

Anal. Real Acad. Farm. 2001, 67:

————— **Artículos** —————

Originales

**Estudio mediante Radioinmunoanálisis (RIA) y
análisis inmunoradiométrico (IRMA) del
equilibrio de la reacción antígeno-anticuerpo de
algunas sustancias**

EDUARDO SAN MARTÍN CIGES; JOSÉ LUIS MORENO FRIGOLS;
*Dpto. de Química Física. Sección Farmacia.- Facultad de Farmacia.-
Valencia.*

JOSÉ ESTEBAN PERIS RIBERA
*Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.- Facultad de Farmacia.-
Valencia.*

SOFÍA ARACELI SANZ ALIAGA
Hospital la Fe.- Valencia

RESUMEN

Se ha estudiado el equilibrio de la unión, a sus anticuerpos específicos, de las siguientes sustancias: Insulina y dehidroepiandrosterona sulfato (DHEAs), mediante RIA en fase sólida, osteocalcina y fracción c-terminal de la parathormona (PTHc), mediante RIA en disolución y enolasa específica neuronal (NSE), tiroglobulina (Tg) y el marcador tumoral CA549, mediante IRMA.

Se pretende determinar un modelo que explique, de manera general, dichas reacciones antígeno-anticuerpo, así como establecer la influencia de algunos factores: temperatura, clase de anticuerpo, reacción en fase sólida o en disolución, características del antígeno,... sobre esta unión.

Los resultados obtenidos en el estudio del equilibrio no se ajustan al modelo de sitios idénticos e independientes, sin embargo, proporcionan un excelente ajuste a la ecuación de Hill.

Las reacciones estudiadas presentan un valor bajo de la entalpía de reacción concordante con la naturaleza de la unión antígeno-anticuerpo.

Palabras clave: Unión antígeno-anticuerpo.- RIA.- IRMA.

SUMMARY

Study of binding antigen-antibody of some substances by means of radioimmunoanalysis (RIA) and immunoradiometric analysis (IRMA)

It has been studied the binding to their specific antibodies, of the following substances: insulin and dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAs) by means of solid-state RIA, osteocalcin and c-terminal fraction parathormone (PTHc) by means of RIA of the corresponding solutions, and neuronal specific enolase (NSE), tiroglobuline (Tg) and the tumoral marker CA549 by means of IRMA. It has been assayed a theoretical model to explain, in a general way, the antigen-antibody reactions, as well as to evaluate the influence on the binding of several factors: temperature, kind of antibody, kind of reaction (in solid state or in solution), antigen features.

The obtained results at the steady-state did not allowed and adequate fit of a model with binding sites identical and independents. However, a good fit was obtained with the Hill's equation. The studied reactions presented a low value of entalpy, according to the nature of the antigen-antibody binding.

Key words: Binding antigen-antibody.- RIA.- IRMA.

INTRODUCCIÓN

Son numerosos los métodos desarrollados para caracterizar sistemas de unión de una macromolécula a los ligandos cuando existe cooperatividad entre los sitios de unión. Estos incluyen el uso del coeficiente de Hill, la representación de Scatchard y varias aproximaciones estadísticas. Se han desarrollado ecuaciones para el cálculo estequiométrico de las macroconstantes de unión. Sin embargo, existe una considerable confusión en la aplicación de estos métodos y en la interpretación del comportamiento de la unión (1).

Isotermas de adsorción sigmoideas, coeficientes de Hill mayores de 1 y representaciones de Scatchard convexas se aceptan como muestra de cooperatividad positiva (1, 2).

La determinación experimental de la o las constantes de afinidad en reacciones antígeno-anticuerpo por los métodos convencionales (Scatchard, Hill, etc.) tropieza de ordinario con la dificultad provocada

por el desconocimiento de la concentración total de sitios enlazantes, lo que imposibilita el cálculo del parámetro “r” (número de moléculas de ligando enlazadas por mol de ligante). Este problema suele resolverse sustituyendo la representación de Scatchard tradicional $r/[A]$ vs. r (donde [A] es la concentración de ligando libre en el equilibrio) por B/F vs. B (siendo B y F proporcionales a las concentraciones de ligando enlazado y libre respectivamente). En este caso, la intersección de la gráfica con el eje de abscisas suministra el valor de B_m es decir, la cantidad de antígeno que satura por completo al anticuerpo presente. Pero el método es sólo aplicable cuando dicha intersección puede obtenerse por extrapolación de la gráfica, lo cual lo limita casi exclusivamente al caso en que dicha representación sera rectilínea o convexa.

Galley et al. Han propuesto un método de cálculo de las constantes a partir de representaciones clásicas de Scatchard a través de la determinación de la concentración que satura la mitad de los sitios de unión y lo han aplicado al sistema bilirrubina-resinas peptídicas (1).

La adaptación de este método a los sistemas en los que se desconoce la concentración de ligante (anticuerpo), pero puede determinarse la cantidad máxima de ligando que puede unir (B_m), se realizó con resultados satisfactorios en un estudio de la unión de una serie de sustancias esteroideas a sus anticuerpos específicos (3).

En un estudio de la unión del 1-alopurinol a su anticuerpo monoclonal IgG₁ se ha indicado que el proceso de unión es exotérmico con un cambio de entropía positivo. Los valores de la constante de asociaciones y de entalpía excluyen que la reacción este controlada por difusión (4).

Por otro lado, los resultados de varios estudios con FSH, LH y Estradiol marcados con ¹²⁵I frente a sus anticuerpos específicos en fase sólida, indican que la difusión controla en parte estas reacciones (5,6).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado los reactivos pertenecientes a los Kits de RIA e IRMA siguientes: insulina (Coat-A-Count insulina de Diagnostic Products Corporation), DHEAs (DHE sulfato de Immunotech), osteocalcina (osteocalcina RIA DSL-6900 de Diagnostic Systems

Laboratories Inc.), PTHc (C-terminal PTH RIA kit de Instar Corporation), NSE (kit Prolifigen NSE IRMA de AB Sangtec Medical), Tg (kit DYNOfest Tg de Henning Berlin (GMBH) y CA549 (kit Bresmarq™ Tandem-R CA549 IRMA de Hybritech).

En los ensayos basados en RIA, a partir de la disolución que contiene el antígeno marcado con ^{125}I suministrada por el Kit o preparada con el producto liofilizado, según cada caso, se realizan una serie de diluciones hasta obtener concentraciones relativas de antígeno correspondientes al 100, 80, 60, 40, 30, 20, 10 y 5% de la inicial. En los casos basados en IRMA, se prepara a partir de los patrones del kit de las concentraciones más altas una disolución que corresponde a la dilución del 100%, (de aproximadamente 100ng/mL para NSE y de 56 Unidades/mL en el CA549). De estas se realiza diluciones hasta obtener las concentraciones relativas de antígeno indicadas anteriormente.

Se estudia el equilibrio de la reacción de cada antígeno frente a su anticuerpo (en disolución fijado a la pared del tubo o a la superficie de una bola), para cada una de las ocho concentraciones relativas de antígeno y manteniendo constante la concentración de anticuerpo. Este ensayo se realizó a cuatro temperaturas: 10, 20, 30 y 40° C.

En los casos basados en IRMA, se determina la cantidad de antígeno unido al anticuerpo mediante la adición de un volumen constante de un segundo anticuerpo marcado con ^{125}I que se deja reaccionar hasta alcanzar el equilibrio.

Se mide la radiactividad total y la ligada en un controlador L.K.B.

Las características concretas, para cada una de las sustancias utilizadas en los ensayos anteriormente descritos se indican, de forma resumida en la tabla siguiente:

TABLA I

Características de los distintos ensayos realizados para cada antígeno.

Donde los símbolos significan: "Ag" es la sustancia utilizada como antígeno, "Ac" el anticuerpo; sea tubo recubierto, bola recubierta o volumen constante de la disolución del 100% "volumen" es el volumen de la correspondiente disolución de antígeno que se adiciona en cada caso y "t.equilibrio" es el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio, en minutos (min) o en horas (h).

Ag	Basado en	Volumen	Ac	t. equilibrio
Insulina	RIA en fase sólida	500 µL	Tubo recubierto	16 h.
DHEAs	RIA en fase sólida	500 µL	Tubo recubierto	120 min.
Osteocalcina	RIA en disolución	100 µL	100 µL	180 min.
PTHc	RIA en disolución	200 µL	200 µL	16 h.
NSE	IRMA	25 µL	Bola recubierta	180 min.
Tg	IRMA	50 µL	Tubo recubierto	16 h.
CA549	IRMA	20 µL	Bola recubierta	240 min.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La actividad en cuentas por minuto (cpm), correspondiente al equilibrio, se ha tomado como la obtenida transcurrido el tiempo suficiente que se especifica en cada caso. Tal actividad es directamente proporcional a la diferencia entre el número total de cpm presentes en cada tubo y las correspondientes al antígeno ligado. Con estas premisas resulta:

B = actividad en cpm debida al antígeno unido al anticuerpo.

W = actividad en cpm total.

F = actividad en cpm debida al antígenolibre (F = W-B).

La ecuación clásica de Scatchard para el ajuste del equilibrio en sistemas biológicos es:

$$\frac{r}{(A)} = K(N - r)$$

donde:

(A) = concentración de antígeno libre.

K = constante de equilibrio para la unión antígeno-anticuerpo

N = número de sitios de unión por molécula de anticuerpo, que se considera como 2.

R = número promedio de moléculas de ligando unidas por molécula de anticuerpo.

La adaptación de esta ecuación al caso concreto estudiado se realiza a través de las siguientes relaciones:

$$(A)_{\text{libre}} + (A)_{\text{ligada}} = \text{cte.} W$$

$$(A)_{\text{ligada}} = \text{cte.} B$$

$(A)_{\text{ligada máx}} = \text{cte.} B_m$ ($B_m =$ actividad, en cpm, debida a la máxima cantidad de antígeno que puede ligar el anticuerpo).

$$(P) = \frac{(A)_{\text{ligada máx}} - (A)_{\text{ligada}}}{2} = \frac{B_m - B}{2} \cdot \text{cte}$$

$$(P)_0 = \frac{B_m}{2} \cdot \text{cte}$$

$$r = \frac{(A)_{\text{ligada}}}{(P)_0} = \frac{B \cdot \text{cte}}{\frac{B_m}{2} \cdot \text{cte}} = \frac{2B}{B_m}$$

$$(A) = (A)_{\text{libre}} = \text{cte} (W - B)$$

$$\frac{r}{(A)} = \frac{2B}{B_m (W - B) \cdot \text{cte}}$$

$$\frac{2B}{B_m (W - B) \cdot \text{cte}} = K \left(2 - \frac{2B}{B_m} \right)$$

Que, simplificada, se reduce a:

$$\frac{B}{F} = K^* (B_m - B) \quad \text{siendo; } K^* = \text{cte.} K$$

de donde se deduce que una gráfica de B/F frente a B debe ser de tipo rectilíneo en caso de seguirse dicha ecuación. Las representaciones que se han obtenido (sólo para los RIA) son las siguientes:

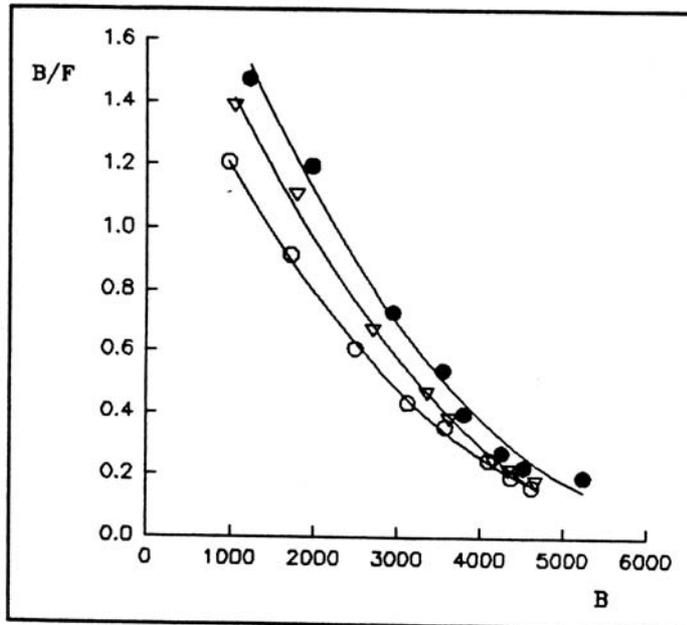


Figura 1.- Se representa la actividad unida (B) para cada dilución de insulina a las temperaturas de (\bullet $T = 30^{\circ}\text{C}$, ∇ $T = 20^{\circ}\text{C}$ y \circ $T = 10^{\circ}\text{C}$) frente al cociente B/F, siendo F la actividad libre o no unida.

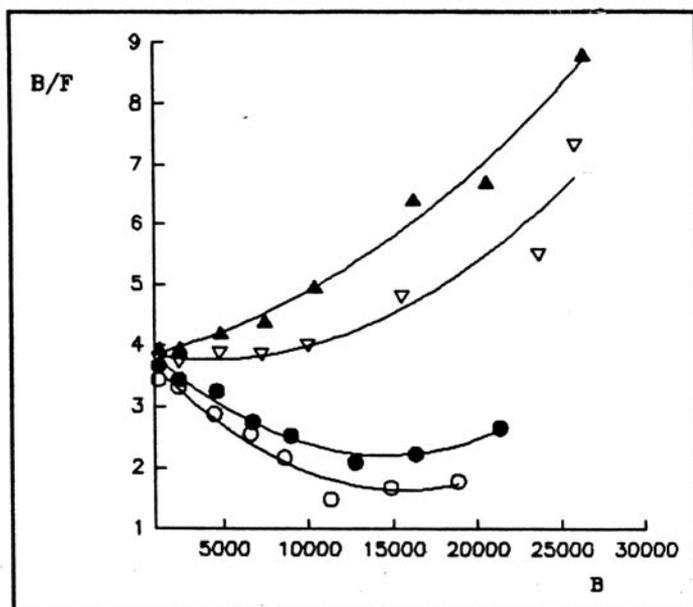


Figura 2.- Se representa la actividad unida (B) para cada dilución de DHEAs a las temperaturas de (\blacktriangle $T = 40^{\circ} C$ ∇ $T = 30^{\circ} C$ \bullet $T = 20^{\circ} C$ y \circ $T = 10^{\circ} C$) frente al cociente B/F, siendo F la actividad libre o no unida

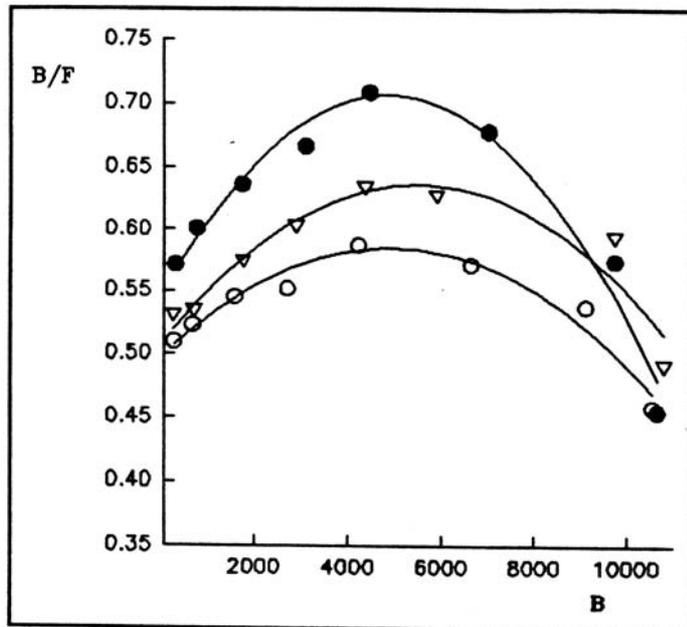
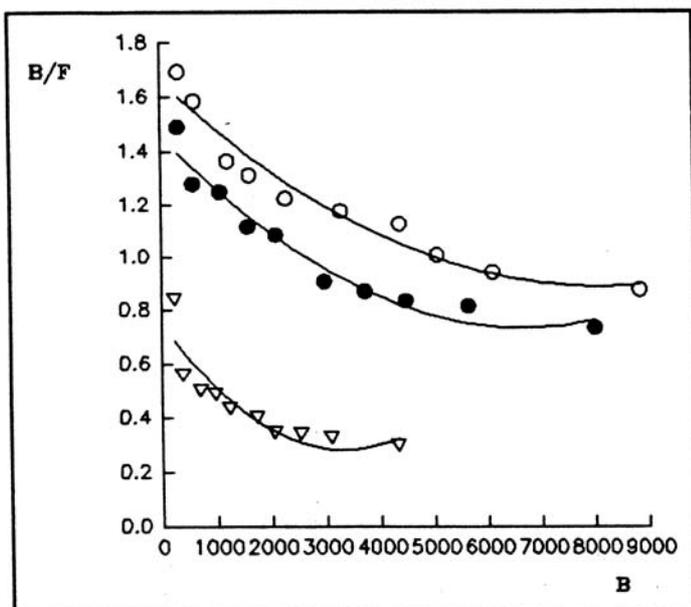


Figura 3 Se representa la actividad unida (B) para cada dilución de osteocalcina a las temperaturas de (∇ $T = 30^{\circ}C$, \bullet $T = 20^{\circ}C$ y \circ $T = 10^{\circ}C$) frente al cociente B/F, siendo F la actividad libre o no unida.

Figura 4.- Se representa la actividad unida (B) para cada dilución de PTH a las temperaturas de (∇ T = 30° C, \bullet T = 20° C y \circ T = 10° C) frente al cociente B/F, siendo F la actividad libre o no unida



Las gráficas que se han obtenido se desvían en todos los casos del comportamiento previsto por la ecuación anterior. En efecto, la ecuación clásica de Scatchard está deducida suponiendo que la interacción polímero-ligando está regida por una constante de equilibrio única, lo que

implícitamente supone admitir que todos los sitios de unión son idénticos e independientes.

Las gráficas de Scatchard obtenidas para la osteocalcina son claramente convexas, y sus ecuaciones de regresión presentan coeficientes del término cuadrático negativos. Teniendo presente que este parámetro determina la derivada segunda de B/F frente a B, tal signo confirma la convexidad, lo cual, como es sabido, se identifica con cooperatividad positiva. Este hecho concuerda con el alto coeficientes de Hill obtenido para la osteocalcina.

Las gráficas de Scatchard obtenidas para la insulina DHEAs y PTHc son cóncavas, lo cual puede deberse tanto a cooperatividad negativa como a sitios de unión diferentes.

Como resumen, puede decirse que la hipótesis de cooperatividad positiva confirmada en el caso de la osteocalcina es coherente con el mecanismo de reacción propuesto para la cinética de estas reacciones (7), y con los coeficientes de Hill elevados que se han encontrado en algunos casos.

En contra de esta hipótesis se presenta el carácter cóncavo de algunas representaciones de scatchard por lo que puede descartarse el modelo de sitios diferentes e incluso la cooperatividad negativa.

El caso de la insulina, en el que se encuentra un coeficiente de Hill inferior a uno, podría interpretarse pensando en algún tipo de impedimento estérico, más aún si se tiene en cuenta que el anticuerpo está fijado a la pared del tubo, y por tanto, no dispone de la movilidad que podría evitar dicho impedimento. De forma análoga a la restricción e inhibición estérica obtenida en otro estudio (8).

Para uniones interaccionantes se utiliza la ecuación de Hill, cuya adaptación al sistema aquí estudiado se realiza de la siguiente forma:

$$\theta = \frac{B}{B_m} \quad \text{y} \quad (A) = \text{cte}(W - B) = \text{cte}.F$$

sustituyendo, queda:

$$\text{Ln} \frac{\frac{B}{B_m}}{1 - \frac{B}{B_m}} = \ln K + N \cdot \ln(cte \cdot F) = \ln K + N \ln cte + N \ln F$$

siendo:

$$\text{Logit} \frac{\frac{B}{B_m}}{1 - \frac{B}{B_m}} = \ln \frac{\frac{B}{B_m}}{1 - \frac{B}{B_m}}$$

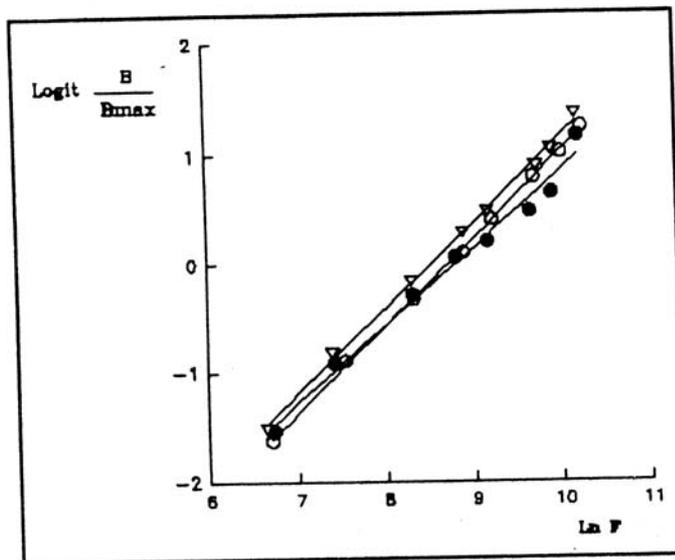
y haciendo $cte^N \cdot K = K^*$ la ecuación queda de la forma

$$\text{Logit} \frac{B}{B_m} = \ln K^* + N \ln F$$

Para comprobar si los resultados obtenidos se ajustaban a esta ecuación se ha utilizado el programa RIACALC. Este programa calcula B_m mediante una extrapolación y posteriormente realiza el ajuste de los datos a la ecuación anterior.

A continuación se indican, como ejemplo de las 7 sustancias estudiadas, las representaciones de Hill obtenidas para insulina (RIA en

Figura 5.- Representación de Hill para la insulina a las temperaturas de 10 (○), 20 (●) y 30 (▽) °C. Siendo B la actividad (en cpm) unida, Bmax la máxima actividad (en cpm) que el anticuerpo puede unir, y F la actividad (en cpm) libre.



osteocalcina (RIA en disolución) y NSE (IRMA) a las distintas temperaturas: fase sólida),

En la siguiente tabla resumen, se indican las ecuaciones de regresiones obtenidas para todas las sustancias:

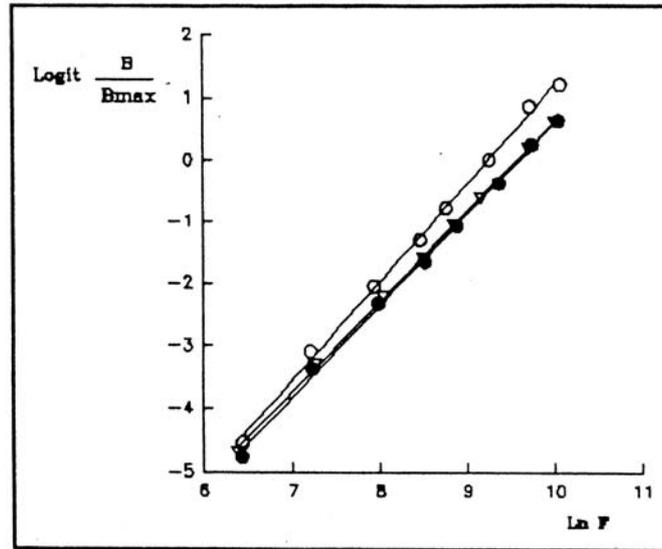


Figura 6.- Representación de Hill para la osteocalcina a las temperaturas de 10 (○), 20 (●) y 30 (▽) °C. Siendo B la actividad (en cpm) unida, Bmax la máxima actividad (en cpm) que el anticuerpo puede unir, y F la actividad (en cpm) libre.

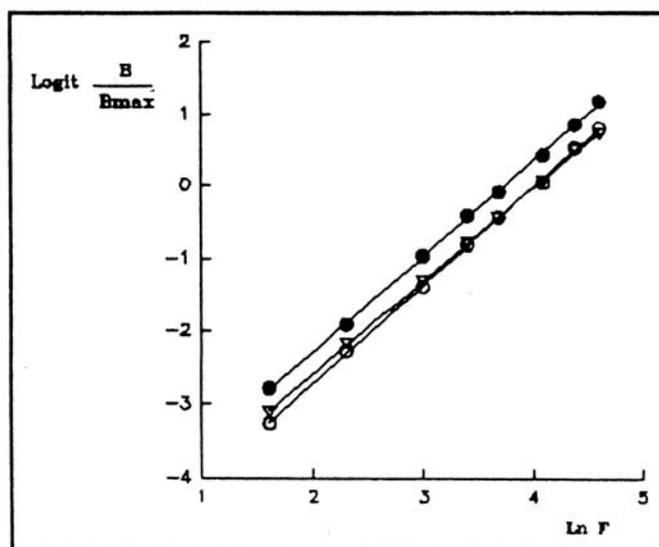


Figura 7.- Representación de Hill para la NSE a las temperaturas de 10 (○), 20 (●) y 30 (▽) °C. Siendo B la actividad (en cpm) unida, Bmax la máxima actividad (en cpm) que el anticuerpo puede unir, y F la actividad (en cpm) libre.

TABLA 2

Ecuaciones de regresión obtenidas para las representaciones de Hill

T (°C)	INSULINA	r
10	Logit B = 0,795 ln F - 6,933	0,9997
20	Logir B = 0,706 ln F - 6,219	0,993
30	Logit B = 0,778 ln F - 6,633	0,9990
DHEAs		
10	Logit B = 1,033 ln F - 9,471	0,990
20	Logit B = 1,263 ln F - 11,384	0,990
OSTEOCALCINA		
10	Logit B = 1,475 ln F - 14,144	0,9992
20	Logit B = 1,586 ln F - 14,648	0,9990
30	Logit B = 1,456 ln F - 13,925	0,9998
PTHc-terminal		

10	Logit B = 1,13 ln F - 10,412	0,9990
20	Lobit B = 1,119 ln F - 10,934	0,998
30	LogitB = 1,116 ln F - 10,997	0,998
NSE		
10	Logit B = 1,344 ln F - 5,400	0,9997
20	Logit B = 1,315 ln F - 4,912	0,9998
30	Logit B = 1,342 ln F - 5,336	0,99998
TIROGOBULINA		
10	Logit B = 1,593 ln F - 7, 227	0,994
15	Logit B = 1,586 ln F - 7,158	0,996
20	Logit B = 1,585 ln F - 7,202	0,994
25	Logit B = 1,609 ln F - 7,245	0,996
CAS549		
10	Logit B = 1,455 ln F - 5,112	0,998
20	Logit B = 1,540 ln F - 5,139	0,9997
30	Logit B = 1,295 ln F - 4,067	0,9995

El valor del parámetro N viene dado por la pendiente, que es superior a uno en todos los casos, excepto para la insulina. Dicho parámetro sería igual al número de sitios de unión por molécula en el caso de que el comportamiento fuera asimilable a una cooperatividad positiva tan acusada como para suponer que no existen las especies intermedias (modelo del todo o nada). Si los sitios fueran idénticos e independientes, N sería igual a uno, y la ecuación de Hill se reduciría a la de Scatchard. Y, como ya se ha dicho, los resultados obtenidos no se ajustan a dicha ecuación de Scatchard.

La presencia de dos lugares de unión por molécula de anticuerpo implica que el valor de N que correspondería al modelo de todo o nada sería dos. Puesto que se han obtenido valores de N comprendidos entre uno y dos, cabe pensar en una cooperatividad positiva moderada o en sitios de unión diferentes y no interaccionantes.

El comportamiento de la insulina se desvía del general con un coeficiente de Hill inferior a uno. Ello puede deberse a una cooperatividad moderadamente negativa o a sitios de unión diferentes.

Una ecuación válida para sistemas que contengan sitios de unión diferentes y no interaccionantes, puede escribirse, para una molécula con dos sitios de unión, en la forma:

$$r = \frac{K_1(A)}{1 + K_1(A)} + \frac{K_2(A)}{1 + K_2(A)}$$

que, operando, se transforma en:

$$r = \frac{(K_1 + K_2)(A) + 2K_1K_2(A)^2}{1 + (K_1 + K_2)(A) + K_1K_2(A)^2}$$

por otra parte, por haber dos sitios de unión, se cumple que $r = 2\theta$, y por tanto:

$$\theta = \frac{(K_1 + K_2)(A) + 2K_1K_2(A)^2}{2 + 2(K_1 + K_2)(A) + 2K_1K_2(A)^2}$$

$$1 - \theta = \frac{2 + (K_1 + K_2)(A)}{2 + 2(K_1 + K_2)(A) + 2K_1K_2(A)^2}$$

$$\frac{\theta}{1 - \theta} = \frac{(K_1 + K_2)(A) + 2K_1K_2(A)^2}{(K_1 + K_2)(A) + 2}$$

Ecuación que para el caso en que $K_1=K_2$ (sitios idénticos se reduce a:

$$\frac{\theta}{1 - \theta} = K_1(A)$$

que equivale a la ecuación de Hill cuando $N=1$. Si las constantes son muy diferentes, por ejemplo $K_1 \gg \gg K_2$, la ecuación quedaría en la forma:

$$\frac{\theta}{1 - \theta} = \frac{K_1(A) + 2K_1K_2(A)^2}{K_1(A) + 2}$$

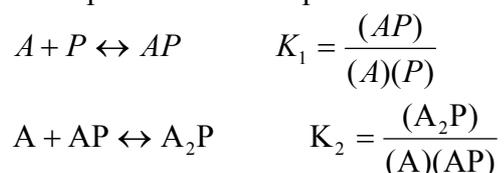
si se puede despreciar la concentración de especies monosustituidas, lo cual ocurre para valores de θ próximos a uno y altas concentraciones de (A), la ecuación anterior quedaría:

$$\frac{\theta}{1 - \theta} = K_1K_2(A)^2$$

que equivale a la ecuación de Hill para el modelo del todo o nada. Por tanto, el seguimiento de la ecuación de Hill con exponente comprendido

entre uno y dos es también compatible con el modelo de sitios distintos y no interaccionantes.

Se puede indicar aquí que la constante de equilibrio K' , además de englobar el factor de conversión de actividad en concentración, representa de alguna forma una combinación de las constantes parciales K_1 y K_2 correspondientes a los procesos:



Es de destacar la relativa independencia de la constante K' con la temperatura, ya que, con la excepción de la DHEAs, puede observarse que en todo los casos, el término independiente de la ecuación que equivale a $\ln K'$, presenta pequeñas fluctuaciones manteniéndose prácticamente constante.

No se dispone de datos suficientes como para determinar el calor de reacción, pero la constancia antes comentada permite deducir que tal parámetro debe tener un valor pequeño, lo cual es concordante con el hecho de que la unión antígeno-anticuerpo no forma enlaces químicos, ya que tiene lugar a través de fuerzas de tipo predominante hidrofóbico.

CONCLUSIONES

- 1.- Los resultados obtenidos en el estudio del equilibrio no se ajustan al modelo de sitios idénticos e independientes.
- 2.- Los resultados obtenidos en el estudio del equilibrio proporcionan un excelente ajuste a la ecuación de Hill.
- 3.- Las reacciones estudiadas presentan un valor bajo de la entalpía de reacción concordantes con la naturaleza de la unión antígeno-anticuerpo.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) GALLEY WC.; BOUVIER M.; GLAS, SD.; BROWN GR. AND ST-PIERRE LE. (1988): A simplified analysis of Scatchard plots for systems with two interacting binding sites. *Biopolymers* 27: 79-86.

- (2) KLOTZ IM.; HOUNSTON, DL. (1971): Properties of graphical representations of multiple classes of binding sites. *Biochemistry* Vol. 10, 16:3065-69.
- (3) MORENO FRIGOLS, JL.; MUT RONDA, S.; SALABER SALVADOR, MT.; ANTÓN FOS, GM.; PÉREZ GIMÉNEZ, F.; GARCÍA MARCH, FJ. (1992) Modificación al método de Scatchard para el cálculo de las constantes de afinidad de algunas sustancias esteroideas por anticuerpos específicos. *Anal. Real Acad. Farm.* 58: 583-594.
- (4) HOEBEKE, J.; ENGELBORGH, Y.; CHAMAT, S.; STROSBERG AD. (1987): The immune response towards betaadrenergic ligands and Their receptors. Equilibrium and kinetic binding studies of 1-alprenolol to a monoclonal antialprenolol antibody. *Molec. Immun.* Vol. 24, 6: 621-629.
- (5) ANTÓN FOS, GM.; MORENO FRIGOLS, JL. SALABART SALVADOR, MT.; MUT RONDA, S.; PÉREZ GIMÉNEZ, F. (1991) Influencia de la temperatura de incubación y cálculo de los parámetros cinéticos de la reacción entre el ¹²⁵I-Estradiol y su anticuerpo específico en fase sólida *Anal. Real Acad. Farm.* 57: 317-326.
- (6) GALLEGO GARCÍA, MC.; MORENO FRIGOLS, JL.; CIUDAD PLATERO, J. (1992): Efecto de la temperatura sobre la velocidad de la reacción en la determinación cuantitativa de la hormona foliculo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) mediante radioinmunoanálisis (RIA). *Anal. Real Acad. Farm.* 58: 59-65.
- (7) SAN MARTÍN CIGES, E.(1996) Estudio de la cinética y el equilibrio de algunas reacciones antígeno-anticuerpo. Tesis Doctoral.
- (8) ROUX KH., GREENSPAN NS. (1994) Monitoring the formation of soluble immune complexes composed of idiotype and anti-idiotypic antibodies by electron microscopy. *Mol. Immunol.* 31 (8): 599-606.