

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO**

**INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA
ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES**

**BIOPSIA DE VELLOSIDADES CORIONICAS:
EXPERIENCIA EN EL INSTITUTO NACIONAL
DE PERINATOLOGIA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
ESPECIALISTA EN MEDICINA MATERNO-FETAL**

PRESENTA

DR: HERIBERTO RODRIGUEZ GUDIEL

PROFESOR TITULAR DEL CURSO Y TUTOR

DR. MARIO ESTANISLAO GUZMAN HUERTA

MEXICO DF

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AUTORIZACIÓN DE TESIS

**BIOPSIA DE VELLOSIDADES CORIONICAS: EXPERIENCIA EN EL INSTITUO NACIONAL
DE PERINATOLOGIA**

**DR. RICARDO GARCIA CAVAZOS
DIRECTOR DE ENSEÑANZA**

**DR. MARIO ESTANISLAO GUZMAN HUERTA
PROFESOR TITULAR DEL CURSO Y TUTOR DE TESIS**

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por todo el apoyo que me han brindado en el transcurso de mi vida y siempre han creído en todas los proyectos que he emprendido, por que con su ejemplo me han dado el impulso mas grande que he requerido siempre para alcanzar la superación en cada una de las etapas de la vida.

A mis hermanos que me dieron la oportunidad de culminar mis estudios al poder depositar en ellos la confianza para cuidar de mis padres.

A mis amigos; Elmer y Delia que fueron parte fundamental y determinante para poder decidir dejar atrás todas las dudas respecto a cursar una subespecialidad ya que con sus consejos y ejemplo pude comprender que si podía intentar y era capaz de alcanzar una meta mas en mi vida.

A todas aquellas personas que de una u otra forma influyeron positivamente y creyeron en mí, y en especial a aquellas personas que siempre me dijeron que no podría lograrlo pues esto me permitió demostrar que estaban equivocadas.

A mis compañeros; Flores, Feria, Calvo, Zúñiga, Sauer, y López, por compartir muchos momentos y experiencias inolvidables.

A mis maestros Dr. Guzmán, Dra. Velásquez, Dra. Acevedo, Dr. Gallardo, Dr. Cavazos, y Dr. Hernández Por su paciencia, tolerancia y dedicación en tratar que pudiera comprender un poco de toda su inmensidad de conocimientos en el área de la investigación, Medicina Obstétrica y Materno Fetal.

“JEHOVA ES MI PASTOR NADA ME FALTARA...”

INDICE

INTRODUCCION	4
JUSTIFICACION	9
OBJETIVOS	9
DISEÑO DEL ESTUDIO	10
UNIVERSO DE ESTUDIO	10
CRITERIOS DE SELECCIÓN	11
ANALISIS ESTADISTICO	11
ASPECTOS ETICOS	11
RESULTADOS	12
DISCUSION	18
BIBLIOGRAFIA	22
ANEXOS	24

BIOPSIA DE VELLOSIDADES CORIONICAS: EXPERIENCIA EN EL INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA

ANTECEDENTES

La principal indicación de los procedimientos de diagnóstico prenatal invasivo es la detección de alteraciones cromosómicas fetales, los métodos de selección de las pacientes con mayor riesgo de presentar fetos con alteraciones cromosómicas se basaron por mucho tiempo en la edad materna y los hallazgos ultrasonográficos.

Inicialmente por razones principalmente económicas el punto de corte fueron los 35 años de edad (que correspondía al 5% de las embarazadas a las que se sometían a procedimientos invasivos de diagnóstico prenatal). Actualmente se sabe que un 70% de los casos de síndrome de Down ocurren en el grupo de edad de menor de 35 años, por lo que se debe individualizar el riesgo para cada paciente. Si a este se le suma el antecedente de hijos con cromosomopatía, específicamente trisomía 21, que en este caso el riesgo de recurrencia es de 0.75% mayor obtenemos lo que conocemos como riesgo basal.

Por lo anterior y sabiendo que no se puede realizar en forma general los métodos invasivos al total de la población Nicolaidis¹ introdujo a partir de 1990 la Translucencia Nucal (TN) de las 11 – 13.6 semanas de gestación como un método de tamiz para tratar de identificar aquellas pacientes con un riesgo mayor de presentar alteraciones cromosómicas, detectando en combinación con la edad materna hasta un 75% de los fetos afectados, con una tasa de falsos positivos de 5%, posteriormente se desarrollo la combinación de la edad materna, con la TN y la pruebas séricas maternas de la fracción beta de la gonadotropina coriónica, más la proteína plasmática A asociada al embarazo (PAPP-A), logrando identificar el 85- 90% de los fetos afectados con la obtención del resultado de los mismos a los 30 minutos de la toma de la muestra sanguínea lo que ha permitido el desarrollo de lo que se conoce como One-Stop Clinics For Assesment Of Risk, OSCAR.

En el 2001 se reporta la combinación de la edad materna, la TN, B- hGc libre y la PAPP-A en combinación con la medición del hueso nasal (HN) lo que llevo a obtener un porcentaje de detección de fetos afectados de un 95% con un porcentaje de falsos positivos de 5 %. Con estos resultados el médico puede dar a los padres mejor asesoramiento genético y ofrecer de manera informada las técnicas de estudio invasivo que permitirán obtener un diagnóstico definitivo.

Desde finales de 1960 Hehnenmen et al². Comenzaron a realizar la biopsia de vellosidades coriónicas con un endoscopio modificado, pero el gran riesgo que implicaba la técnica y las dificultades de laboratorio, propiciaron que cayera en desuso. Posteriormente, Mohr³ intentó extraer por vía cervical un fragmento de corion con un endoscopio adaptado pero debido a la falta de visibilidad adecuada se les dificultó la obtención de la muestra y a pesar de ello lograron obtener biopsias satisfactorias y se logró identificar un cariotipo

Ya en 1975 Arshan y cols². en China, introdujeron una cánula roma metálica por el orificio cervical y le introdujeron un tubo interno de 0.5 a 1 cm. después de alcanzar un punto suave de resistencia, aplicaban la aspiración con jeringa para obtener tejido de la placenta. Identificando en el 93% de los casos el sexo fetal por observación de la cromatina, no se realizó cultivo tisular. Esta fue realizada de 6- 14 semanas gestacionales con una incidencia de abortos de 4%.

Un estudio contemporáneo fue el de Rhine y cols². Quienes utilizaron una técnica diferente mediante el lavado de la porción endocervical en solución salina y la aspiración del tejido trofoblástico fetal supuestamente que se descamaba y que se encontraba ubicado en la porción superior del tapón mucoso, se practicó cultivo tisular en mas del 50% de las 76 muestras obtenidas pero no demostró cariotipos masculinos.

Ya en 1980 Golberg y cols⁴. Repitieron el estudio de Rhine y de 12 embarazos pudieron demostrar 3 cariotipos masculinos.

En la antigua Unión Soviética Kazy fue el primero en reportar las biopsias con pinzas bajo la orientación por ultrasonido, sin complicaciones graves³.

Ward, RH y cols., en el University College Hospital de Londres mejorando el endoscopio de Mohr introdujeron por el cervix bajo guía por ultrasonido una sonda de 1.5 mm de polietileno para la obtención de tejido dentro de un obturador maleable de acero inoxidable, y aspirado para obtener vellosidades alcanzando un 67% de resultados favorables y realizando estudios de hemoglobinopatias².

Bruno Brambati⁵ en esa fecha en la Universidad de Milán comparó las cuatro técnicas disponibles y demostró que la orientación por ultrasonido mejoraba el índice de obtención de buenas muestras tisulares del 65 al 96% obteniendo hasta un 80% de material de calidad para estudio. En ese entonces G. Simoni⁵ creó el proceso de preparación directa y rápida de las vellosidades con fines de identificación de cariotipos, mediante la técnica de aprovechar las mitosis espontáneas de las células en división y su proliferación rápida sin necesidad de cultivo tisular.

A partir de 1983 este grupo señala el primer diagnóstico de síndrome de Down por estudios cromosómicos directos en vellosidades coriónicas unas horas después de obtenida la muestra a las 12 semanas de gestación.

La vía de abordaje que se utilizó inicialmente fue la vía transcervical pero posteriormente se adopto la transabdominal reportando Brambati en su ultima publicación en junio del 2005, tasas de éxito con muestra adecuada para estudio de un 98 a 99%^{9,10}.(La técnica se describe ampliamente en anexo 2)

INDICACIONES

La biopsia de vellosidades coriales en el primer trimestre del embarazo se utiliza para el diagnóstico de posibles trastornos metabólicos, cromosómicos⁹,

génicos, que pueden causar daños severos al feto. Además en casos de obtener resultados de mosaico placentario confinado nos aporta información muy útil ya que esta placenta tiene el riesgo de no funcionar en forma adecuada y llevar al feto a un retraso del crecimiento intrauterino temprano y severo, por lo que esto puede brindarnos la pauta para planear un control de embarazo adecuado para la paciente.

COMPLICACIONES

La biopsia de vellosidades se realiza usualmente entre las 11 – 14 semanas de gestación, con resultados y complicaciones similares del procedimiento en ambas vías de abordaje (tanto transcervical como abdominal) en personal experimentado¹⁰. Cuando se compara con estudios de amniocentesis en el segundo trimestre Brambati y cols¹¹ reportan en una revisión de complicaciones realizadas en diferentes estudios sangrado, pérdida de líquido amniótico, corioamnionitis, muerte materna, trauma fetal, hemorragia feto materna, parto pretérmino, distress respiratorio neonatal, neumonía neonatal y se resumen en la tabla 1. Los riesgos asociados a pérdida gestacional con la biopsia de vellosidades coriales resultan difíciles de valorar por la frecuencia de abortos espontáneos a estas edades gestacionales ya que frecuentemente ocurren en el primer trimestre del embarazo, con un estimado de pérdida por embarazo de 0.5 – 1 % hasta un 2.2 a un 5.4 % reportado por Wapner⁸ RJ y Jackson L¹².

La hemorragia se puede presentar en raras ocasiones en la vía transabdominal pero son mas comunes en la vía transcervical, así también los hematomas subcoriónicos, que son producto de la penetración accidental de la sonda en la decidua basal vascularizada. Puede ocurrir infección por la contaminación de la sonda en la vagina con microorganismos y desarrollar una corioamnionitis, así también ruptura prematura de membranas días o semanas después de la biopsia. Además debe evitarse la biopsia en mujeres Rh negativo sensibilizadas por el aumento importante en el título de anticuerpos después de la biopsia².

Tabla 1. Complicaciones después de Biopsia de Vellosidades Coriónicas Trans Abdominal y Trans Cervical en el primer trimestre y la amniocentesis en segundo trimestre reportadas en la literatura.

Complicación	BVC -TC	BVC -TA	Amniocentesis	Comentarios
Sangrado ^{10,13}	RR= 8	RR= 4	RR=1	S
Pérdida de líquido amniótico ^{10,13}	RR= 1	RR= 1	RR=4-5	S
Corioamnionitis con y sin choque séptico ^{15,16,17}	0.03-0.5%	1 caso reportado	0.4-0.1%	
Muerte materna ¹⁸	No reportada	No reportada	2/100,000	Complicación de corioamnionitis
Trauma fetal ¹⁹	No reportado	No reportado	No reportado	
Hemorragia	Men	5-	2.6%	

feto – materna 14,15,20	or que después de BVC- TA	10%		
Parto pretérmino ²¹	No reportado	No reportado	RR=1.59	S
Distress respiratorio neonatal ¹³	No reportado	No reportado	RR=2.1	S
Neumonía neonatal ¹³	No reportada	No reportada	RR=2.5	S

BVC-TA Biopsia de Vellosidad Coriónica Trans -Abdominal S Estadísticamente significativo

Ya en 1991 Firth²² reportó un incremento en la presencia de reducción de extremidades en los infantes expuestos a biopsia de vellosidades en útero y siendo descritos principalmente en pacientes en los que se realiza este procedimiento con una edad gestacional menor a las 11 semanas, el mecanismo propuesto para este hallazgo es el daño vascular que provoca la hipoperfusión del feto aunque, la incidencia de los defectos de los miembros puede depender de la edad gestacional principalmente al que se practica el procedimiento²³, la experiencia del operador puede ser crucial para la ocurrencia de complicaciones. El U.S. Centres for Disease Control and Prevention recomienda estimar a las pacientes un riesgo de 1/1000 a 1/3000 para la reducción de miembros²³.

El análisis de varios estudios incluyendo los registros de 138,996 casos de biopsias por parte de la organización mundial de la salud¹¹ no reportan aumento en la tasa de malformaciones en relación a la población general ni de reducción de miembros así como en los diferentes estudios multicéntricos, cuando la BVC se realiza en embarazos entre 11 y 14 semanas que se resumen en la tabla 2. Es importante hacer notar la importancia de realizar estudios a estas semanas de gestación así como la experiencia de las personas que realizan el procedimiento ya que si se practica antes de las 11 semanas se pueden encontrar tasas reportadas de hasta 7,3 por 10,000 cuando se realizan en etapas muy tempranas de la gestación como las 7 semanas.

Tabla 2. Defectos de reducción de miembros en series de biopsias de vellosidades coriónicas y registro poblacionales de malformaciones.

Fuente	N° de biopsias	N° de NV	Tasa por 10,000
Jefferson Medical Collage Philadelphia and Hutzel Hospital, Detroit	19,969		3.0
Magiangalli Clinic University	16,597		3.0

of Milan, Center of Prenatal Diagnosis, Milan			
Pellegrin University Hospital, Bordeaux	10,144		1.0
USA multicenter studies	9588		7.3
Cook catheter multicenter CVS Trial	4105		7.3
Danish randomized trials	4530		0
WHO-CVS Registry	138,996		5.7
WHO-CVS Registry	208,682		5.1
WHO-CVS Registry	76,476		4.3
Swedish Registry		1,368,024	6.2
British Columbia Registry		1,213,913	6.0
Italian Birth Defect Registry		1,115,361	6.2
South America Registry		2,917,074	5.2

Debido a que el tejido placentario esta unido al útero existe el riesgo de obtener tejido materno en lugar de tejido fetal por lo que este puede ser analizado erróneamente en lugar del tejido fetal, siendo reportado por algunos laboratorios con hasta en un 1-2 % de los casos ^{24,26}. Por eso es importante la identificación macroscópica de la vellosidad una vez realizado el procedimiento, y antes de enviarla al laboratorio. Otro aspecto a tener en cuenta al momento de obtención de la muestra es la cantidad del tejido ya que la cantidad mínima que se ha reportado es de 5 mg²⁴ para poder realizar los estudios aunque esta depende del equipo y el entrenamiento del personal, ya que con una vellosidad se pueden hacer estos y si es insuficiente debe de tomarse otra muestra, para ello se debe observar fácilmente en la lamina de Petri y si es insuficiente hay que tomar una nueva muestra.

Existe además la posibilidad de 1- 2% de mosaicismo que es más común en preparaciones directas y consiste en células con cariotipo diferentes usualmente confinado a la placenta, por lo que en algunos de estos casos es necesario realizar amniocentesis para determinar si las células anormales están confinadas a la placenta pero en otros casos si dicha alteración cromosómica es severa (por ejemplo en T -13) en los que los fetos deben presentar signos que pueden ser reconocidos por un ultrasonografista experimentado, y si estos no están presentes en la semana 18 – 20 no es necesario repetir el estudio²⁷.

Hasta la fecha no se ha encontrado información acerca de la realización de este procedimiento en México.

JUSTIFICACION

Desde la década de los ochenta a nivel mundial se han realizado estudios de biopsia de vellosidades coriales como método de diagnóstico prenatal temprano, y en México se realizan actualmente en el Instituto Nacional de Perinatología por lo tanto es importante dar a conocer a la población medica, cual es la ventaja de realizar la biopsia de vellosidades coriales en nuestro medio, conocer las complicaciones, y la frecuencia con que ocurre cada una de ellas, según las semanas de gestación en las que se realice, y si estas son similares o menores a las reportadas en la literatura mundial o similares a los riesgos de la amniocentesis en el segundo trimestre, se podría asesorar a las pacientes para que soliciten un diagnóstico mas temprano con seguridad tanto para la madre como el feto, teniendo la oportunidad de tomar decisiones una vez conocido el resultado del estudio en etapa mas temprana de la gestación, intentando así reducir en estas pacientes las complicaciones medicas, y psicológicas que se acentúan en embarazos que se diagnostica en forma mas tardía a finales del segundo trimestre.

OBJETIVOS:

OBJETIVO GENERAL

Determinar el número de biopsias de vellosidades coriónicas realizadas en el departamento de Medicina Materno Fetal del instituto Nacional de Perinatología a partir del año 2002 a agosto del 2005, y describir los diagnósticos y complicaciones derivadas del procedimiento en las pacientes y sus fetos y/o Recién Nacidos, así como las características particulares de este grupo de pacientes.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar el número de BVC realizadas en el departamento de medicina fetal del INPer en el período comprendido del 2002 a julio del 2006.
2. Describir las características demográficas de las pacientes a quienes se les realizó BVC
3. Determinar las edades gestacionales a las que se realizó la BVC.
4. Determinar las indicaciones para de toma de muestra de vellosidades coriónicas en estas pacientes.
5. Determinar la localización placentaria en las pacientes sometidas a BVC
6. Describir las complicaciones encontradas en pacientes que se les realiza BVC
7. Describir las complicaciones fetales encontradas en las pacientes sometidas a BVC
8. Describir los resultados reportados de las BVC por el departamento de genética.
9. Describir el manejo posterior de las pacientes con resultados anormales de la BVC
10. Describir la técnica para BVC utilizada en el Instituto Nacional de Perinatología y las dificultades técnicas que se han presentado.

DISEÑO DEL ESTUDIO

Serie de casos

UNIVERSO DE ESTUDIO

Todas las pacientes que se les haya realizado BVC en el departamento de medicina fetal del INPer en el periodo comprendido de Enero del 2004 a marzo del 2006. incluyendo las pacientes resultado del programa de tamizaje de 11-13.6 semanas.

UNIDADES DE OBSERVACION

Todas las pacientes que hayan ingresado al programa de primer trimestre del INPer y que por los resultados hayan sido sometidas a BVC

MUESTREO

No probabilístico de casos consecutivos.

CALCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA

En vista de ser un estudio de serie de casos no se calcula el tamaño de la muestra ya que se tomará el total de las pacientes que fueron sometidas a BVC

CRITERIOS DE SELECCION

CRITERIOS DE INCLUSION:

. Todos los expedientes de las pacientes sometidas a BVC en el departamento de medicina fetal del INPer de Enero del 2004 a marzo del 2006.

DESCRIPCION DEL ESTUDIO

Como parte del programa de diagnóstico prenatal del primer trimestre, las pacientes cuyo riesgo para cromosomopatía por TN permanece igual o mayor a 1: 270, se envían a la consulta de diagnóstico prenatal para recibir asesoría para procedimientos de diagnóstico invasivo del primer trimestre. Esta selección de las pacientes ocurre con el objetivo de obtener un menor número de procedimientos invasivos innecesarios y tratar de reducir los costos y riesgos que implicaría el someter a estudios todas las pacientes que asisten al programa.

Para obtener la información necesaria para el estudio, se revisó el registro de las BVC realizadas en el departamento de Medicina Materno Fetal, se seleccionó el nombre y número de expediente de las pacientes a quienes se

han sometido al procedimiento. Posteriormente se hizo una lista de las mismas para solicitud y revisión de los expedientes en el archivo clínico.

Se captó la información, mediante la revisión de los expedientes clínicos de todas las pacientes que fueron sometidas al estudio de biopsia de vellosidades coriónicas de 11 a 14 semanas de gestación, las que previamente han sido asesoradas para el procedimiento y han firmado la hoja de consentimiento en la consulta de diagnóstico prenatal. Los datos correspondientes se recabaron en la hoja de recolección de datos y posteriormente se analizaron las características de cada uno de los casos.

ANALISIS ESTADISTICO PROPUESTO

Se realizó estadística descriptiva para cada una de las características de la población como las medidas de tendencia central y de dispersión de acuerdo al tipo de variables, frecuencias y porcentajes según lo requiera y gráficos que los ilustren.

ASPECTOS ETICOS

Debido a que el estudio se realiza mediante la revisión del expediente clínico de las pacientes el riesgo es nulo.

RESULTADOS

Hasta la fecha de corte se habían realizado en el Instituto Nacional de Perinatología de la ciudad de México, un total de 497 evaluaciones de primer trimestre y 25 Biopsias de Vellosidades Coriales (BVC) en un periodo comprendido de Enero del 2004 hasta el 30 de Marzo del 2006. Para la realización del procedimiento inicialmente se efectuó la valoración ultrasonografica de primer trimestre y posteriormente en base al resultado de este si la paciente se encuentra dentro de los valores por arriba del punto de corte que se tiene de 1:270 posterior al estudio de primer trimestre para el riesgo de trisomía 21 ó en el caso que se encuentren defectos estructurales mayores o marcadores para cromosopatías, se envía a la clínica de Genética donde se brinda la asesoría necesaria para que decida si acepta o no someterse a procedimiento invasivo de diagnóstico prenatal.

De las características principales de las pacientes sometidas a BVC podemos decir que la edad media de 35 años, con una paridad de 1 a 3 gestas en distribución más o menos similar y ocupando 8, 5, y 9 para Gesta 1, 2 y 3 respectivamente de los 25 casos estudiados que corresponden al 88 %.

Tabla 1. Distribución pacientes que se sometieron a BVC en el Departamento de Medicina Materno Fetal del INPer de enero del 2004 a Marzo del 2006.

#	INDICACION DE LA BVC	Número
1	Edad materna	1
2	Edad materna + ansiedad	1
3	Edad materna + Oligohidramnios severo	1
4	Edad materna + Onfalocele	1
5	TN aumentada + 2 focos eco génicos cardiacos	1
6	Antecedente de hijo con triploidia + TN aumentada	1
7	Antecedente de hijo con osteogénesis imperfecta	1
8	Antecedente de hijo con atrofia muscular espinal	1
9	Portadora de translocación 6:12	1
10	Antecedente de hijo con translocación 4	1
11	Corea de Huntington	1
12	Antecedente de 2 hijos con T 21	1
13	Higroma Quístico	2
14	EMA + Feto con holoprosencefalia	2
15	Edad materna + TN aumentada	9
	Total	25

TN: Translucencia nucal, T: Trisomía

Podemos observar que las indicaciones son variadas pero la más frecuente en este caso es la edad materna asociada a TN aumentada por lo que se encuentran dentro de los valores por arriba de 1:270 como punto de corte para indicación para procedimiento invasivo.

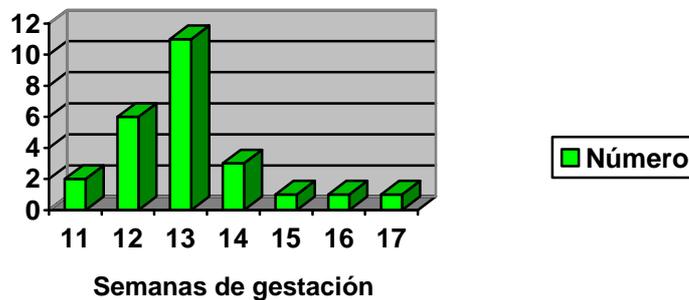
Tabla.-2 Distribución de las pacientes que se sometieron a tamizaje de primer trimestre, y que posteriormente se practico BVC.

#	Paciente	Edad	TN	Riesgo preprueba	Riesgo posterior	Observaciones
1	BRN	40	2.3	1:57	1:43	
2	COR	24	3.6	1:760	1:94	
3	MOB	18	6.8	1:851	1:5	
4	FGC	37	2.2	1:105	1:271	Antec de triploidía
5	VSP	30	10.5	1:454	1:5	
6	GPA	29	11.4	1:528	1:5	
7	BG	39	4.6	1:73	1:5	
8	MH	35	13.1	1:122	1:5	
9	BOL	39	2.5	1:62	1:45	
10	ALM	39	1.3	1:81	1:492	Holoacranea
11	MLG	39	6.6	1:81	1:5	
12	PS	39	0.8	1:81	1:854	Angustia materna
13	HHJ	39	1.9	1:70	1:176	
14	AT	42	1.4	1:33	1:194	
15	GCS	29	5.3	1:510	1:5	
16	PSV	33	1.2	1:271	1:1794	Osteogénesis imperfecta
17	VES	33	2.23	1:167	1:90	
18	CQM	38	3.8	1:81	1:5	
19	GPC	33	1.68	1:56	1:259	Antec de 2 hijos T 21

De las pacientes que se sometieron a tamizaje de primer trimestre (n=19) 15 (79%) se encontraban por arriba del punto de corte de 1:270 que es la referencia del INPer, como candidata a asesoría para procedimiento invasivo y las otras cuatro pacientes aunque estaban por debajo de este punto tenían antecedentes que indicaban la necesidad de realizar el estudio.

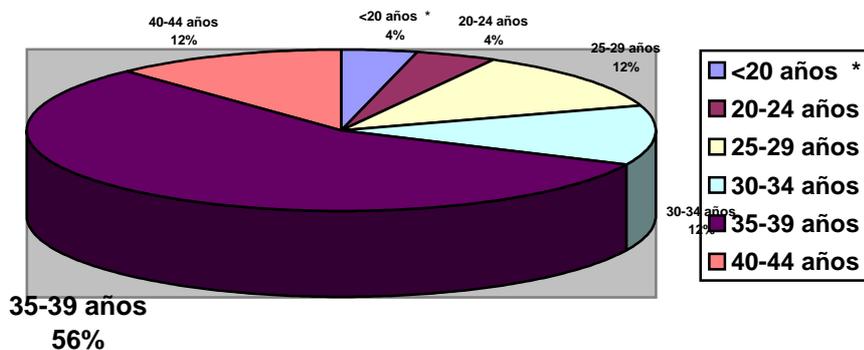
Grafico 1. Semanas de gestación de las pacientes que se sometieron a BVC en el departamento de Medicina Materno Fetal del INPer de enero del 2004 a marzo del 2006.

Semanas de gestación de las pacientes que se sometieron a BVC



Hasta este momento observamos que las BVC se practican con buen resultado desde las 11 semanas de gestación aunque se observa un mayor porcentaje entre las doce y trece semanas que en conjunto ocupan 69% (18/25). los casos que se realizaron en pacientes mayores de 14 semanas fueron por: Oligohidramnios severo, despegamiento de membranas amnióticas.

Grafico 2. Rangos de edad de las pacientes que se sometieron a BVC en el departamento de Medicina Materno Fetal del INPer de enero del 2004 a marzo del 2006.

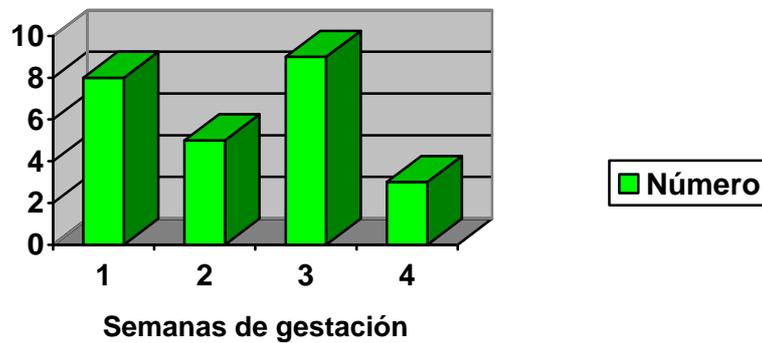


*paciente de 18 años con feto con higroma quístico

Las pacientes con una edad de 35 años o más ocupan el 65% ya que es la principal indicación para la realización del estudio

Grafico 3. Distribución por Número de Gestaciones, de las pacientes que se sometieron a BVC en el departamento de Medicina Materno Fetal del INPer de enero del 2004 a marzo del 2006.

Distribución por número de gestaciones de las pacientes sometidas a BVC.



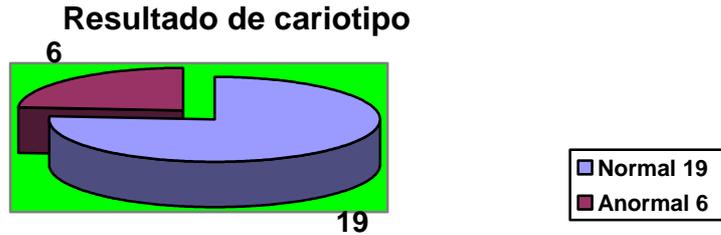
Hasta este momento la mayoría de las pacientes tenían de una a tres gestas donde se encuentra una distribución mas o menos uniforme.

Tabla 3. Localización placentaria de las pacientes que se sometieron a BVC en el departamento de Medicina Materno Fetal del INPer de enero del 2004 a marzo del 2006.

#	LOCALIZACION PLACENTARIA	No
1	Corporal anterior	20
2	Corporal posterior	2
3	Fundica	3
4	Sobre cervix	0
	Total	25

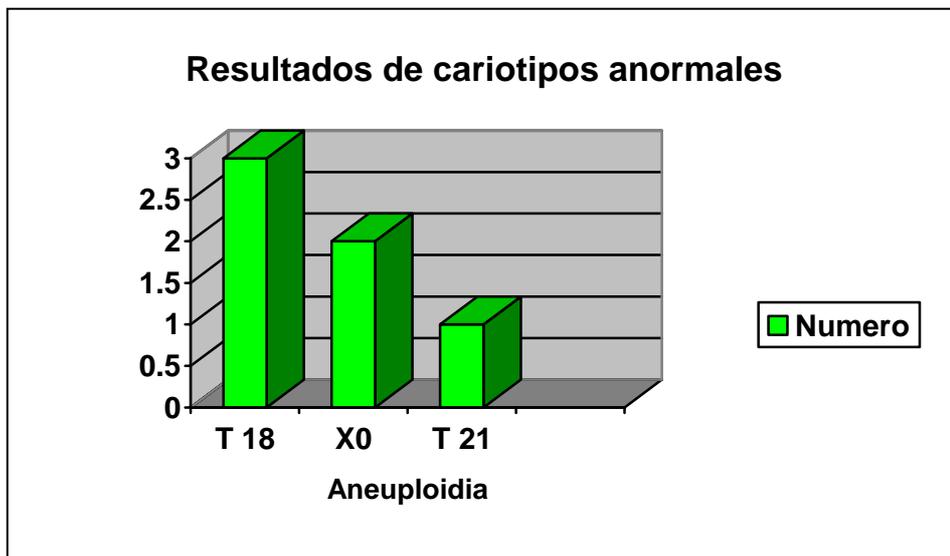
Con la información disponible al momento se puede observar que las placentas estaban accesibles para la toma de la muestra por vía abdominal.

GRAFICO 4. Resultado del cariotipo de las pacientes que se sometieron a BVC en el departamento de Medicina Materno Fetal del INPer de enero del 2004 a marzo del 2006.



En las BVC realizadas un (6/25)24% presentaron aneuploidías, del total de pacientes que se sometieron a dicho estudio invasivo.

Grafico 5. Distribución de los resultados de cariotipos anormales de las pacientes que se sometieron a BVC en el departamento de Medicina Materno Fetal del INPer de enero del 2004 a marzo del 2006.



En las pacientes que presentaron cariotipo anormal lo mas frecuente fué la presencia de T18 con 3 casos, 2 monosomías del X. Llamando la atención que la T21 fue la menos frecuente en este grupo de pacientes.

Tabla 4. Distribución de los resultados de cariotipos Normales de las pacientes que se sometieron a BVC en el departamento de Medicina Materno Fetal del INPer de enero del 2004 a marzo del 2006.

#	GENOPATIA	No
1	Atrofia muscular espinal	1
2	Osteogénesis imperfecta tipo II	1
3	Corea de Huntinton	1
4	Cariotipo normal sin Genopatías	16
	Total	19

Tres de las pacientes con cariotipo normal corresponden a genopatías, las que se enviaron a estudio molecular.

Tabla 5. Distribución de las pacientes que se sometieron a BVC en el departamento de Medicina Materno Fetal del INPer de enero del 2004 a marzo del 2006.

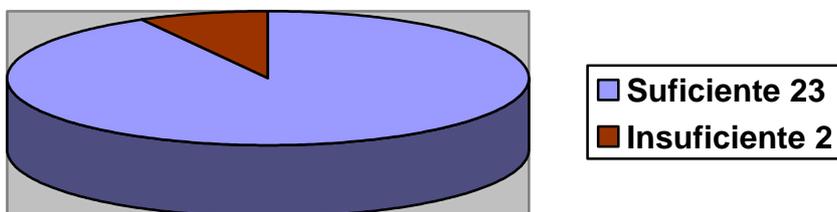
Según el curso del embarazo cuando el cariotipo fue anormal o presentaban resultado positivo para genopatía.

#	Se interrumpió	No	%
1	Si se interrumpió	9	100
2	No se interrumpió	0	0
	Total	9	100

Se puede apreciar a la fecha que todas las pacientes optaron por la interrupción ya que solicitaron la interrupción al comité de bioética y les fue aprobada, y la que no lo solicito aquí interrumpió su embarazo fuera de la institución.

Grafico 6. Cantidad de muestra obtenida en pacientes que se sometieron a BVC en el departamento de Medicina Materno Fetal del INPer de enero del 2004 a marzo del 2006.

Cantidad de muestra obtenida



De acuerdo a la valoración del laboratorio de Genética de la Institución, la muestra insuficiente correspondió al 8% de los casos que fueron dos de las 25 pacientes. De las muestras tomadas en el 100% se obtuvo cariotipo, en una de las dos muestras que fueron menor a 5 mg se realizó posteriormente amniocentesis y en otra se realizó FISH.

Hasta el momento que se hizo el corte de no se han reportado pérdidas como consecuencia del procedimiento ni otras complicaciones en las pacientes que se practicó la biopsia de vellosidades.

DISCUSION

La biopsia de vellosidades coriales es un procedimiento invasivo de diagnóstico prenatal que nos permite obtener en periodos muy tempranos de la gestación resultado del cariotipo fetal y material de estudio para estudios moleculares e identificación de Genopatías mucho antes que cualquier otra técnica de diagnóstico prenatal. En el INPer actualmente se realiza este procedimiento y desde Enero del 2004 a Marzo del 2006 se han realizado 25 biopsias de vellosidades con un promedio de 12 por año. Dentro de las indicaciones para este procedimiento están; principalmente la edad materna mas el tamizaje de primer trimestre como principal indicación que se realizó en el 76% de las pacientes sometidas a biopsia y que obedece al 3.8% de procedimientos invasivos del total de pacientes tamizadas que fue de 497 pacientes, y el total de biopsias corresponde a 5%. Pero en este caso tal y como se reporta en la literatura por Nycolaidis quien refiere que estas pacientes son candidatas a ser sometidas a procedimiento invasivo luego de la asesoría por parte del departamento de genética sin tener que esperar hasta el segundo trimestre para la amniocentesis. Se encontraron otras indicaciones como son genopatías en 3/20 casos biopsiados, por lo que nuevamente enfatizamos que el estudio no es exclusivo para cromosomopatías.

Se realizaron las biopsias tal como lo sugiere Brambati en su revisión del 2005 donde recomienda que se debe realizar la biopsia después de las 10 semanas de gestación para evitar aumentar el riesgo de presentar acortamiento de los miembros que fue reportado por Firth y Cols desde 1991. En el Instituto se realiza a partir de las 11 semanas de gestación con la mayoría de los casos en las semanas 12 y 13 de gestación en un total de 18/20 casos. Se realizó también en dos casos después de la semana 16 por oligohidramnios severo que no permitía en ese caso realizar la toma de líquido amniótico para amniocentesis, y el cordón umbilical todavía era pequeño para cordocentesis, en otro caso en semana 16 demostrando que es posible realizarla y técnicamente mas fácil a estas semanas de gestación por el mayor tamaño placentario, permitiendo obtener una muestra adecuada de tejido sin complicaciones agregadas en estos casos para la madre o el feto.

En cuanto a la edad de las pacientes que se sometieron a biopsia como es de esperar tenemos pacientes de todas las edades ya que independientemente de la edad están en riesgo de presentar fetos con síndrome de Down, por lo que todas las que se incluyen en el estudio de primer trimestre pueden ser candidatas para la biopsia de salir con tamiz por arriba del punto de corte establecido para procedimiento invasivo, así como pacientes con antecedente de genopatías o cromosomopatías en embarazos previo o por parte de alguno de los padres.

En nuestro grupo de estudio la media de edad fue de 35 años. Las pacientes de 35 años o más correspondieron a 17 de las 25 que se sometieron a biopsia correspondiendo a un 68%. En relación a la paridad podemos observar que la mayoría de las pacientes tienen de 1 a 3 gestaciones con una distribución similar entre ellas, ocupando 22/25 pacientes estudiadas, considerando esto como algo de esperarse ya que son pacientes con dificultades para lograr un embarazo a edades mas tempranas o que deciden postergar su vida reproductiva, fenómeno que se ha presentado a nivel global en las ultimas dos décadas tal como se reporta en la literatura mundial.

Brambati reporta en su revisión 2005, que la técnica utilizada tanto por vía abdominal como por vía vaginal tienen resultados similares cuando es realizada por personal capacitado, en el INPer la técnica que se utiliza es la abdominal que se puede realizar independiente de la ubicación placentaria pero en nuestro caso la mayoría (20/25) de las placentas tenia una ubicación anterior que permitió realizar con éxito el procedimiento aunque también se encontró en ubicación posterior y fúndica en 3 y 2 casos respectivamente lo que no impidió que se realizara el procedimiento satisfactoriamente. De las pacientes estudiadas en todos los casos se obtuvo el resultado del cariotipo y este resultó anormal en 6/25 lo que corresponde a un 24 %, con resultado para T18 en 3 casos, para Monosomía del X en 2 y uno para T 21. Llama la atención que aunque en la literatura se reporta que la mas frecuente de las trisomías es la 21, es de considerar que la T18 es la mas frecuente en la revisión probablemente por que los casos tenían otras anomalías asociadas en la evaluación ultrasonografica inicial de primer trimestre donde se puede encontrar el aumento importante de la translucencia nucal y los defectos asociados como ser; onfalocele en una paciente y otra con antecedente de

triploidía. Hay que tomar en cuenta que una de las ventajas de realizar la BVC es la posibilidad de contar con el estudio en etapas mas tempranas que la amniocentesis obteniendo un diagnostico mucho mas temprano y saber si el feto adolece realmente o no de alteración cromosómica o de la genopatía que se investiga para tomar en consideración en caso de diagnostico de la cromosomopatía la posibilidad de continuar o no el embarazo, en nuestro caso se obtuvo cariotipo anormal para 6 pacientes las cuales interrumpieron su gestación tres semanas después de obtenida la muestra donde se confirmó el cariotipo anormal, estas se presentaron a comité de Bioética de la Institución y aceptó la interrupción; una de las pacientes con T 21 optó por interrumpir el embarazo fuera de la Institución ya que aquí no se puede apoyar la interrupción por ser una cromosomopatía no letal, además las pacientes con alguna genopatía, en los que la muestra para estudio molecular se envió fuera del país debido a que en nuestro medio no se realizaban dichos estudios y en la paciente con resultado de osteogénesis imperfecta solicitó se presentara su caso al comité de Bioética y autorizo la interrupción, las otras dos pacientes optaron por atención fuera de la institución para la interrupción.

Hasta la fecha en nuestro caso no se han reportado complicaciones tanto fetales como maternas derivadas del procedimiento a diferencia de las series publicadas en la literatura donde se reportan diferentes complicaciones, aunque en esta serie solo se han revisado un numero de 25 pacientes, estamos concientes de que existe el riesgo de complicaciones y perdida fetal por el procedimiento por lo que al momento de asesorar a la paciente se menciona que existe un riesgo de perdida fetal de un 0.5 -1% similar al que se reporta para la amniocentesis en el segundo trimestre, además es importante mencionar las demás complicaciones que se pueden derivar del procedimiento como sangrado transvaginal 3.4%, inicio de contracciones uterinas, acortamiento de los miembros que se reporta cuando esta se realiza en embarazos de 10 semanas o menos de gestación lo que no ocurrió en nuestro caso, así como el riesgo de daño fetal^{17,19,21}. En cuanto al mosaicismo que se reporta en 1-2% de los casos no se observo en nuestras pacientes, solamente el problema técnico que se reporta es una cantidad de muestra menor a 5mg lo que dificulto pero no impidió que se realizara finalmente el diagnóstico, en nuestra revisión se obtuvo muestra adecuada para diagnóstico en 24/25 y aunque en una de las muestras no se obtuvo mas de 5 mg de vellosidad si se pudo realizar el diagnostico, en una paciente si hubo necesidad de realizar posteriormente amniocentesis para obtener el resultado lo que esta acorde a la literatura revisada donde se reporta que se puede obtener muestra adecuada para estudio en mas del 90% de los casos. En cuanto al numero de punciones es importante aclarar que en esta serie solo se requirió realizar una punción para la obtención de la muestra ya que se ha reportado el aumento del riesgo de perdida para aquellos casos en los cuales hay necesidad de realizar mas de una punción para la toma de la muestra, cuando al verificar el tejido obtenido el resultado es muy escaso.

Como podemos apreciar la toma de la muestra de vellosidades coriales es un procedimiento que ya se realiza en México y que esta disponible como un método de diagnostico prenatal invasivo con posibilidad de obtener un diagnostico mucho mas temprano que con la amniocentesis de segundo trimestre, sin aumentar los riesgos para la paciente ni para el feto en relación a

un procedimiento invasivo mas tardío. Sabemos muy bien que aunque en este estudio no se han presentado complicaciones ya que a la fecha se han realizado 25 estudios de biopsia de vellosidad corial estadísticamente no se esta exento de presentar complicaciones pues se han reportado en estudios previos realizados en otros países^{13-17, 20, 21}, por lo tanto es importante al momento de asesorar a la paciente para la toma de decisión del estudio que existe la posibilidad de estos. Claro que es de tener en consideración que estos pueden variar en su presentación dependiendo del entrenamiento y la experiencia de la persona que realiza el procedimiento. Afortunadamente en el Instituto de perinatología se entrenan actualmente en forma permanente una nueva generación de médicos materno fetales para los países de Latinoamérica que permitirá tener personal calificado para realizar los estudios dentro y fuera del país y poder ofrecer una alternativa de diagnostico prenatal mucho mas temprano y con la seguridad requerida tanto para la madre y el feto.

Por lo tanto hay que considerar que actualmente es muy importante tener disponible la Biopsia de Vellosidades Coriales, como procedimiento confirmatorio ante un tamizaje positivo de primer trimestre. Cuando se ofrece un método de escrutinio y reclasificación de riesgo a la población, el subgrupo con riesgo alto debe tener la opción de que se le ofrezca una prueba definitiva para llegar al final del proceso diagnóstico.

BIBLIOGRAFIA

1. Nicolaidis K, Sebire J, Snijders R. Diagnóstico de anomalías cromosómicas en el primer trimestre. En La ecografía de las 11 – 13.6 semanas. Parthenon Publishing. Fetal Medicine Foundation. R U. 2004.
2. Diaz-Martinez AG, Valdez-Abreu M, Dalmau-Diaz A. La biopsia de vellosidades coriónicas como técnica de diagnóstico prenatal. Rev Cubana Obstet Ginecol 1996;22:21-8.
3. Mohr J. Fetal genetic diagnosis; development for the techniques for early sampling of fetal cells. Acta Pathol Microbiol Scand. 1968;73:73-7.
4. Dexeus S. El riesgo de nacer: el desafío del diagnóstico prenatal. Labor 1989;450-3.
5. Simoni G, Brambati B, Danesino C y cols. Comparison efficient direct chromosome analysis and enzyme determinations from chorionic villi samples in the first trimester of pregnancy. Hum Genet 1983;63:349-57.
6. Hajeck Z, Kulovany E, Hacek M, Stejskal D. Is chorionic biopsy a dangerous and outdated method? Cesk Gynecol 1994;59:61-3.
7. Isada NB, Johnson MP, Preyde PG. Technical aspects of transcervical chorionic villus sampling. Fetal Diagn Ther 1994;9:19-28.
- 8.-Brambati B y Cols. Chorionic villus sampling; an analysis of the obstetric experience of 1000 cases. Prenatal Diagn. 1987; 7:157-69.
9. Dugoff L, Hobbins J. Invasive procedures to evaluate the fetus. Clin Obstet and Gynecol.2002;43:1039-53.
- 10.-Smidt-Jensen S Y Cols. Randomized comparison of amniocentesis and transabdominal and transcervical chorionic villous sampling. Lancet. 1992;340:1237-44.
11. Brambati B, Tului L. Chorionic villous sampling and amniocentesis. Obstet and Gynecol 2005;17:197-01.
- 12.- Wapner RJ, Jackson L. Biopsia de vellosidades corionicas. Clin Obstet North Am. 1988;2: 317-33.
- 13.- Tabor A, y cols. Randomised controlled trial of genetic amniocentesis in 4606 low-risk women. Lancet 1986;1:1287-93.
14. Hogge WA, Schonberg SA, Golbus MS. Prenatal Diagnosis by chorionic villous sampling: Lessons of the first 600 cases. Prenatal Diagnosis 1985;5:393-400.
15. Brambati B, Tului L. Prenatal genetic diagnosis through chorionic villous sampling in Milonsky A Editor. Genetic disorders and the fetus 5th Baltimore and London. The Johns Hopkins University press. 2004:179-213.
16. Garden A, Johnston M, Davis N. Intrauterine infection and miscarriage following trans-abdominal chorionic villous sampling: case report. Br J Obstet Gynaecol 1991;98:413.
17. Wunster KG, Roemer VM, Decker K, Hirsh HA, Amiotic infection syndrome after amniocentesis ; a case report, Geburtshilfe Frauenheilkd 1982;42:676-9.
18. Chalal EL. Y cols. Maternal mortality following diagnostic 2nd – trimester. Fetal Diagn Ther 2004;19:195-8.
19. Seeds JW, Diagnostic mid trimester amniocentesis: how safe? Am J Obstet Gynecol 2004;191:607-15.
20. Bowman JM, Pollack JM, Trasplacental fetal haemorrhage after amniocentesis. Obstet Gynecol 1998;66:749-54.

21. Medda E, Donatis S, Spineli A, Di Renzo GC. Genetic Amniocentesis; a risk factor for preterm delivery. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003, 110:153-8.
22. Firth Hv, Boyd P, Chamberlain P. Severe limb abnormalities after chorionic villous sampling at 56-66 day`s gestation. *Lancet.* 1991;337:726
23. Canadian Collaborative. CVS-Amniocentesis clinical trial group.Multicenter randomized clinical trial, of chorion villous sampling and amniocentesis. *Lancet.* 1989;1:1-6.
24. Brambati B, Terzian E, Tognoni G. Randomized clinical trial of transcervical versus transcervical chorionic villus sampling methods. *Prenatal Diagnosis,* 1991;11:285-93.
25. Nicolaides Kipros, Brizot M, Patel F, Snijders R. Comparison of chorionic villous sampling and amniocentesis for fetal karyotyping at 10-13 weeks`gestation. *Lancet.* 1994;334:435-9.
26. Alfirevic Z, Sundberg K, Brigham S. Amniocentesis and chorionic villous sampling for prenatal diagnosis(Cochraine Rewie), en *The Chocraine,* issue1, 2004, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
27. Hernandez Andrade E, Guzman Huerta M, Garcia Cavazos R, Ahued Ahued JR, Diagnostico prenatal en primer trimestre; ¿ A quien y como? *Ginecol Obstet Mex* 2002; 70:607-12.
28. Suzumori K, y Cols. Comparison of chorionic villous sampling and amniocentesis ; current status of prenatal diagnosis in Japan. *Prenatal Diagnosis.* 1994; 14:479-86.
29. Smidt J, Hahnemann N. Transabdominal chorionic villus sampling for fetal genetics diagnosis tecnicl and obstetrical evaluation of 100 cases. *Prenatal Diagnosis.* 1988. 8;7-17.
30. Brambati B, y Cols. Genetic diagnosis by chorionic villous sampling before 8 gestational weeks: efficiency, reliability, and risk on 317 completed pregnancies. *Prenatal Diagnosis.* 1992;12:789-99.
31. Salinas Hugo, Valdés Henrique, Carmona Sergio. Screening genetico antenatal para la detección de aneuploidías. *Rev Chil Obstet Ginecol* 2003; 68:529-35.
32. Kuliev AM. Limb anormalities and chorionic villous sampling. *Lancet* 1992;340(12):668-70.
33. Bovicelli Luciano y Cols. Trans abdominal chorionic villous sampling: analysis of 350 consecutive cases. *Prenatal Diagnosis.*1988;8:495-500.

ANEXO 1
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA MATERNO FETAL

HOJA DE RECOLECCION DE DATOS
BIOPSIA DE VELLOSIDADES CORIALES

Nombre _____ Registro _____ N caso _____

Edad de la Madre _____ Años. Estado civil _____

Escolaridad _____ Ocupación _____

Procedencia _____ Edad _____

Gestacional _____

G ___ P ___ C ___ A ___ E: ___ M ___ HV ___ HM ___

Hijos previos con patologías: NO _____

SI _____ Cuales? _____

Antecedente de hijo con cromosomopatía: NO ___ SI ___

Trisomía 13 _____

Trisomía 18 _____

Trisomía 21 _____

Otra _____

Se realizó Duotest: NO ___ SI _____

Resultado _____

TN _____ mm.

Riesgo calculado por edad _____ Por TN _____

Marcadores ultrasonográficos para cromosomopatías:

NO ___ SI _____

Cuales _____

Anomalías ultrasonográficas

asociadas: _____

Edad gestacional al momento de la BVC _____ semanas

Indicación para la

BVC _____

Localización

placentaria _____

Número de punciones _____ Cantidad de muestra _____ g

Complicaciones post-procedimiento:

Sangrado vaginal _____ Salida de líquido transvaginal _____

Amenaza de aborto _____ Aborto incompleto _____

otras: _____

Cuanto tiempo después: _____

Complicaciones fetales:

Muerte fetal _____ Alteraciones en miembros _____

Otras alteraciones _____

Resultado: Normal _____

Anormal ___ Cual? _____

Si es anormal se interrumpió embarazo: NO _____ SI _____

Comité de bioética: Si _____ NO _____

Edad gestacional de resolución: _____ Vía : Parto _____ Cesárea _____

Cesárea indicación: _____

Datos del RN: Sexo M ___ F ___ Peso _____ g, SA ___ Talla _____ Cm.

APGAR _____ Destino _____

APGAR < 6 Gasometría _____

Problemas técnicos: SI _____ NO _____

Cuales _____

Recolectó la información _____ Fecha: _____

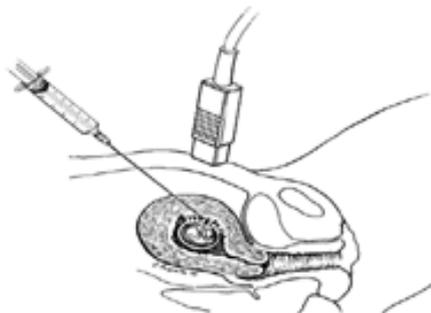
ANEXO 2

TECNICA TRANSABDOMINAL

Descrita originalmente por Smidt jensen y Hahnemann¹¹ y estudiada por Maxwell y cols. donde se usaba dos agujas, una externa a manera de cánula y la interna mas fina para extraer la muestra, posteriormente se optó por una sola aguja. Se debe hacer inicialmente el estudio ultrasonográfico para observar la vitalidad fetal y ubicar la placa coriónica, con la vejiga relativamente vacía, para que el útero se acerque mas hacia la pared abdominal y disminuir el riesgo de lesionar un asa intestinal, se prepara la piel del abdomen con yodopovidona se introduce la aguja de raquianestesia de calibre 16 o 18 de 8 a 15 cm de longitud con orientación por guía ultrasonografica hasta llegar al corion frondoso, se realiza la aspiración. La muestra obtenida usualmente es de 5 a 20 miligramos, se coloca en una placa de Petri y se comprueba al microscopio que la muestra es correcta, luego las vellosidades limpias se colocan en otra placa que contiene una solución salina balanceada de Hank (HBSS), se lavan moviéndolas suavemente en la solución y luego se colocan en otra placa de Petri para cultivo celular, incubación o análisis para diagnostico bioquímico o ADN²⁶⁻³⁰.

La biopsia de vellosidades coriónicas (BVC) desarrollada a partir de la década de los ochentas nos ofrece una alternativa atractiva dentro de los estudios invasivos en el sentido de que se puede realizar en etapas más tempranas de la gestación que la amniocentesis y puede disminuir el estrés físico y emocional en aquellas parejas que tienen un mayor riesgo genético, debido a su aplicabilidad después de las 10 semanas de gestación teniendo la oportunidad de obtener los resultados de los estudios en forma mas temprana y permitir en los casos en los cuales el diagnostico es adverso la toma de decisiones en forma mas oportuna y con menor riesgo para la paciente.

A diferencia de la amniocentesis en la cual se extrae líquido amniótico y se cultivan los amniocitos de origen fetal, la biopsia de las vellosidades coriónicas se basa en tejido extraembrionario, vellosidades derivadas del trofoblasto que forman la placenta. Debido a que el desarrollo inicial del trofoblasto y del feto es a partir del mismo huevo fecundado existe asociación directa en cuanto a las alteraciones cromosómicas o metabólicas en ambos con resultados iniciales que se pueden obtener a las 48 – 72 horas pero es importante recordar que se debe esperar el cariotipo final para descartar la presencia de mosaicismos³¹⁻³⁴.



La técnica utilizada para la obtención de la BVC será la transabdominal que es la utilizada en esta institución y que fue descrita previamente (fig1).