

Silenciamiento de genes mediante RNA interferencia

Consideraciones sobre el mecanismo y diseño de los sistemas efectores

Maria Fernanda Correa de Adjounian^{1,2}, Haroutian Adjounian^{1,3,4}, Sarkis Horacio Adjounian^{1,5}

¹- Sección de Biología Molecular de Agentes infecciosos. Instituto de Medicina Experimental. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

²- Cátedra de Bioquímica. Escuela Luís Razetti. MSc en Bioquímica.

³- Cátedra de Patología General y Fisiopatología. Escuela Luís Razetti. Médico. Especialista en Medicina Interna

⁴- Departamento de Medicina Interna. Hospital General de Este "Dr. Domingo Luciani". IVSS.

⁵- Estudiante de Medicina. Escuela Luís Razetti.

Correspondencia:

María Fernanda Correa de Adjounian.

Teléfonos: 058-212-6053658

E-mail: imataca@yahoo.com o imataca.maria@gmail.com

Recibido: 21/09/2007

Aceptado: 21/10/2007

Resumen

La interferencia por RNA es una nueva poderosa herramienta molecular para silenciar genes a nivel post-transcripcional. Es utilizada para la búsqueda de las funciones asociadas a varios genes mediante, genómica reversa y como herramienta terapéutica para reducir o bloquear la expresión de genes alterados o sobre expresados, en terapia genética. La interferencia por RNA proporciona una estrategia fácil y rápida para degradar los RNA mensajeros mediante la introducción de un RNA pequeño de doble cadena homólogo (siRNA) al RNA mensajero celular de interés, removiéndolo de una manera secuencia específica. En este artículo de revisión se resumen el mecanismo básico propuesto para producir silenciamiento vía interferencia por RNA, algunos de los requisitos para producir los siRNA intracelulares capaces de producir silenciamiento, así como los posibles sistemas efectores para transferir éstos a las células o tejidos. La misma pretende ayudar a divulgar información sobre tópicos de Biología Molecular de actual interés médico.

Palabras claves: RNA interferencia. Mecanismos y efectores.

Abstract

RNA interference (RNAi) is a powerful new molecular tool to downregulate the gene expression at posttranscriptional level. It is being used in reverse genetic to found functions of several genes and as a therapeutic device to knockout or knockdown altered or over-expressed genes, in gene therapy. RNA interference now provides a fast and easy strategy to depleting mRNA by introducing double-stranded RNA homologous to a particular cellular mRNA, leading to its sequence specific removing. In this review we summarized the basic mechanism for RNAi, some of the structural requirements needed in the siRNA to be able to produce an efficient and specific silencing and some effectors systems used to deliver them inside the cells or tissue. This review is written to divulgate some topics in Molecular Biology of actual medical interest.

Key words: RNA interference. RNAi mechanism. Effectors systems.

La regulación de la expresión de genes es un proceso vital para todas las formas de vida, ya que de ella depende el patrón de genes expresados que son requeridos y que garantizan la diferenciación celular, la organogénesis, el desarrollo, la respuesta celular al stress y al entorno e inclusive la muerte celular programada, entre muchos otros. Muchos de los mecanismos regulatorios operan a nivel genético controlando principalmente el proceso de transcripción y post transcripción de los genes. Desde hace unos años se puede estudiar y comparar patrones de expresión de genes midiendo a gran escala cuales son los ARN mensajeros (mRNA) producidos que difieren entre una célula o tejido control o normal vs. uno sometido al estímulo o presente en una condición patológica y son innumerables los ejemplos donde se ha demostrado que la causa de enfermedad subyace en la sobreexpresión o en la expresión alterada de genes. Además, esa basta información sobre genómica y transcriptómica producida a la

fecha, ha arrojado listas de nuevos genes a los que no se les conoce a la fecha cual es su producto final de expresión y/o su función. Con el uso de herramientas de genética reversa (una vez conocido el gen ir a buscar su producto de expresión) se puede estudiar y asignar una función a dichos genes y a las consecuencias de sus patrones de expresión alterados. Para ello, se han usado modelos animales o celulares en donde se ha removido, mutado, o inhibido la expresión de un gen o se ha sobreexpresado el mismo, asociándole a dicha secuencia un producto de expresión (RNA o proteína u otro) encontrado tras estudiar el patrón fenotípico observado. Dentro de esas herramientas moleculares dirigidas a reducir o a bloquear la expresión de un gen se usan las secuencias antisentido (ASO)¹, las ribozimas², los morfolidos³, la interferencia por ARN (RNAi)⁴, los anticuerpos específicos contra la proteína de interés, las proteínas dominantes negativas⁵ y los aptámeros para proteínas⁶, entre otros. Otra información impor-

tante que deriva de conocer el patrón de expresión de genes es que los productos de estos genes sobreexpresados o con variantes alelicas no funcionales pueden ser blancos moleculares a silenciar, bloquear, o reducir mediante terapia genética, usando las herramientas moleculares antes señaladas.

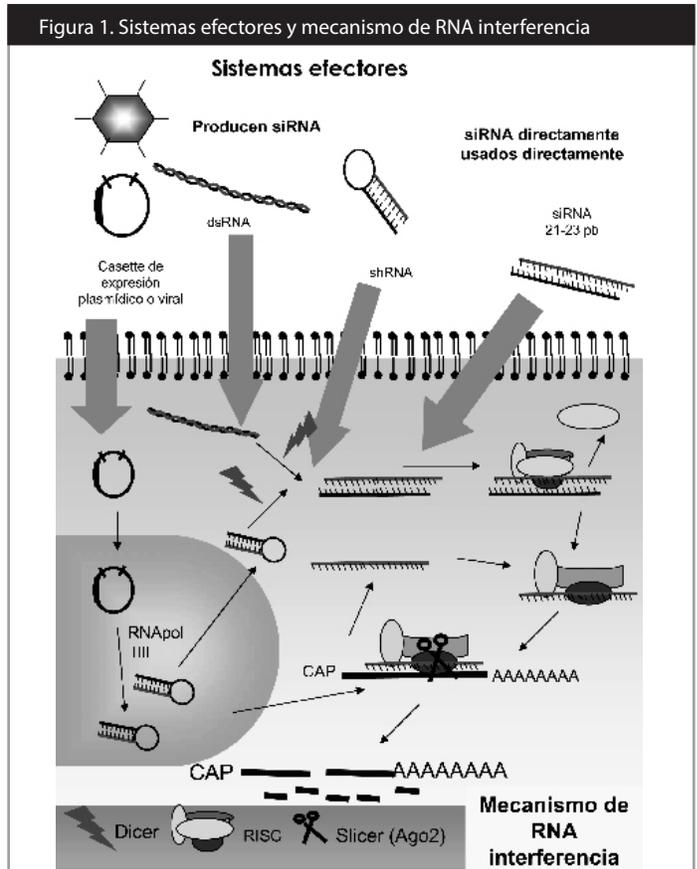
Desde hace 8 años se dispone de una nueva herramienta molecular, que ha revolucionado al mundo científico, la interferencia por ARN (RNAi), con la cual se puede reducir (knock-down) o perder (knock-out) la expresión de un gen en células de mamíferos (in vitro) e inclusive en animales (in vivo). Esta interferencia se logra, mediante la introducción a nivel celular de un ARN de doble cadena pequeño de unos 21 – 27 pb (siRNA), el cual es reconocido a nivel celular por una maquinaria ancestral que media la degradación o supresión específica del o los mRNA(s) que contiene la secuencia complementaria al siRNA introducido o producido, produciéndose principalmente una degradación del mRNA citoplasmático y una disminución de la traducción del mensaje. Recientemente ha sido publicado un excelente artículo de revisión sobre la historia de la interferencia por ARN y los microRNA (RNAi endógenos)⁷.

Mecanismo de interferencia por ARN

Este mecanismo fue observado por primera vez en plantas, en 1990⁸, al tratar de incrementar la expresión del gen de la enzima chalcona sintetasa (CHS) en las petunias (una enzima encargada de la génesis del color de las flores), y en vez de generar petunias con un color violeta más intenso, que era el efecto deseado, sólo se observaron petunias blancas o hipopigmentadas, dada la reducción de la expresión del gen CHS en unas 50 veces. Estos autores concluyeron que la sobreexpresión del gen transferido (transgen) produjo una "co-supresión" del gen de la CHS endógeno. Después de esta observación inicial, se encontró este fenómeno en *D. melanogaster*, *Neurospora crassa*, *C. elegans* asignándole diferentes nombres a lo que se conoce hoy en día como interferencia por ARN. La RNAi es un fenómeno, evolutivamente conservado, de regulación a nivel post-transcripcional (después que el mRNA se ha producido) que permite silenciar genes por reconocimiento de la secuencia nucleotídica específica y que esta presente en diferentes especies, incluyendo los mamíferos⁹.

Un resumen del mecanismo de RNAi propuesto a la fecha se representa en la figura 1, y se inicia con la introducción a las células de un ARN de doble cadena, bien sea, naturalmente, por un evento de transposición, por un virus o por la producción a nivel celular de microRNAs endógenos, o por procedimientos experimentales. Aunque las observaciones iniciales señalaron, que los ARN de doble cadena largos, dsRNA (> de 30 pares de bases) introducidos en mamíferos, desencadenaban una respuesta celular de degradación inespecífica, por la activación de la vía del interferón, finalizando en la muerte celular por apoptosis, a diferencia de lo que ocurría en *D. melanogaster*, *C. elegans* donde inicialmente fue descrito este fenómeno. Sin embargo, se demostró en el 2001¹⁰ que si el dsRNA era de unos 21-25 pb (siRNA) podía inducir el silenciamiento específico en células de mamíferos, lo cual incrementó el interés por esta metodología, como herramienta en genética reversa y terapéutica aplicable en humanos. Después, se observó que los shRNA (horquilla pequeñas de ARN compuestas por la hebra sentido (guía) y antisentido

(pasajera) conectadas por unas secuencias no codificante intercalada entre ambas cadenas de unos 6 nucleótidos, podía producir interferencia por RNA (RNAi)¹¹, ver figura 1. También, se puede lograr el silenciamiento usando sistemas de expresión plasmídicos y virales, transferibles o capaces de infectar a las células, de cuya expresión resultan shRNA o dsRNA efectivos para el silenciamiento¹².



La interferencia por RNA es mediada por RNAs de 21-223pb de doble cadena (siRNA), que pueden ser introducidos a la célula directamente (siRNA químicos) o ser generados intracelularmente, al ser transferidos al interior de la misma, RNA de doble cadena largos dsRNA (sustratos de DICER), pequeñas horquillas producidas químicamente o sintetizadas intracelularmente al ser transcritas por una RNA polimerasa III a partir de un sistema de expresión plasmídico o viral. Dentro de la célula los dsRNA o shRNA son transformados a siRNA por DICER, y los siRNA producidos activan a RISC, un complejo multi enzimático capaz de remover la hebra pasajera o sentido y dejar al complejo RISC activo con la hebra antisentido o guía, listo para producir silenciamiento específico del RNA mensajero de secuencia complementaria al siRNA, produciendo la degradación específica del mRNA. La enzima capaz de degradar la hebra pasajera y el RNA mensajero es Ago2. En función de la dosis, o del sistema efector usado, el efecto intracelular puede durar días a meses. Además, si los cassettes de expresión viral o plasmídicos están acoplados a sistemas de expresión regulable, el efecto de silenciamiento puede encenderse o apagarse en la célula por la acción de un inductor, por ejemplo un antibiótico como ocurre en los sistemas Tet-on u off. En la figura 1, la enzima DICER esta representada por una fecha roja quebrada y Ago 2 o Slicer por una tijera. Esta imagen es parecida a la publicada por Putnam D, 2006 (19), con algunas modificaciones.

Una vez que se logra introducir a las células los siRNA (ya listos), o a través de sus precursores: los dsRNA o los cassettes de expresión de los mismos, los dsRNA introducidos o producidos, activan una maquinaria celular que los reconoce (dsRNA, shRNA) y los transforma en siRNA pequeños de 21-23 mer (pb). Esta reacción la cataliza una enzima del tipo ARNasa III¹³ a la que denominaron Dicer. Una vez que esta enzima produce los siRNA, éstos son reconocidos por un complejo enzimático formado por varias proteínas denominado complejo RISC (RNA induced silencing complex). El

complejo RISC se ensambla y una actividad similar a una helicasa asignada al complejo, desenrolla la doble hélice del siRNA quedándose con la hebra antisentido o guía. Este complejo esta formado por varias proteínas, en humanos, por unas de la subcategoría Argonauta (Ago1-4) y PIWI (hpiw 1-4). Se sabe a la fecha que estas proteínas son esenciales para el silenciamiento, y que las Ago 1, 3 y 4 carecen de actividad endonucleolítica, actividad recién asignada a Ago2. Ago2 puede ser la enzima capaz de hidrolizar al RNA mensajero blanco y a la hebra de RNA no incorporada a RISC o hebra pasajera, permitiendo que la hebra guía o antisentido quede ensamblada en el complejo RISC. Se conoce que este proceso requiere energía en forma de ATP. La entrada del la hebra guía es facilitada, ya que, el extremo 5' de la región antisentido de siRNA es mucho menos estable termodinámicamente que el extremo 5' de la hebra pasajera, produciéndose la correcta entrada a RISC. Se reconoce la necesidad de proteínas accesorias que permitan la función completa de RISC, pero no han sido identificadas todavía. También se sabe que para que ocurra silenciamiento, no se requiere que el RNA mensajero se este traduciendo en los ribosomas. El complejo RISC-Ago2 se ha encontrado colocalizado a nivel celular en el citosol en un centro especializado que media la degradación de mensajeros, un sitio recientemente reconocido involucrado en la degradación, recambio y procesamiento de los RNA mensajeros, el mRNA decay center. La maquinaria de RISC activa reconoce a los ARN mensajeros que contiene la secuencia complementaria perfecta o casi perfecta, para guiar el corte preciso del ARN mensajero en una posición complementaria al nucleótido 10 (nt 10) de la hebra guía cuando se cuentan los nucleótidos a partir del extremo 5', el cual forma parte del área de reconocimiento. El proceso de RNAi es altamente eficiente (100-1000 veces más potente que los ASO), posiblemente porque la hebra de ARN esta protegida dentro del complejo RISC y éste puede actuar de manera catalítica degradando varios mRNAs. La secuencia requerida para el silenciamiento no supera los 7 nt de longitud y debe ser complementaria y continúa al mRNA. La dosis a emplear esta en el orden de $10^{-9}M$

Los Dres. Fire y Mello¹⁴, autores del primer trabajo donde se describe el mecanismo parcial de siRNA, fueron galardonados con el premio Nóbel de Fisiología y Medicina año 2006, por la importancia médica que puede tener este descubrimiento¹⁵.

Diseño de los siRNA efectivos y específicos para producir silenciamiento. Se dispone en la actualidad de varios programas de computación capaces de predecir los posible siRNA efectivos y selectivos para producir silenciamiento de una secuencia blanco determinada. Para poder usarlos es necesario conocer la secuencia codificante del mRNA o del gen completo, así como las secuencias removidas por splicing y las regiones que finalmente no se traducen (UTRs), los polimorfismos y variaciones presentes, información indispensables si se desea silenciar una variante de expresión originada por splicing alternativo o mediada por un alelo específico. Además, como primera búsqueda se recomienda revisar las bases de datos que describen las secuencias de siRNA que han sido previamente evaluadas experimentalmente, dado que muchos de esos siRNA validados pueden ser adquiridos comercialmente. Además, muchas de esas compañías proporcionan a sus usuarios servicios de diseño de siRNA.

Sin embargo, si se desea silenciar un gen nuevo o usar otros siRNA diferentes a los ya evaluados es recomendable ensayar al menos 3-5 siRNA candidatos diferentes en un ensayo de pre-validación. Para hacer la selección hay varios programas disponibles, unos basados meramente en las secuencias del siRNA y otros que además incluyen aproximaciones de las posibles estructuras secundarias adoptadas y la accesibilidad del RNA mensajero a silenciar. En la tabla 1 se muestran una lista de página web que permiten el uso libre de programas y/o ofrecen el servicio de diseño de siRNA¹⁶.

Tabla 1. Algunas páginas web con programas de libre uso o donde se envían las secuencias para el diseño de los posibles siRNA capaces de silenciar al blanco deseado

Nombre del Programa o pagina	Fuente (último ingreso Noviembre 2006)
siDESING® center	http://www.dharmacon.com/DesignCenter/DesignCenterPage.aspx
Sirna	http://sfold.wadsworth.org/sirna.pl y http://www.sirna.com
siRNA Design Service	http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Sigma_Genosys.html
BIOPREDSiRNAi	http://www.biopredsi.org/start.html
Design Invitrogens	http://www.invitrogen.com/content.cfm?pageid=10815
siRNA Target Zinder de Ambion	http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html
SiRNA Desing de Qiagen	http://www1.qiagen.com/Products/GeneSilencing/CustomSiRna/SiRnaDesigner.aspx
The RNAi web	http://www.rnaiweb.com/RNAi/siRNA_Design/

Una vez introducida la secuencia blanco en esos programas, éstos arrojan una lista de los posibles siRNA "candidatos" para cada blanco y los siRNA pueden ser sintetizados por varias casas comerciales como: Ambion, Qiagen, Sigma Proligo, Dharmacon, todas certificadas. Algunas consideraciones generales sobre los requerimientos estructurales necesarios para la efectividad y especificidad de los siRNA han sido revisadas recientemente por el Dr. Thomas Tuschl¹⁷, investigador pionero en esta tecnología y en establecer los criterios para la escogencia de los siRNA. Uno de los principales objetivos de la escogencia, es evitar los efectos inespecíficos de silenciamiento o efectos off target, es decir silenciamiento de otros blancos diferentes al blanco deseado lo que se logra evitando que la hebra pasajera sea usada como molde en el complejo RISC.

Sistemas efectores capaces de producir silenciamiento Una respuesta de RNAi puede ser producida por una gran variedad de efectores dentro de los cuales se incluye: los siRNA sintetizados químicamente (simples / desnudos o modificados químicamente para hacerles más estables al ataque de la nucleasas), los shRNA o siRNA transcritos in vitro, los siRNA generados por PCR, o los cassetes de expresión de los siRNA o shRNA clonados en sistemas o vectores de expresión de origen plasmídico o viral. También por la generación de múltiples siRNA contra un blanco al digerir dsRNA con endonucleasas III o Dicer recombinante. Todos lo siRNA, shRNA o los sistemas de expresión intracelular de los mismos pueden ser introducidos a la célula por diferentes métodos. Los siRNA y shRNA tienen menor tiempo de vida media y por lo tanto producen silenciamiento por cortos períodos de tiempo (pocos días). Para incrementar la duración del

efecto, estos pueden generarse intracelularmente usando los sistemas de expresión antes señalados que usan secuencias promotoras para la RNA polimerasa III, como las U6 y H1. En los vectores puede clonarse un cassette que contenga la secuencia sentido seguida de un espaciador y luego la secuencia antisentido seguida de una secuencia de terminación rica en U. Sin embargo, otra vía es la transfección simultánea con dos cassettes de expresión, uno para la hebra guía y otro para su complementaria, en el mismo o en diferentes plásmidos o sistema virales. Los siRNA generados de esta manera permanecen en la célula mayor tiempo pero son menos efectivos que los shRNA¹⁸. Ver parte superior de la figura 1.

Algunas estrategias para la transferencia de los siRNA: Al igual que una molécula de DNA, los siRNA (simples o como cassette de expresión) son polianiones, que no atraviesan la membrana plasmática, lo cual dificulta su transferencia a interior de las células o al núcleo. Además, una vez dentro de la célula son sensibles a la acción de las nucleasas allí presentes, es por ello que esta metodología presenta las mismas dificultades encontradas en la transferencia de DNA a las células, como ocurre para la terapia genética. Dentro de las estrategias usadas para llevar los siRNA a través de las membranas o estabilizarlos para soportar el ataque de las nucleasas intracelulares, tenemos: los siRNA químicamente modificados (más resistentes al ataque de nucleasa y menos cargados), los sistemas de transferencia no virales que incluyen los métodos físicos tales como: la inyección directa o usando bomba de perfusión constante, la electroporación (al aplicar corriente eléctrica), la transferencia de genes usando partículas metálicas o "ballistic gene transfer", o el ultrasonido. Otros métodos de transferencia no virales utilizan compuesto químicos capaces de hacer permeables a los siRNA al acomplejarse con ellos (al igual que para el DNA) e incluyen el uso de: polímeros catiónicos o lípidos catiónicos, tales como polietilenimina como polímero lineal o ramificado, policonjugados peptídicos degradables a nivel celular, polímeros basados en ciclodextrinas y unos derivados de la protamina (una proteína rica en arginina), a los que se les puede unir algunos anticuerpos específicos que facilitan la transferencia de manera tejida o célula específica. Además de estos sistemas antes mencionados, se usan extensamente los sistemas de transferencia viral, donde se utiliza el genoma deleciónado de un virus (al removerles secuencias indispensables para su duplicación) y en él se introduce el cassette de expresión de los siRNA o shRNA. Se usan virus capaces de infectar células con una alta actividad replicativa, o células en reposo o de baja tasa de duplicación; se usan sistemas virales capaces de integrarse o no al genoma celular. Los sistemas virales utilizados incluyen: adenovirus, adenovirus asociados (AAV), herpes simple-1 (HSV-1), lentivirus y otros retrovirus, entre otros. Cada uno de estos métodos presenta ventajas y desventajas, y su selección se basa en el tipo de célula o tejido a silenciar.

El silenciamiento de genes ya tiene un uso indiscutible en genética reversa y un enorme potencial sobre todo como herramienta terapéutica. Se conocen cada vez más los detalles del mecanismo de siRNA y de cómo lograr un silenciamiento efectivo y eficiente. Son numerosos los ejemplos, de su uso in vitro y también in vivo, donde esta metodología ha permitido definir la función de nuevos genes al producir un silenciamiento eficiente. Los costos de esta metodología aún son elevados, sin embargo, cada vez más se dispone de sis-

temas de transferencia efectivos, de reactivos más específicos y seleccionados, y tal vez lo más importante de muchas compañías de biotecnología y farmacéuticas compitiendo por el mercado de los insumos y uso clínico de la interferencia por RNA. A nivel del laboratorio, no es difícil de realizar y es mucho más efectiva en tiempo y esfuerzo que cualquiera de los otros métodos para producir degradación o inhibición específica de mensajeros, ya que ésta usa una maquinaria celular existente. En medicina, hay un interés considerable en usar estas herramientas en enfermedades como el cáncer, en enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas, así como en enfermedades de etiología viral. En teoría cualquier enfermedad que curse como consecuencia de la sobreexpresión de un gen o de la expresión de un alelo defectuoso pudiese ser tratada con RNA interferencia. En una próxima entrega se revisarán los sistemas de transferencia y su uso en medicina.

Referencias

1. Aboul-Fadl T. Antisense oligonucleotides: the state of the art. *Curr Med Chem.* 2005;12 (19):2193-214.
2. Tafesh A, Bassett T, Sparanese D, Lee CH. Destroying RNA as a therapeutic approach. *Curr Med Chem.* 2006;13 (8):863-81.
3. Amantana A, Iversen PL. Pharmacokinetics and biodistribution of phosphorodiamidate morpholino antisense oligomers. *Curr Opin Pharmacol.* 2005;5 (5):550-5.
4. Dykxhoorn DM, Lieberman J. The silent revolution: RNA interference as basic biology, research tool, and therapeutic. *Annu Rev Med.* 2005;56: 401-23.
5. Hudson DF, Morrison C, Ruchaud S, Earnshaw WC. Reverse genetics of essential genes in tissue-culture cells: 'dead cells talking'. *Trends Cell Biol.* 2002;12 (6):281.
6. Lee JF, Stovall GM, Ellington AD. Aptamer therapeutics advance. *Curr Opin Chem Biol.* 2006;10(3):282-9.
7. Sen GL, Blau HM. A brief history of RNAi: the silence of the genes. *FASEB J.* 2006; 20 (9):1293-9.
8. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia result in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 1991; 2:279-289
9. Dallas A, Vlassov AV. RNAi: a novel antisense technology and its therapeutic potential. *Med Sci Monit.* 2006;12 (4):RA67-74
10. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 2001 24;411 (6836):494-8.
11. Snove O Jr, Rossi JJ. Expressing short hairpin RNAs in vivo. *Nat Methods.* 2006; 3(9):689-95.
12. Morris KV, Rossi JJ. Lentivirus-mediated RNA interference therapy for human immunodeficiency virus type 1 infection. *Hum Gene Ther.* 2006;17 (5):479-86.
13. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* 2001;409 (6818):363-6
14. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE y Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 1998;391(6669):806-11
15. Couzin J. Nobel Prize in Physiology or Medicine. Method to silence genes earns loud praise. *Science.* 2006;314(5796):34.
16. Cullen BR. Enhancing and confirming the specificity of RNAi experiments. *Nat Methods.* 2006;3(9):677-81
17. Pei Y, Tuschl T. On the art of identifying effective and specific siRNAs. *Nat Methods.* 2006; 3 (9):670-6
18. Putnam D y Doody A. RNA-interference effectors and their delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2006;23 (2):137-64
19. Song E, Zhu P, Lee SK, Chowdhury D, Kussman S, Dykxhoorn DM, Feng Y, Palliser D, Weiner DB, Shankar P, Marasco WA, Lieberman J. Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat Biotechnol.* 2005; 23(6):709-17.
20. Li CX, Parker A, Menocal E, Xiang S, Borodyansky L, Fruehauf JH. Delivery of RNA interference. *Cell Cycle.* 2006;5(18):2103-9.
21. Wiznerowicz M, Szulc J, Trono D. Tuning silence: conditional systems for RNA interference. *Nat Methods.* 2006;3(9):682-8.