ISSN 2618-1819

Revista Argentina de Transfusión

Vol. XLIV 2018 N° 3-4

Asociación Argentina de Hemoterapia, Inmunohematología y Terapia Celular

Lavalleja 1214 (C1414DTZ)
Ciudad Autónoma de Buenos Aires
Argentina

+5411 4771-2501 (líneas rotativas)

aahi@aahi.org.ar

www.aahi.org.ar

Experiencia Clínica con el Uso de PRP en Lesiones Deportivas.

Dr. Ignacio Dallo - Unidad de Terapia Regenerativa y Cirugía Artroscópica. Sanatorio Garay, Santa Fe, Argentina.
Contacto: info@drignaciodallo.com.ar

El plasma rico en plaquetas (PRP) es una colección suprafisiológica de plaquetas derivadas de sangre autóloga centrifugada que contiene un medio heterogéneo de factores de crecimiento, interleucinas y citocinas importantes para la proliferación celular, la diferenciación, la neovascularización y la señalización. En particular, el factor de crecimiento similar a la insulina (FCI), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP), el factor de crecimiento del endotelio vascular (FCEV), el factor de crecimiento de fibroblastos (FCF) y el factor de crecimiento transformante (FCT), todos existen en diferentes concentraciones dentro del PRP. Estos factores de crecimiento antes mencionados han demostrado ser efectivos para mantener la integridad del cartílago, aumentar la proliferación celular, promover la diferenciación de condrocitos e inducir la angiogénesis. Además, los contenidos de moléculas pequeñas de PRP ayudan a reclutar células madre mesenquimales y fibroblastos para el sitio de la lesión. El plasma rico en plaquetas normalmente se cosecha de una extracción de sangre periférica, se centrifuga para separar los componentes y luego se extrae de las capas de fluido restantes.

Los niveles de leucocitos dentro del PRP pueden afectar positiva o negativamente el proceso de reparación. La mayor concentración de monocitos y neutrófilos en el PRP "rico en leucocitos" se ha asociado con niveles aumentados de interleuquina-1 y factor de necrosis tumoral alfa, ambos son citocinas inflamatorias. Es importante clasificar el contenido de leucocitos de PRP porque no todas las preparaciones se crean iguales. Dependiendo del momento de la recolección y el método de preparación, el contenido de leucocitos varía significativamente incluso dentro de un mismo sujeto. Los estudios clínicos han demostrado la ventaja del PRP "pobre en leucocitos" en comparación con el PRP "rico en leucocitos" para la curación del tendón y el tratamiento de la artrosis. En general, las concentraciones ideales de los numerosos factores de crecimiento, citoquinas e interleuquinas dentro del PRP aún no se han determinado.

Desde un punto de vista regulatorio para la Administración de Drogas y Alimentos de EE.UU. (FDA), el PRP entra en la categoría de tejido mínimamente manipulado y, como un producto sanguíneo autólogo, es más fácil de utilizar clínicamente sin pruebas exhaustivas en ensayos preclínicos y clínicos.

Las posibles indicaciones de PRP como una opción terapéutica para tratar lesiones deportivas como las lesiones del manguito rotador, de ligamento cruzado anterior, menisco y tendones, continúan expandiéndose.

PRP en Manguito rotador

El PRP promueve la cicatrización a nivel celular en el tejido del manguito rotador al inhibir la respuesta inflamatoria, proteger contra el estrés oxidativo que puede llevar a la apoptosis celular y estimular la liberación del factor de crecimiento regenerativo que conduce a la angiogénesis y reparación del tendón. Clínicamente, se ha utilizado el PRP en el manguito rotador como modalidad de tratamiento no quirúrgico y como un aumento biológico durante la cirugía.

La inyección de PRP puede ser útil en pacientes en los que las inyecciones de corticosteroides no han logrado aliviar el dolor.

La aumentación es una técnica quirúrgica que combinada con el PRP en la reparación artroscópica del manguito rotador, demuestra buenos resultados en patrones de lesión pequeños y agudos. En los desgarros masivos del manguito rotador que se sabe que tienen un alto índice de falla en la reparación artroscópica o aquellos que muestran un potencial de curación limitado, el PRP se ha empleado como un aumento de la intervención quirúrgica para promover la curación del tejido blando y mejorar los resultados del paciente. Sin embargo, los resultados de múltiples ensayos de Nivel 1 muestran un efecto limitado en la cicatrización de los tejidos, las tasas de reruptura y la propagación del desgarro con la adición de PRP a la reparación artroscópica de las lesiones del manguito rotador. La dosificación, la concentración, el contenido y el sitio de aplicación no homogéneos del PRP combinados con la falta de seguimiento a largo plazo limitan las aplicaciones clínicas de estos estudios.

PRP en Ligamento Cruzado Anterior (LCA)

En ciencia básica y modelos animales, el PRP estimula la liberación de factores de crecimiento que promueven la angiogénesis dentro del injerto, la maduración y remodelación del mismo y la incorporación del injerto del LCA en la interfaz injerto-hueso.

El mayor beneficio del efecto del PRP con respecto a la reconstrucción del LCA se observa con la aplicación en el lugar de la cosecha del injerto de tendón rotuliano. La brecha del sitio de la extracción del tendón rotuliano fue significativamente menor, la regeneración tisular fue significativamente mayor y las puntuaciones de los resultados del paciente fueron significativamente más altas con la administración de PRP en el sitio de la cosecha del injerto hueso-tendón-hueso.

En lesiones parciales e inestables del LCA se han reportado estudios que demuestran la mejora en la cicatrización y los escores clínicos objetivos y subjetivos con la aumentación intraoperatoria con PRP intraligamentario.

PRP en Tendón rotuliano

La tendinopatía rotuliana afecta a los atletas en una amplia gama de deportes debido a las altas fuerzas de extensión ejercidas sobre la rodilla al saltar, correr, patear y cambiar de dirección. El PRP se está utilizando en pacientes que han fracasado con el tratamiento conservador tradicional en un esfuerzo por atenuar la inflamación, aliviar el dolor e instigar la regeneración y reparación del tendón. Un ensayo clínico aleatorizado, doble ciego que comparó ejercicios de fortalecimiento excéntrico en combinación con PRP o punción seca encontró una mejoría temprana en los resultados clínicos y el alivio del dolor con la inyección de PRP que se disipó más allá de las 12 semanas. Una revisión sistemática de once estudios informó que los efectos beneficiosos de la inyección de PRP para tratar la tendinopatía rotuliana son inconsistentes y no concluyentes en estudios comparativos. En general, los resultados adversos o las complicaciones después de la inyección de PRP son poco frecuentes, pero la superioridad de la inyección de PRP para tratar la tendinopatía rotuliana aún no se ha demostrado en los ensayos clínicos.

PRP en Epicondilitis Lateral

El tratamiento para la epicondilitis lateral es principalmente conservador.

En los casos refractarios, la intervención quirúrgica para liberar el tendón del Extensor *Carpoi Radialis Brevis* (ECRB) se puede utilizar después del fracaso del tratamiento conservador. En estos casos refractarios, los clínicos han intentado el tratamiento con PRP o inyecciones de sangre autóloga con algún éxito y resultados equivalentes entre las dos terapias después de 6 semanas. Un ensayo controlado aleatorizado multi-céntrico, doble ciego informó aumento en el alivio del dolor y disminución de la sensibilidad del codo a las 24 semanas, lo que sugiere que el PRP puede tener efectos beneficiosos a largo plazo para tratar la epicondilitis lateral en comparación con los corticoides.

Existe una amplia investigación científica básica que respalda el uso de PRP para modular la inflamación y estimular la curación de tejidos en el laboratorio.

PRP en Cartílago Articular

El PRP se ha utilizado intraoperatoriamente como un complemento de las técnicas de estimulación de la médula ósea o en combinación con células y aspirados de médula ósea. Los estudios *in vitro* muestran que el PRP es un tratamiento prometedor y un complemento del tratamiento tradicional de las lesiones del cartílago focal debido a su efecto anabólico sobre condrocitos, células madre mesenquimales y sinoviocitos; la acción como un andamio celular por la formación del coágulo y la regeneración del cartílago.

La artrosis postraumática afecta a una proporción cada vez mayor de deportistas causando dolor, debilitamiento

y hasta graves secuelas. El PRP se está investigando como un tratamiento conservador dirigido a aliviar los síntomas de la artrosis y detener la progresión de la enfermedad o incluso revertir la destrucción del cartílago. Los estudios de ciencias básicas confirman la capacidad de PRP para disminuir la inflamación, lo que lleva a un aumento de la función y un mejor tratamiento sintomático. Los ensayos clínicos de alto nivel que comparan inyecciones de ácido hialurónico (AH), placebo (solución salina) y PRP documentan la capacidad del PRP para disminuir el dolor y aumentar las puntuaciones de los resultados funcionales en pacientes con artrosis. Los efectos beneficiosos del PRP son aún más pronunciados y de mayor duración en pacientes más jóvenes y en aquellos con cambios degenerativos más leves. La revisión sistemática de los ensayos clínicos publicados, los informes de casos y los estudios de cohorte confirman los resultados superiores con las inyecciones de PRP intraarticulares en comparación con el AH y el placebo para el tratamiento de la artrosis. En general, el PRP demuestra una mejora significativa en el dolor y los resultados funcionales. La terapia parece ser bien tolerada sin efectos secundarios o complicaciones. Todavía se necesita realizar más investigación sobre el momento óptimo de la administración del PRP, la cantidad recomendada de inyecciones y el contenido ideal del PRP.

Referencias

1. Chahla, J., Cinque, M. E., Piuzzi, N. S., Mannava, S., Geeslin, A. G., Murray, I. R., ... LaPrade, R. F. (2017). A Call for Standardization in Platelet-Rich Plasma Preparation Protocols and Composition Reporting. The Journal of Bone and Joint Surgery, 99(20), 1769–1779.
2. Dallo y col. Tendinitis Calcificada del Supraespinoso en un Triatleta Senior. Revista de la Asociación Argentina de Traumatología del Deporte, Volumen 21, Número 1 del año 2014.
3. LaPrade RF, Geeslin AG, Murray IR, Musahl V, Zlotnicki JP, Petrigliano F, Mann BJ. Biologic treatments for sports injuries II think tank-current concepts, future research, and barriers to advancement, part 1: biologics overview, ligament injury, tendinopathy. Am J Sports Med. 2016 Dec;44(12):3270-83. Epub 2016 Mar 29.
4. Dragoo JL, Wasterlain AS, Braun HJ, Nead KT. Platelet-rich plasma as a treatment for patellar tendinopathy: a double-blind, randomized controlled trial. Am J Sports Med. 2014 Mar;42(3):610-8. Epub 2014 Jan 30.
5. Seijas R, Ares O, Catala J, Alvarez-Diaz P, Cusco X, Cugat R. Magnetic reso- nance imaging evaluation of patellar tendon graft remodelling after anterior cruciate ligament reconstruction with or without platelet-rich plasma. J Orthop Surg (Hong Kong). 2013 Apr;21(1):10-4.
6. Filardo G, Kon E, Pereira Ruiz MT, Vaccaro F, Guitaldi R, Di Martino A, Cenacchi A, Fornasari PM, Marcacci M. Platelet-rich plasma intra-articular injections for cartilage degeneration and osteoarthritis: single- versus double-spinning approach. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2012 Oct;20(10):2082-91. Epub 2011 Dec 28.
7. Mishra AK[1], Skrepnik NV, Edwards SG, Jones GL, Sampson S, Vermillion DA, Ramsey ML, Karli DC, Rettig AC. Efficacy of platelet-rich plasma for chronic tennis elbow: a double-blind, prospective, multicenter, randomized controlled trial of 230 patients. Am J Sports Med. 2014 Feb;42(2):463-71. doi: 10.1177/0363546513494359. Epub 2013 Jul 3.
8. Rodeo SA, Delos D, Williams RJ, Adler RS, Pearle A, Warren RF. The effect of platelet-rich fibrin matrix on rotator cuff tendon healing: a prospective, randomized clinical study. Am J Sports Med. 2012;40:1234–41.
9. Gobbi A, Karnatzikos G, Mahajan V, Malchira S. Platelet-rich plasma treatment in symptomatic patients with knee osteoarthritis: preliminary results in a group of active patients. Sports Health. 2012;4:162–72.
10. Kon E, Buda R, Filardo G, di Martino A, Timoncini A, Cenacchi A, Fornasari PM, Giannini S, Marcacci M. Platelet-rich plasma: intra-articular knee injections produced favorable results on degenerative cartilage lesions. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2010;18:472–9.
11. Sanchez M, Fiz N, Azofra J, Usabiaga J, Aduriz Recalde E, Garcia Gutierrez A, Albillos J, Garate R, Aguirre JJ, Padilla S, Orive G, Anitua E. A randomized clinical trial evaluating plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) versus hyaluronic acid in the short term treatment of symptomatic knee osteoarthritis. Arthroscopy. 2012;28:1070–8.
12. Seijas R, Ares O, Cusco X, Alvarez P, Steinbacher G, Cugat R. Partial anterior cruciate ligament tears treated with intraligamentary plasma rich in growth factors. World J Orthop. 2014;5(3):373-378.

Experiencia Clínica con el Uso de Médula Ósea Concentrada en Ortopedia y Traumatología

Dr. Ignacio Dallo - Unidad de Terapia Regenerativa y Cirugía Artroscópica. Sanatorio Garay, Santa Fe, Argentina. Contacto:info@drignaciodallo.com.ar

En cualquier entorno de bioingeniería, se requieren tres componentes para proporcionar el medio biológico necesario para la regeneración y renovación celular. La presencia de células madre, factores de crecimiento y un andamio biológico son parte integral de este proceso. El aspirado de médula ósea (AMO) se ha utilizado como fuente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (CM-MO) con su relativa facilidad de recolección, baja morbilidad y costo. EL AMO solo tiene un porcentaje relativamente bajo de Células Madre Mesenquimales (CMM) con solo 0.001% a 0.01% de todas las células nucleadas presentes en el AMO. Por lo tanto, el aspirado normalmente se concentra por centrifugación para aumentar la proporción de CMM, por lo tanto, se considera que es mínimamente manipulada. Este proceso concentra las células mononucleadas (glóbulos blancos), CMM, células madre hematopoyéticas (CMH) y plaquetas, en una capa y los glóbulos rojos en otra.

También se ha informado que el AMO contiene niveles elevados de antagonista del receptor de interleucina 1 (IL-1RA) e interleucina 1-beta (IL-1β), factores de crecimiento que tienen funciones críticas en la regeneración a

través de la modulación de la respuesta inmune, en el espacio articular (Fortier et al. 2010, Oliver et al. 2015).

El uso de AMO se ha convertido en una alternativa cada vez más popular debido a que es uno de los pocos enfoques para administrar células progenitoras actualmente aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA).

Es un complemento en el tratamiento de lesiones cartilaginosas, defectos óseos, lesiones tendinosas y ligamentarias.

Diferentes autores han demostrado que el AMO no solo es seguro para su uso en pacientes, sino que también tiene el potencial de mejorar el dolor y el nivel de actividad en pacientes con diversas patologías ortopédicas. Tabla I

Se han presentado resultados alentadores también para pacientes con osteoartritis moderada a severa (OA), demostrando que las inyecciones de AMO mejoraron las puntuaciones de actividad funcional.

La ciencia básica temprana y los estudios clínicos han elucidado los beneficios del AMO para el tratamiento de las patologías ortopédicas tanto en modelos animales como humanos. La evidencia sugiere que las células madre actúan sobre las células locales para estimular la regeneración y la reparación que es específica de cada tejido. Este proceso está mediado por secreciones de las células madre, lo que permite su adaptación en cada entorno y, por lo tanto, proporciona los factores de crecimiento y las citoquinas adecuadas para estimular cada tejido de forma diferente. Los factores de crecimiento presentes en el AMO pueden ser necesarios para la diferenciación del linaje celular, aunque los factores de crecimiento exactos no se han dilucidado completamente hasta el momento. La literatura disponible sobre el uso de AMO en la reparación de diferentes tejidos es altamente heterogénea con respecto a las indicaciones, las concentraciones y los resultados funcionales generales.

Tabla I. Estudios clínicos que utilizan Médula Ósea Concentrada

Authors	Journal	Year	Level of Evidence	Clinical Indication
Buda et al.[15]	*Joints*	2013	IV	Osteochondral defect of talus
Centeno et al.[16]	*Biomedical Research International*	2014	II	Osteoarthritis of knee
Enea et al.[17]	*Knee*	2013	IV	Osteochondral defect of knee
Enea et al.[18]	*Knee*	2015	IV	Osteochondral defect of knee
Flouzat-Lachaniette et al.[19]	*International Orthopaedics*	2016	III	Nonunion of tibia
Gangji et al.[20]	*Bone*	2011	II	Osteonecrosis of femoral head
Giannini et al.[21]	*Clinical Orthopaedics and Related Research*	2009	IV	Osteochondral defect of talus
Gigante et al.[22]	*International Journal of Immunopathology and Pharmacology*	2011	IV	Osteochondral defect of knee
Gobbi et al.[23]	*Cartilage*	2011	IV	Osteochondral defect of knee
Gobbi et al.[24]	*American Journal of Sports Medicine*	2014	IV	Osteochondral defect of knee
Gobbi et al.[25]	*Cartilage*	2015	II	Osteochondral defect of knee
Gobbi and Whyte[7]	*American Journal of Sports Medicine*	2016	II	Osteochondral defect of knee
Gobbi et al.[26]	*Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*	2017	II	Osteochondral defect of knee
Hannon et al.[27]	*Arthroscopy*	2016	III	Osteochondral defect of talus
Hart et al.[28]	*Spine*	2014	I	Spinal fusion
Hendrich et al.[29]	*Orthopaedic Reviews*	2009	IV	Multiple indications
Hernigou et al.[30]	*International Orthopaedics*	2014	IV	Osteointegration of implant
Hernigou et al.[30]	*International Orthopaedics*	2014	III	Acetabular bone defect in revision hip surgery
Hernigou et al.[31]	*International Orthopaedics*	2014	III	Rotator cuff tear
Hernigou and Beaujean[32]	*Clinical Orthopaedics and Related Research*	2002	IV	Osteonecrosis of femoral head
Hernigou et al.[33]	*Journal of Bone & Joint Surgery (America)*	2005	III	Nonunion of tibia
Johnson[34]	*Spine Journal*	2014	II	Spinal fusion
Kennedy and Murawski[35]	*Cartilage*	2011	IV	Osteochondral defect of talus
Kim et al.[36]	*European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology*	2014	IV	Osteoarthritis of knee
Krych et al.[37]	*American Journal of Sports Medicine*	2016	III	Osteochondral defect of knee
Lee et al.[38]	*Clinical Orthopaedics and Related Research*	2014	I	Distraction osteogenesis of tibia
Le Nail et al.[39]	*International Orthopaedics*	2014	IV	Open tibial fracture
Mao et al.[8]	*Bone*	2013	IV	Osteonecrosis of femoral head
Martin et al.[40]	*Croatian Medical Journal*	2013	IV	Osteonecrosis of femoral head
Mishima et al.[41]	*European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology*	2016	IV	Osteonecrosis of femoral head
Murawski and Kennedy[42]	*American Journal of Sports Medicine*	2011	IV	Internal fixation of fifth metatarsal fracture
Odri et al.[43]	*European Spine Journal*	2012	II	Spinal fusion
Pepke et al.[44]	*Orthopaedic Reviews*	2016	II	Osteonecrosis of femoral head
Pettine et al.[45]	*Stem Cells*	2015	II	Discogenic back pain
Pettine et al.[46]	*International Orthopaedics*	2016	II	Discogenic back pain
Rastogi et al.[47]	*Musculoskeletal Surgery*	2013	II	Osteonecrosis of femoral head
Sampson et al.[48]	*Regenerative Medicine*	2016	IV	Osteoarthritis of multiple joints
Scaglione et al.[49]	*Musculoskeletal Surgery*	2014	IV	Nonunion of long bones
Shapiro et al.[9]	*American Journal of Sports Medicine*	2017	II	Osteoarthritis of knee
Skowronski and Rutka[50]	*Ortopedia, Traumatologia, Rehabilitacja*	2013	II	Osteochondral defect of knee
Stein et al.[51]	*International Orthopaedics*	2015	IV	Achilles tendon repair
Sugaya et al.[52]	*European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology*	2014	IV	Nonunion of long bones
Tabatabaee et al.[53]	*Journal of Arthroplasty*	2015	I	Osteonecrosis of femoral head
Torres et al.[54]	*Biomedical Research International*	2014	II	Intertrochanteric hip fracture fixation
Vulcano et al.[55]	*European Review for Medical and Pharmacological Sciences*	2013	IV	Acetabular bone defect in revision hip surgery
Yoshioka et al.[56]	*International Orthopaedics*	2011	IV	Osteonecrosis of femoral head

I.R. Murray et al. Arthroscopy The Journal of Arthroscopic and Related Surgery · January 2018 DOI: 10.1016/j.arthro.2017.11.036

Finalmente, y lo más importante, se necesitan más estudios clínicos para identificar la preparación estandarizada y los protocolos de aplicación para proteger y ayudar a los pacientes.

Referencias

1. Dallo I, Chahla J, Mitchell JJ, Pascual-Garrido C, Feagin JA, LaPrade RF. (2017). Biologic Approaches for the Treatment of Partial Tears of the Anterior Cruciate Ligament: A Current Concepts Review. Orthop J Sports Med. 2017;5(1): 2325967116681724.
2. Dallo I. Aumentación Biológica Intra-Operatoria en Lesiones Parciales del LCA. Serie de Casos, Técnica y Resultados. Revista de la Asociación Argentina de Traumatología del Deporte. Vol. 24; Núm. 1; pp. 50-58.
3. Chahla J., Dean C.S., Moatshe G., Pascual-Garrido C., Serra Cruz R., LaPrade R.F. Concentrated bone marrow aspirate for the treatment of chondral injuries and osteoarthritis of the knee: A systematic review of outcomes. Orthop J Sports Med. 2016;4 2325967115625481. [PMC free article] [PubMed]
4. Hernigou P, Flouzat Lachaniette CH, Delambre J, et al. Biologic augmentation of rotator cuff repair with mesenchymal stem cells during arthroscopy improves healing and prevents further tears: A case-controlled study. Int Orthop 2014;38:1811-1818.
5. Hernigou P, Beaujean F. Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. Clin Orthop Relat Res 2002;(405):14-23.
6. Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, et al. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. J Bone Joint Surg Am 2005;87:1430-1437.
7. Gobbi A, Scotti C, Karnatzikos G, et al. One-step surgery with multipotent stem cells and Hyaluronan-based scaffold for the treatment of full-thickness chondral defects of the knee in patients older than 45 years. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 2017;25:2494-2501.
8. Gobbi A, Karnatzikos G, Scotti C, et al. One-step cartilage repair with bone marrow aspirate concentrated cells and collagen matrix in full-thickness knee cartilage lesions: Results at 2-year follow-up. Cartilage 2011;2:286-299.
9. Gobbi A, Karnatzikos G, Sankineani SR. One-step surgery with multipotent stem cells for the treatment of large full-thickness chondral defects of the knee. Am J Sports Med 2014;42:648-657.
10. Gobbi A, Chaurasia S, Karnatzikos G, et al. Matrix- induced autologous chondrocyte implantation versus multipotent stem cells for the treatment of large patello-femoral chondral lesions: A nonrandomized prospective trial. Cartilage 2015;6:82-97.
11. Centeno C, Pitts J, Al-Sayegh H, et al. Efficacy of autologous bone marrow concentrate for knee osteoarthritis with and without adipose graft. Biomed Res Int 2014;2014: 370621.
12. Murray IR, Corselli M, Petrigliano FA, et al. Recent in-sights into the identity of mesenchymal stem cells: Implications for orthopaedic applications. J Bone Joint Br 2014;96:291-298.
13. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. J Orthop Res 1991;9: 641-650.
14. LaPrade RF, Dragoo JL, Koh JL, et al. AAOS research symposium updates and consensus: Biologic treatment of orthopaedic injuries. J Am Acad Orthop Surg 2016;24: e62-e78.