

Presença de fatores de crescimento em saliva humana e possíveis relações com observações clínicas

The presence of growth factors in human saliva and possible relations with clinical observations

Luiza A. Faria Ferreira * e Wilma Alexandre Simões**

RESUMO

A saliva e o plano oclusal humanos apresentam significativas mudanças durante o período prépuberal e puberal. Amostras de saliva foram coletadas de 30 indivíduos, ambos os sexos, entre 11 e 16 anos. Os resultados demonstraram a incidência de maior proliferação celular nas meninas entre 11 e 13 anos e nos meninos de 14 a 16 anos. Há alguma evidência de que esta ocorrência coincida com uma constelação de características clínicas indicativas do processo de crescimento.

ABSTRACT

There are significant changes on the human saliva and the occlusal plane during the prepubertal and pubertal period. Saliva samples were collected from 30 subjects, both sexes, between 11 and 16 years old. The results show a major incidence of cells proliferations in girls, between 11-13 years, and boys from 14 to 16 years. There is some evidence that this occurrence coincides with a constellation of clinical features indicative of the growth process.

UNITERMOS

Saliva - Plano Oclusal - Período prépuberal e puberal.

KEYWORDS

Saliva - Occlusal plane - Prepubertal / pubertal period.

Introdução

O peptídeo "Fator de Crescimento" é um elemento do complexo da linguagem biológica, sendo a base para a comunicação intercelular em organismos multicelulares. Esses fatores promovem o crescimento das células mas, também podem inibi-lo. Por outro lado, regulam funções celulares tais como, o controle de diferenciação celular e a regulação metabólica. Essas substâncias são sintetizadas numa grande variedade de células e atuam em muitos tecidos.

Inicialmente, o fator de crescimento foi identificado como uma substância mitogênica denominada "Epidermal Growth Factor" (EGF). Essa mesma substância foi reconhecida, também, com potente atividade antimitogênica em células de folículo capilar¹⁵.

Apesar do EGF ter sido isolado e purificado pela sua habilidade de causar erupção prematura de incisivo em camundongos, foi demonstrado recentemente que dentes de camundongos recém-nascidos tratados com EGF são anormalmente pequenos²⁴ e ainda há evidências de que esse fator esteja presente na glândula salivar submaxilar de ratos adultos e ductos da glândula submandibular em humano⁸. Além disso, ainda no homem o EGF é encontrado no folículo dental de pré-molares, células do mesenquima apical e vasos sanguíneos entre outras estruturas como por exemplo, nas glândulas mamárias durante

a embriogênese e a gravidez²⁸.

Estes fatores são altamente semelhantes aos polipeptídios hormonais quanto às suas funções em tecido e usam mecanismos de transporte não sistêmicos. Esta semelhança exige receptores na superfície das células e efeitos na expressão gênica.

Desta forma, esse grupo de substâncias faz parte do sistema endócrino, mesmo sendo pertencente a um grupo separado de Polipeptídeos do Fator de Crescimento.

O objetivo deste trabalho é comprovar a presença do fator de crescimento induzindo a proliferação celular (celular A-31) na saliva humana em indivíduos de ambos os sexos de 11 a 16 anos.

Foi demonstrado clínica e experimentalmente²⁰⁻²³ que nessa época ocorre uma modulação nítida do plano oclusal, isto é, existe uma distância variável entre a linha oclusal superior e a inferior de acordo com a idade e diferente, segundo o sexo.

A variação do nível de hormônios afeta a velocidade de renovação do osso alveolar e do crescimento da cartilagem condilar influenciando ainda o coxim retromeniscal, a atividade muscular¹⁰⁻¹²⁻¹⁶⁻¹⁷⁻²⁵⁻²⁶ e também a velocidade da erupção²⁴. Esse conjunto de eventos endocrinológicos, entre outros, poderiam coincidentemente ou não, afetar a composição salivar. Daí o interesse em observar se há uma relação entre as alterações do plano oclusal e a saliva.

Materiais

Saliva humana (10ml), foi coletada diretamente e dividida em 4 grupos segundo a idade 11-13 e 14-16 anos e sexo, feminino (14 indivíduos) e masculino (16 indivíduos). O material foi colocado, imediatamente, em geladeira a 5° C. Células A-31 (Balb-c/3T3) foram presente da Dra. Mari C. Armelin do Departamento de Bioquímica da Universidade de São Paulo (USP). Chicken egg albumin e DME foram importados da Sigma Co. (St. Louis, MO, U.S.A.) 3Htdr foi importada da Amersham (Arlington Heights U.S.A.). FCS foi importado da Biosys S.A. outros reagentes foram da Merck Darmstadt, F.R.G.

Metodologia

Preparação das células e ensaio proliferativo

A preparação das células e o ensaio de proliferação foram descritos de acordo com os métodos de Armelin¹ e Todaro & Gree²⁹.

Primeiro dia - As células A-31²⁹, permaneceram em meio de cultura contendo FCS 5% (1ml) e DME em 2.0 x 10⁴ células por "well".

Segundo dia - As células foram lavadas

* Bioquímica - Laboratório de Bioquímica e Biofísica - Instituto Butantan - São Paulo - Brasil.

** Professora "Honoris Causa" - Universidade Camilo Castelo Branco - São Paulo - Brasil

com PBS (1.5 ml) e FCS 0.5% numa concentração final de 200 ulpor "well".

Terceiro dia - 20 ul de saliva humana (centrifugada a 5° C por 30 min usando uma centrífuga refrigerada modelo Spin VII iofilizada e dissolvida em solução salina 0,9% de NaCl) e 20 ul de 3Htdr foram adicionados na cultura das células.

Quarto dia - As células foram coletadas e a sua proliferação foi medida após lavagem com TCA 5% gelado e adição de NaOH 1 N (200 ul) e incubadas a 48° C por 30 minutos. Após este tempo, os filtros numerados (1 x 1,5 cm) contendo as células foram colocados para secagem com líquido cintilante e vermelho e a leitura foi realizada usando um aparelho cintilador modelo Beckman.

Determinação da proteína

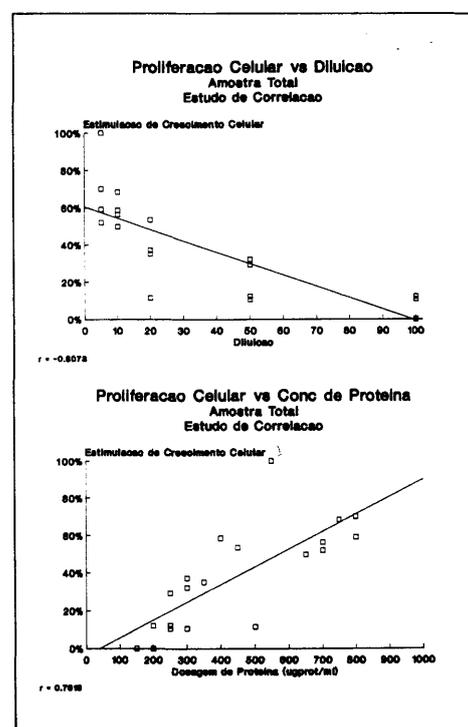
A proteína foi determinada pelo Método de Reação de Biureto⁶.

Abreviações

- FCS - Soro fetal de bezerro
- DME - meio de cultura Dulbecco
- PBS - salina fosfato tamponada contendo CA⁺⁺ e Mg⁺⁺
- 3Htdr - timidina tritiada
- CPM - contagem por minuto

Proliferação Celular de acordo com a Diluição

Proliferação Celular e diluição da concentração de proteína da saliva têm uma relação inversa, como mostra a Figura 1. O coeficiente de correlação de Pearson negativo ($r = -0.8073$) mede o grau de correlação entre estas duas variáveis.



Os gráficos na Figura 2 A à D mostram o comportamento da porcentagem de proliferação celular conforme as cinco diluições (5x, 10x, 20x, 50x, 100x) para os quatro grupos estudados dois a dois. A porcentagem significativa para proliferação celular foi dada a partir de 70%, considerando-se fatores tais como, a saliva bruta e a sensibilidade de proliferação das células. Fica assim claro que no sexo feminino as mais velhas (14-16 anos); têm maior porcentagem de proliferação celular que as mais novas sob a diluição 5x. Esta condição, porém, se equivale nas próximas duas diluições (10x e 20x) e se inverte nas diluições maiores (50x e 100x), onde as meninas de 11 a 13 anos têm porcentagem de proliferação celular maior que as de 14 a 16 anos. Entre os meninos, a porcentagem de proliferação celular do grupo de 14 a 16 anos é maior que a do grupo de 11 a 13 anos em todas as diluições estudadas.

Entre os mais novos (11 - 13 anos), as meninas têm maior porcentagem de proliferação celular na saliva que os meninos em todas as diluições. No grupo de 14 a 16 anos, as meninas têm maior porcentagem de proliferação celular, significativa, sob a diluição de 5x; nas demais diluições, a curva de porcentagem de proliferação celular dos meninos é maior entre 10x e 50x e se equivale entre 50x e 100x.

A figura 3 mostra o gráfico das curvas dos quatro grupos estudadas simultaneamente. Na diluição de 5x, o grupo de meninas de 14 a 16 anos tem 100% de proliferação celular na saliva; a segunda maior porcentagem de proliferação celular é do grupo de meninos de 14 a 16 anos, seguido do grupo de meninas de 11 a 13 anos e, por último, o de meninos de 11 a 13 anos. Em resumo; para a menor diluição estudada (5x), o sexo feminino tem porcentagem de proliferação maior que o masculino e os mais velhos (14-16) têm porcentagem de proliferação celular maior que os mais novos (11-13 anos).

Para as diluições 10x e 20x, os grupos feminino e masculino de 14 a 16 anos invertem as ordens, isto é, nesta faixa etária, a porcentagem de proliferação celular de meninos passa a ser maior que a de meninas.

Sob diluições maiores (50x e 100x), meninos mais velhos e meninas mais novas têm porcentagens de proliferação celular muito parecidas e maiores que meninos mais novos e meninas mais velhas, que também têm porcentagem de proliferação celular parecidas entre si.

A tabela 1 ilustra as quatro curvas de uma forma global. Note-se que, apesar do grupo feminino de 14 a 16 anos ter porcentagem máxima (100%) de proliferação celular na saliva na diluição de 5x, o grupo masculino de 14 a 16 anos (que tem a segunda maior porcentagem de proliferação celular nesta diluição) é que tem porcentagem de proliferação

celular maior que todos os outros nas demais diluições. Já o grupo feminino de 14 a 16 anos decresce mais rapidamente que os demais, disputando o segundo e o terceiro lugar com o grupo feminino de 11 a 13 anos a partir da diluição de 10x. O grupo masculino de 11 a 13 anos teve menor porcentagem de proliferação celular que os demais em todas as diluições estudadas.

Na Figura 3 nota-se também que os únicos grupos que atingem uma % de estimulação de crescimento celular acima de 65% são os de 14 a 16 anos (meninas na diluição 5x e meninas nas diluições 5x e 10x).

As diluições da concentração de proteína de cada amostra de saliva (1, 2, 3, e 4), com solução salina (0.9% de NaCl), foram realizadas para mostrar os efeitos na proliferação celular, os quais dependem da concentração de proteína da saliva.

TABELA 1
Comparação entre a porcentagem de proliferação celular dos quatro grupos quanto à sua colocação em cada uma das cinco diluições estudadas.

GRUPO	5X	10X	20X	50X	100X
Feminino 14-16 anos	1°	2°	3°	3°	3°
Masculino 14-16 anos	2°	1°	1°	1°	1°
Feminino 11-13 anos	3°	3°	2°	2°	2°
Masculino 11-13 anos	4°	4°	4°	4°	4°

Proliferação Celular de acordo com a Concentração de proteína

O comportamento dos grupos quanto à proliferação celular de acordo com a concentração de proteína é similar ao do item anterior (diluição), a única diferença é que com a concentração de proteína, a relação não é inversa, mas sim direta. Neste caso, quanto maior a concentração de proteína, maior a proliferação celular, como indica o coeficiente de correlação de Pearson positivo de 0.7616 (Figura 1).

As meninas de 14 a 16 anos têm porcentagem de proliferação celular maior do que as de 11 a 13 anos, para concentrações de proteína acima de 400 µg/ml. Os meninos de 14 a 16 anos têm porcentagens de proliferação celular maior que os de 11-13 anos para todos os níveis de concentração de proteína entre os indivíduos mais novos (11-13 anos), as meninas têm porcentagem de proliferação celular maior que os meninos para todos os níveis de concentração de proteína; este comportamento se repete nos mais velhos (14 a 16 anos) apenas para concentrações de proteína acima de 350 µg/ml (Figura 4A à D).

Na Figura 5, podemos estudar o comportamento das curvas de porcentagem de proliferação celular de acordo com a concentração de proteína dos quatro grupos simultaneamente. Nota-se que a partir de concentrações de proteína acima de 350 µg/ml, os grupos têm o seguinte comportamento: meninas de 14 a 16 anos têm maior porcentagem de proliferação celular, meninos de 14 a 16 anos têm a segunda porcentagem de proliferação celular,

seguidos de meninas de 11 a 13 anos e por último, meninos de 11 a 13 anos. Em resumo, meninas têm porcentagem de proliferação celular maior que meninos e os grupos com idade maior (14-16 anos) têm porcentagem de proliferação celular maior.

Considerações finais e aspectos clínicos

A saliva de 30 indivíduos no períodos pré-puberal e puberal foi dividida em quatro grupos: 8 meninas de 11 a 13 anos; 6 meninas de 14 a 16 anos; 9 meninos de 11 a 13 anos e 7 meninos de 14 a 16 anos. A saliva de cada indivíduo foi misturada num único tubo de acordo com cada grupo. Por isso apenas a proliferação celular total foi medida e não a de cada indivíduo. Isso nos impossibilita fazer inferência estatística, uma vez que não temos repetições. Por outro lado, os resultados da saliva de dois indivíduos, 25 e 45 anos, acima das faixas etárias estudadas, foram negativos para a presença de Fator de crescimento (resultado não mostrado). Isto poderia confirmar os dados encontrados nos grupos referidos acima, uma vez que foram obtidos individualmente e com repetições. Assim sendo, os resultados obtidos a partir deste estudo piloto devem ser entendidos como base para outra investigação que já foi iniciada. Cada tubo de saliva foi estudado para cinco diluições: 5x, 10x, 20x, 50x e 100x; em cada diluição foi medida a concentração de proteína em ug/ml. Todos os dados encontram-se na Tabela 2.

Além da idade cronológica são consideradas entre outras a estatural, vertebral,

esquelética e dental. Todas elas são dependentes da ação hormonal e apresentam determinados padrões cronobiológicos^{3,9,13,27}.

O pico de velocidade de crescimento estatural (PHV) atinge, aproximadamente, os meninos aos 14 anos e as meninas aos 12. A idade vertebral acompanha a estatural^{14,27}.

A erupção dentária e o crescimento tanto da maxila, quanto da mandíbula não são uniformes.^{2,4,5,16,18,25,27} e o fenômeno rotacional é a adaptação compensatória que no maxilar inferior, além de morfológico é posicional.¹⁰

O crescimento da cartilagem condilar sobre aceleração a partir de 11 anos nas meninas e 13 anos nos meninos. Em consequência, há uma afastamento dos maxilares entre si. A distância interoclusal criada é ocupada pelos dentes durante a segunda fase da erupção ativa (14-18 anos ambos os sexos)^{4,27}. Este é um período de grandes e rápidas mudanças^{22,23}. Durante esta fase os dentes se movem dois a três milímetros medidos entre seus ápices e o canal dentário inferior⁴. A distância interoclusal medida entre fossa/cúspide é discreta, se o crescimento é harmonioso, e evidente, se fásico. Ela é mais visível em pacientes em tratamento com aparelhos ortopédicos funcionais, segundo o tipo de maloclusão e, é diferente de acordo com o dente considerado. A modulação do plano oclusal também é diferente de acordo com a idade, em ambos os sexos^{20,23}. O número de contactos dentários em posição de máxima intercuspidação aumentam consideravelmente tanto nos meninos quanto nas meninas, entre os 14-15 anos até os 16-17 anos^{20,22}.

Finalmente, no período de desaceleração da velocidade de crescimento estatural ocorre

a mudança de voz pré-puberal, que se apresenta aproximadamente no pico, para voz adulta nos meninos⁹ e a menarca^{9,14,27}. Nas meninas o período de amadurecimento de ovulação e do corpo lúteo termina 6 a 9 meses depois da menarca⁷ e, as descargas irregulares ("spiking phenomenon") de progesterona na saliva, que aconteciam desde antes da menarca, 11 anos, na maior parte das vezes terminam aos 14 anos de maneira progressiva¹⁹.

Pode-se admitir então que nas meninas prevaleça a incidência de proliferação celular entre 11 e 13 anos quando ocorre o aumento de velocidade de crescimento da cartilagem condilar (a partir dos 11 anos), o pico de velocidade de crescimento (em geral aos 12 anos) e a menarca. Nos meninos, na mesma idade não acontecem fenômenos tão marcantes; ao contrário, a velocidade mínima de crescimento estatural se dá nesse período o que coincide com o demonstrado nas curvas correspondentes. Figura 2C e 4C.

Outros fenômenos importantes do ritmo biológico estão presentes entre os 14 e 16 anos, em ambos os sexos; por isso os indivíduos mais velhos apresentam maior proliferação celular. Entretanto, embora nessas idades ocorra a segunda fase de erupção ativa e aumentem os pontos de intercuspidação máxima, tanto nas meninas, quanto nos meninos, estes, além disso, atingem o pico de velocidade estatural (ao redor dos 14 anos) e ocupam posição mais alta, na curva descendente de desaceleração. Provavelmente, daí a diferença de proliferação celular segundo o sexo, nesse período. Figuras 2D e 4D.

Deve-se notar ainda, o comportamento semelhante das curvas das meninas de 11-13 anos e, dos meninos de 14-16. É possível que ele seja o reflexo da intensidade dos marcantes eventos neuroendocrinológicos dessa época. Figuras 3 e 5. O mesmo reflexo se nota nas distâncias interocclusais, as quais, atingem respectivamente, seus maiores valores^{21,23}.

Este estudo sugere que a saliva humana pode ser um outro indicador específico de maturidade útil para a avaliação clínica de pacientes tratados durante o período pré-puberal e puberal.

Agradecimentos

A Dra. Mari C. Armelin, do Departamento de Bioquímica da Universidade de São Paulo, por ceder as células A-31 (Balb-c/3T3)

Ao Dr. José Ernesto Belisário, Ph.D., do Departamento de Biologia Celular e Imunologia do Instituto Butantan, por sua revisão, e ao Dr. Dalto Humberto Cardoso por seu apoio.

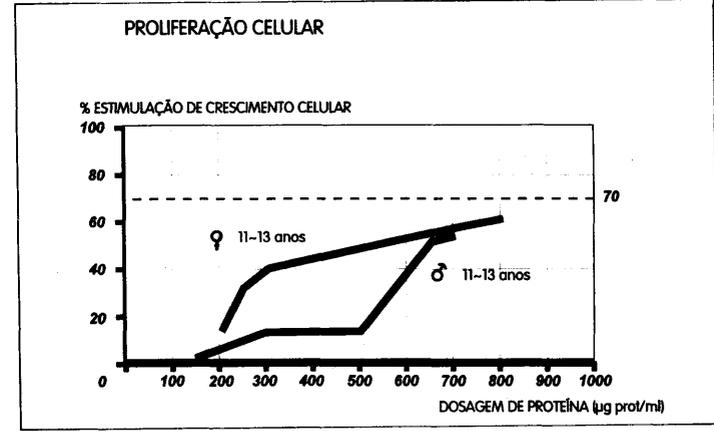
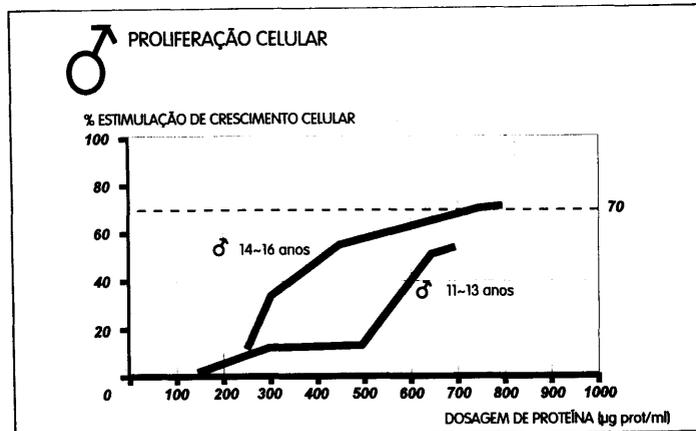
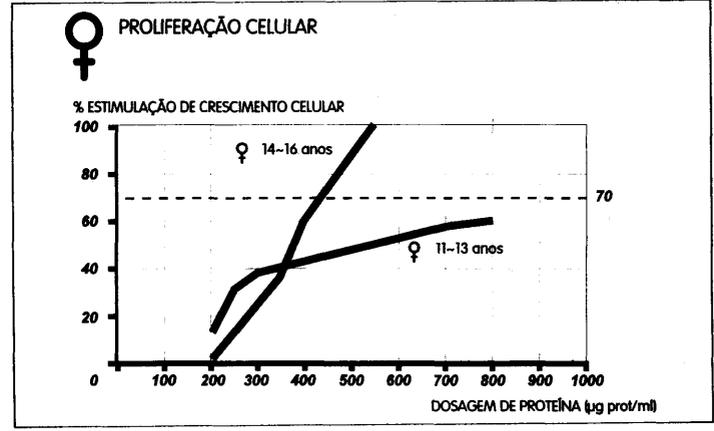
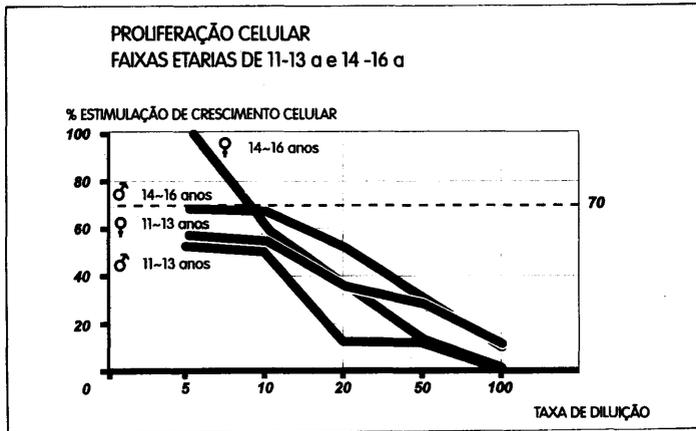
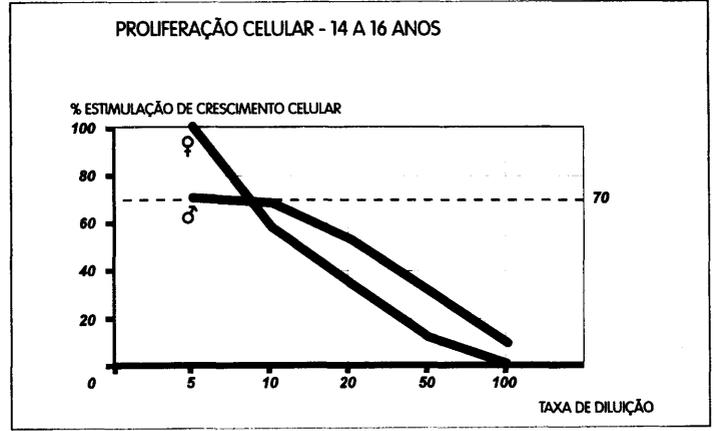
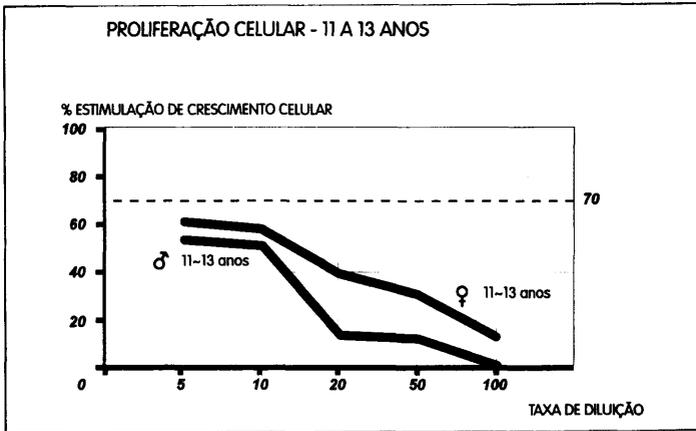
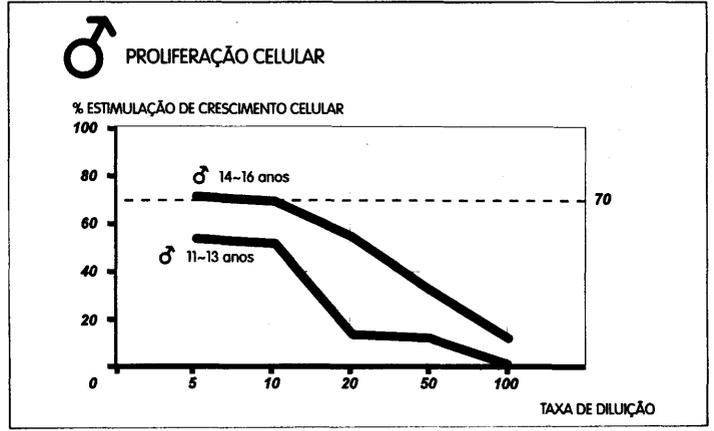
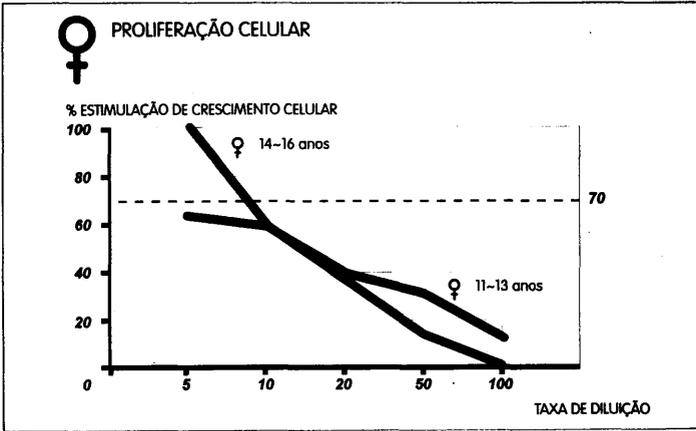
Correspondência para os autores:

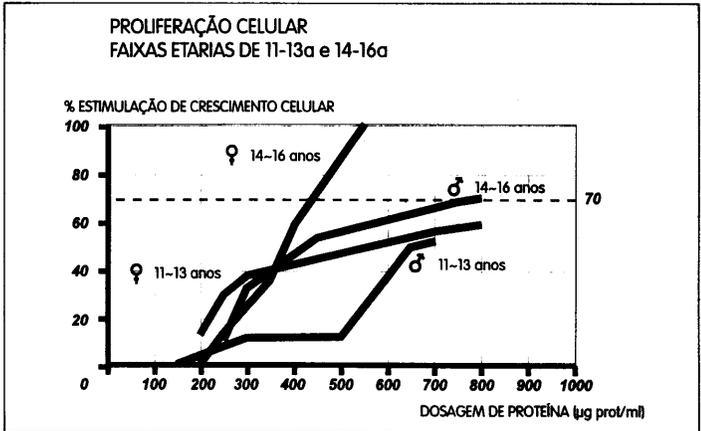
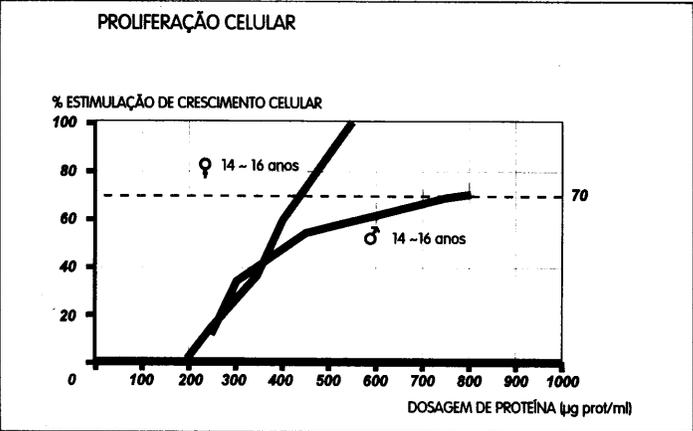
Luiza A. Faria Ferreira Instituto Butantan - Lab. Bioquímica e Biofísica Av. Vital Brasil, 1500 05503-900 - SP - Brasil

Wilma Alexandre Simões Av. Brigadeiro F. Lima, 613 Conj. 51 CEP 01451-000 - SP Brasil

TABELA 2
Descrição dos dados

GRUPO	TAXA DE DILUIÇÃO	CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA	ESTIMULAÇÃO DE CRESC. CELULAR
Feminino 11-13 anos	5x	800	59,01%
	10x	700	56,30%
	20x	300	37,12%
	50x	250	29,31%
	100x	200	12,00%
Feminino 14-16 anos	5x	550	100,00
	10x	400	58,50%
	20x	350	35,00%
	100x	250	29,31%
	50x	250	12,25%
Masculino 11-13 anos	5x	700	52,00%
	10x	650	49,70%
	20x	500	11,40%
	50x	300	10,50%
	100x	150	0,00%
Masculino 14-16 anos	5x	800	70,00%
	10x	750	68,40%
	20x	450	53,40%
	100x	300	32,10%
	50x	200	10,50%





Referências Bibliográficas

1. ARMELIN H. A. - Pituitary extract and steroid hormones in the control of 3T₃ cell growth. Proc Nat Acad Sci. USA. 70:2702 - 2706, 1973.
2. BERKOWITZ, B.K.B. - Mechanism of tooth eruption. In: Applied Physiology of the mouth. C.L.B. Lavelle Bristol, Ed John Wright and Sons Ltd. pp 99-123, 1975.
3. CIPOLLA-NETO, J. & MARQUES, N. & MENNA-BARRETO, L. S. - Cronobiologia. S. Paulo, Ed. Icone. pp 15-23, 1988.
4. DARLING, A. I. & LEVERS, B. G. H. - The pattern of eruption. In: The eruption and occlusion of teeth. Ed. D. F. G. Poole and M. V. Stack. Londo. Butterworths pp 80-97, 1976.
5. DIBBETS, J. M. H. et al. - Shape change in the mandible during adolescence. In: D. Carlson and K. A. Ribbens. Craniofacial growth during adolescence. Michigan. Craniofacial growth series. Monograph 20. pp 23-30, 1987.
6. GORNALL, A. C. & BARDAWILL, C. J. & DAVID, M. M. - Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. J. Biol Chem 177:751-766, 1949.
7. GRIFFIN, J. F. & OJEDA, S. R. - Textbook of endocrine physiology. Oxford, Univ Press. p 150, 1988.
8. GULLICK, W.J. & WATERFIELD, M. D. - Epidermal growth factor and its receptor. In: The molecular biology of receptors. Ed A. D. Strosberg. England, Ellis Horwood Ltd. 15-34, 1987.
9. HAGG, U. & TARANGER, J. - Maturation indicators and the pubertal growth spurt. Am J. Orth 82:299-309, 1982.
10. LAVERGNE, J. & GASSON, N. - Operational definitions of mandibular morphogenetic and positional rotations. Scand J. Dent Res 85:185-192, 1977.
11. LAVERGNE, J. & GASSON, N. - The influence of jaw rotation in the morphogenesis of malocclusions. Am J Orth 73:658-666, 1978.
12. LAVERGNE, J. & PETROVIC, A. - Discontinuities in occlusal relationship and the regulation of facial growth. A cybernetic view. European J Orthod 5: 269-278, 1983.
13. NANDA, S. K. - The development basis of occlusion and malocclusion. Chicago, Quintessence. pp 52-59, 1983.
14. NANDA, S. K. - Prediction of facial growth using different biologic criteria in females. In: D. Carlson and K. A. Ribbens - Craniofacial growth during adolescence. Michigan. Craniofacial growth series. Monograph 20, pp 135-205, 1987.
15. PANARETTO, B. A. & LEISH, Z. & MOORE, G. P. M. & ROBERTSON, D. M. - Inhibition of DNA synthesis in dermal tissue of Merino sheep treated with depilatory doses of mouse epidermal growth facto. J Endocrinol 100: 25-31, 1984.
16. PETROVIC, A. & STUTZMANN, J. & OUDET, C. L. - Control process de jeune rat in the postnatal growth on the condylar cartilage of the mandible. In: Determinants of mandibular form and growth. Ed J Mc Namara. Michigan, pp 101-153, 1975.
17. PETROVIC, A. & LAVERGNE, J. & STUTZMANN, J. - Diagnostic et traitement en orthopédie dento-faciale: principes et diagramme de décision. L'Ort Fr 58:517-542, 1987.
18. PROFFIT, W. - The control of tooth eruption. J J Orth Soc 51:26-36, 1992.
19. RIAD-FAHMY, D. - Salivary progesterone for investigating ovarian activity. In: Steroid hormones in saliva. Y. Kawamura and D. B. Ferguson - Frontiers of Oral Physiology vol 5. pp110-123, Karger-Basel, 1984.
20. SIMÕES, W. A. - Ortopedia Funcional de los maxilares vista atraves de la rehabilitación neuro-oclusal. Tomo II, Venezuela. Ed Isaro. pp III, 244-246, 1989.
21. SIMÕES, W. A. - Occlusal Plane: an up-to-date approach. J J Orth Soc 51: 320,1992.
22. SIMÕES, W. A. - Occlusal Plane: a clinical evaluation. The Journal of Clinical Pediatric Dentistry. 19 (2), 75-81, 1995.
23. SIMÕES, W. A. - Modulation of occlusal plane during puberty. The Journal of Clinical Pediatric Dentistry. No prelo, 1985.
24. SPORN, M. B. & ROBERTS A. B. - In: The Multifunctional Nature of Peptide Growth Factos. Handbook Experimental Pharmacology: Peptide Growth Factors their receptors I. vol 95/1. pp 3-14. Spors, M. B and Roberts, A. B Ed. Berlin, Springer-Verlan, Heidelberg, 1990.
25. STUTZMANN, J & PETROVIC, A. - Effects de la resection du muscle pterygoid externe sur la croissance de cartilage condylien. Bull de L' Assoc des Anatom 58 (163): 1107-1114, 1974.
26. STUTZMANN, J. & PETROVIC, A. - Role of the lateral pterygoid muscle and meniscotemporomandibular frenum in spontaneous growth of the mandible and in growth stimulated by the postural hyperpropulsor. Am J Orth and Dentof Orthop 97 (5): 381-392, 1990.
27. TANNER, J. M. - Growth at adolescence. 2nd ed Oxford, Blackwell Scientific Pub. p 13, 1962.
28. THESLEFF, I. & PARTANEN, ANNA-MAIJA & RIHTNIEM, L. - Localization of EGF receptors in mouse incisors and human premolars during eruption. European J Orthod.9:24-32, 1987.
29. TODARO, G. J. & GREEN, H. - Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into stablished lines. J Cell Biology. Vol 17: 299-313, 1963.