5 mM; Na₂HPO₄ 8 mM; KH₂PO 1,4 mM; pH 7,4) e solução de tripsina. As células foram centrifugadas a 1.200 rpm e posteriormente ressuspensas em 1 mL de DMEM. A viabilidade das células foi avaliada por contagem com corante vital azul de Trypan (0,4%) e foram utilizadas nos experimentos as células com viabilidade maior que 95%.

Para indução da diferenciação, as células foram mantidas em DMEM contendo 2% de soro de cavalo¹⁷.

Ensaio de viabilidade (proliferação) celular (MTT)

A viabilidade (proliferação) celular foi avaliada após um, três e cinco dias da incubação com o decanoato de nandrolona Deca-Durabolin® (Organon, Brasil) nas concentrações finais de 5, 10, 25 e 50 µM (Organon, Brasil) ou do veículo da droga (1,5:1 – álcool benzílico/óleo de amendoim), adicionado em diferentes quantidades de acordo com as concentrações utilizadas do anabolizante (veículo 5, 10, 25 e 50 µM, respectivamente). Concomitantemente ao tratamento com o anabolizante, foi adicionado 2% de soro de cavalo (Invitrogen, Brasil) ao meio de cultura para indução de diferenciação das células musculares¹⁷.

A metodologia utilizada para avaliação da viabilidade celular se baseia na habilidade da enzima mitocondrial desidrogenase, encontrada somente em células viáveis, em clivar os anéis de tetrazólio do MTT (3-[4,5-dimetilthiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio)^{18,19}, formando cristais azuis-escuros de formazana, os quais são impermeáveis às membranas celulares, ficando então retidos no interior das células viáveis. A posterior lise celular

faz com que estes sais de formazana sejam liberados. O número de células viáveis é diretamente proporcional ao nível de cristais de azul de formazana formados.

Foram utilizadas para este ensaio 1x10³ células/poço adicionadas a placas de cultura de fundo chato de 96 poços, estéreis (Costar) e incubadas a 37°C e 5% CO₂ durante os diferentes períodos de incubação avaliados. Ao término do período de incubação, foi feita a lavagem dos poços com PBS1X (NaCl 140 mM; KCl 2,5 mM; Na₂HPO₄ 8 mM; KH₂PO 1,4 mM; pH 7,4), para remoção das células mortas, adicionado o MTT (0,5 µg/mL) (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, USA) e realizada a incubação das células por 4 horas a 37°C e 5%CO₂. Em seguida, foi adicionado isopropanol para solubilizar os cristais formados. Por fim, foi realizada a leitura da absorbância a 620 nm com o auxílio de um leitor de placas (*Anthos 2020*, Anthos Labtec Instruments, Wals, Áustria). Todos os experimentos foram repetidos três vezes, de forma independente, e cada amostra foi analisada em quadruplicata.

Análise estatística

As comparações entre os grupos foram feitas utilizando a análise de variância (ANOVA). O teste de Dunnett foi utilizado para determinar diferenças significativas entre os grupos experimentais e o grupo controle. Valores de p≤0,05 foram considerados estatisticamente significantes. Os dados foram analisados por meio do programa *GraphPad Prism 4.0* (*GraphPad Software*, San Diego, CA, EUA).

RESULTADOS

Os resultados permitiram verificar que não houve diferença significativa na viabilidade e proliferação celular, avaliada pelo método MTT, entre as células musculares tratadas com o anabolizante e as células controle (Figura 1) em todos os períodos avaliados. Os resultados para o veículo foram semelhantes ao controle (dados não mostrados).

Os resultados também evidenciaram que houve um aumento na viabilidade (proliferação) celular após três e cinco dias, quando comparada ao período de um dia, e que não houve aumento na viabilidade (proliferação) entre os grupos cinco e três dias, confirmando a diferenciação celular nesse período (Figura 1).

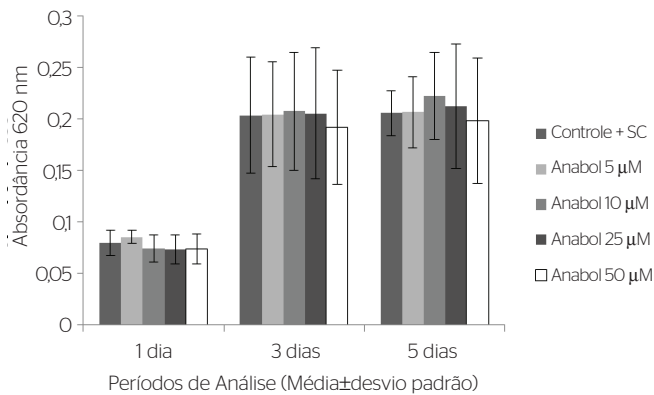


Figura 1. Avaliação *in vitro* da viabilidade (proliferação) celular das células musculares satélites tratadas com o anabolizante decanoato de nandrolona em diferentes concentrações e submetidas à indução do processo de diferenciação

DISCUSSÃO

Estudos *in vivo* demonstram que os efeitos do decanoato de nandrolona foram dependentes da musculatura avaliada, tempo de tratamento, dose e associação ou não com exercícios, sendo todos capazes de promover o aumento da massa muscular^{8,20-22}, alteração do ciclo celular⁷, densidade mineral óssea²³, crescimento ósseo²⁴, sendo que os RA têm grande influência nestes efeitos^{8,25}, questionando se há interferência do decanoato de nandrolona na viabilidade (proliferação) das células musculares e reparo muscular.

Em resposta à EAA, há um aumento de cálcio (Ca^{2+}) intracelular que ocorre em uma diversidade de tipos celulares, incluindo osteoblastos, plaquetas, células musculares, miócitos cardíacos e neurônios. Nas células cardíacas, por exemplo, a testosterona promove a hipertrofia cardíaca; já nos neurônios, dependendo da concentração, a testosterona pode causar apoptose neuronal²⁶.

Kamanga-Sollo *et al.*²⁷ estudaram a cultura de Células Satélites Bovinas (CSB) tratadas com andrógenos e observaram que o tratamento das culturas de CSB aumentou a expressão de mRNA de IGF-I e a proliferação, estabelecendo que os esteroides têm efeitos anabólicos diretos. Sculthorp *et al.*²⁸ investigaram a expressão de IGF-1 e mRNA IGF-1 e verificaram que a testosterona causou um aumento concomitante no IGF-1 mRNA, sustentando o IGF-1 como um mediador central nas vias

celulares associadas à hipertrofia muscular, o que mostra uma relação dos androgênios com crescimento e diferenciação muscular. Contudo, nos presentes achados, o decanoato de nandrolona não alterou a proliferação de células musculares em processo de diferenciação.

Diel *et al.*¹ evidenciaram que os mecanismos fundamentais de diferenciação são modulados pelos andrógenos e que eles estimulam a proliferação de células C2C12, aceleram o processo de diferenciação para miotubos e estimulam a expressão da miosstatina em células não diferenciadas e diferenciadas. No entanto, eles utilizaram indução da diferenciação com 3% de soro de cavalo e outro tipo de anabolizante, o dihidrotestosterona (DHT), avaliando a atividade de CK e a proliferação após um, três e 6 dias, o que difere do presente estudo e dificulta a comparação dos resultados.

Nogueira *et al.*²⁹ avaliaram o efeito do decanoato de nandrolona sobre osteoblastos após irradiação com laser de baixa potência e evidenciaram uma redução na viabilidade (proliferação) nas concentrações de 10, 25 e 50 µM e aumento na adesão após 60 minutos nas concentrações de 5, 10 e 25 µM; entretanto, o efeito combinado dessas terapias e o tipo celular diferentes não permite a comparação direta com os achados deste estudo, mas evidenciam o papel de regulação desse esteroide sobre a proliferação celular.

CONCLUSÃO

O anabolizante esteroide decanoato de nandrolona (Deca-Durabolin®), nas concentrações utilizadas, não foi capaz de alterar a viabilidade das células musculares durante o processo de diferenciação *in vitro*. Novos estudos são necessários para o melhor entendimento de outros possíveis efeitos do anabolizante esteroide decanoato de nandrolona sobre essas células como, por exemplo, na regulação de fatores regulatórios miogênicos envolvidos no processo de proliferação e diferenciação. Estes conhecimentos poderão auxiliar no entendimento de como anabolizantes podem influenciar o processo de reparo muscular, especialmente no que se refere a indivíduos que fazem uso desse tipo de substância.

REFERÊNCIAS

1. Diel P, Baadners D, Schlupmann K, Velders M, Schwarz JP. C2C12 myoblastoma cell differentiation and proliferation is stimulated by androgens and associated with a modulation of myostatin and Pax7 expression. *J Mol Endocrinol*. 2008;40(5):231-41.
2. Chen Y, Zajac D, MacLean HE. Androgen regulation of satellite cell function. *J Endocrinol*. 2005;186(1):21-31.
3. Vlahopoulos S, Zimmer WE, Jenster G, Belaguli NS, Balk SP, Brinkmann AO *et al*. Recruitment of the androgen receptor via serum response factor facilitates expression of a myogenic gene. *J Biol Chem*. 2005;280(9):7786-92.
4. D'Ascenzo S, Millimaggi D, Di Massimo C, Saccani-Jotti G, Botre F, Carta G *et al*. Detrimental effects of anabolic steroids on human endothelial cells. *Toxicol Lett*. 2007;169(2):129-36.
5. Marqueti RC, Parizotto NA, Chriguer RS, Perez SEA, Selistre-de-Araujo HS. Androgenic-anabolic steroids associated with mechanical loading inhibit matrix metalloproteinase activity and affect the remodeling of the achilles tendon in rats. *Am J Sports Med*. 2006;34(8):1274-80.
6. Silva PRP, Danielski R, Czepielewski MA. Esteróides anabolizantes no esporte. *Rev Bras Med Esporte*. 2002;8(6):235-43.
7. McClung JM, Mehl KA, Thompson RW, Lowe LL, Carson JA. Nandrolone decanoate modulates cell cycle regulation in functionally overloaded rat soleus muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;288(6):R1543-52.
8. Diel P, Friedel A, Geyer H, Kamber M, Laudenbach-Leschowsky U, Schänzer W *et al*. The prohormone 19-norandrostenedione displays selective androgen receptor modulator (SARM) like properties after subcutaneous administration. *Toxicol Lett*. 2008;177(3):198-204.
9. Zammit PS. All muscle satellite cells are equal, but are some more equal than others? *J Cell Sci*. 2008;121(Pt 18):2975-82.
10. Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;288(2):R345-53.
11. Kook SH, Lee HJ, Chung WT, Hwang IH, Lee SA, Kim BS *et al*. Cyclic mechanical stretch stimulates the proliferation of C2C12 myoblasts and inhibits their differentiation via prolonged activation of p38 MAPK. *Mol Cells*. 2008;25(4):479-86.
12. Stuelsatz P, Pouzoulet F, Lamarre Y, Dargelos E, Poussard S, Leibovitch S *et al*. Down-regulation of myod by calpain 3 promotes generation of reserve cells in C2C12 myoblasts. *J Biol Chem*. 2010;285(17):12670-83.
13. Charge SBP, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev*. 2004;84(1):209-38.
14. Yaffe D, Saxel D. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*. 1977;270(5639):725-7.
15. Lai J, Pittelkow MR. Physiological effects of ultrasound mist on fibroblast. *Int J Dermatol*. 2007;46(6):587-93.
16. Hill GE, Fenwick S, Matthews BJ, Chivers RA, Southgate J. The effect of low-intensity pulsed ultrasound on repair of epithelial cell monolayers in vitro. *Ultrasound Med Biol*. 2005;31(12):1701-6.
17. Artileiro PP, Fernandes KPS, Barbosa JLP, de Oliveira TS, Bussadori SK, Mesquita-Ferrari RA. Análise comparativa dos efeitos do ultrassom terapêutico e laser de baixa potência sobre a proliferação de células musculares durante a diferenciação celular. *Fisioter Mov*. 2012;25(1):21-9.
18. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(2):55-63.
19. Woerdenbag HJ, Merfort I, Passreiter CM, Schmidt TJ, Willuhn G, van Uden W *et al*. Cytotoxicity of flavonoids and sesquiterpene lactones from Arnica species against the GLC4 and the COLO 320 cell lines. *Planta Med*. 1994;60(5):434-7.
20. Lewis MI, Fournier M, Yeh AY, Micevych PE, Sieck GC. Alterations in diaphragm contractility after nandrolone administration: an analysis of potential mechanisms. *J Appl Physiol*. 1999;86(3):985-92.
21. Johansen KL, Painter PL, Sakkas GK, Gordon P, Doyle J, Shubert T. Effects of resistance exercise training and nandrolone decanoate on body composition and muscle function among patients who receive hemodialysis: a randomized, controlled trial. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(8):2307-14.
22. Lee DK. Androgen receptor enhances myogenin expression and accelerates differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;294(2):408-13.
23. Frisoli, Jr A, Chaves PHM, Pinheiro MM, Szejnfeld VL. The Effect of nandrolone decanoate on bone mineral density, muscle mass, and hemoglobin levels in elderly women with osteoporosis: a double-blind, randomized, placebo-controlled Clinical Trial. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2005;60A(5):648-53.
24. Gebhardt A, Pancherz H. The effect of anabolic steroids on mandibular growth. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2003;123(4):435-40.
25. Sinha-Hikim I, Roth SM, Lee MI, Bhasin S. Testosterone-induced muscle hypertrophy is associated with an increase in satellite cell number in healthy, young men. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;285:E197-E205.
26. Vicencio JM, Estrada M, Galvis D, Bravo R, Contreras AE, Rotter D *et al*. Anabolic androgenic steroids and intracellular calcium signaling: a mini review on mechanisms and physiological implications. *Mini Rev Med Chem*. 2011;11(5):390-8.
27. Kamanga-Sollo E, White ME, Hathaway MR, Chung KY, Johnson BJ, Dayton WR. Roles of IGF-I and the estrogen, androgen and IGF-I receptors in estradiol-17beta and trenbolone acetate-stimulated proliferation of cultured bovine satellite cells. *Domest Anim Endocrinol*. 2008;35(1):88-97.
28. Sculthorpe N, Solomon AM, Sinanan AC, Bouloux PM, Grace F, Lewis MP. Androgens affect myogenesis in vitro and increase local IGF-1 expression. *Med Sci Sports Exerc*. 2012;44(4):610-5.
29. Nogueira GT, Mesquita-Ferrari RA, Souza NHC, Artileiro PP, Albertini R, Bussadori SK *et al*. Effect of low-level laser therapy on proliferation, differentiation, and adhesion of steroid-treated osteoblasts. *Lasers Med Sci*. 2012;27:1189-93.