

Gloria Reina^a
Francisco Javier Torres^b
Encarnación Jiménez^c
María del Mar Gordon^c
Carmen Orcoyen^a
José Miguel Merino^a
José Antonio Herreros^a
Rafael Torrejón^a

^aServicio de Obstetricia y Ginecología. Hospital del SAS de Jerez de la Frontera. Cádiz. España. ^bDepartamento de Anatomía Patológica. Hospital del SAS de Jerez de la Frontera. Cádiz. España. ^cServicio de Oncología Médica. Hospital del SAS de Jerez de la Frontera. Cádiz. España.

Correspondencia:

Dra. G. Reina Vinardell.
Servicio de Obstetricia y Ginecología. Hospital del SAS de Jerez de la Frontera. Ctra. Circunvalación, s/n. Jerez de la Frontera. Cádiz. España.
Correo electrónico: grv@ono.com

Fecha de recepción: 8/11/05.
Aceptado para su publicación: 14/2/06.

RESUMEN

Los tumores de Sertoli-Leydig constituyen menos del 5% de los tumores ováricos. Presentamos el caso de una adolescente de 15 años de edad, con un cuadro de virilización, amenorrea y dolor abdominal, que fue diagnosticada de tumoración anexial izquierda. En el estudio analítico destacaba una elevación aislada de testosterona. Debido a la integridad de la cápsula, ser unilateral y los deseos de fertilidad de la paciente, se practicó una anexectomía izquierda. El estudio histológico reveló un tumor mixto de células de Sertoli-Leydig/células de la granulosa juvenil con componente heterólogo cartilaginoso, que podría ser considerado como gynandroblastoma. El cuadro de virilización mejoró progresivamente.

PALABRAS CLAVE

Tumor de células de Sertoli-Leydig.
Gynandroblastoma. Ovario. Virilización. Edad fértil.

Tumor ovárico virilizante mixto de células de Sertoli-Leydig/granulosa (gynandroblastoma) en adolescente de 15 años

Virilizing mixed Sertoli-Leydig/granulosa cell (gynandroblastoma) ovarian tumor in a 15-year-old girl

ABSTRACT

Sertoli-Leydig cell tumors constitute less than 5% of ovarian tumors. We report the case of a 15-year-old girl with virilization, amenorrhea, and abdominal pain, who was diagnosed with a left annexal tumor. Laboratory investigations revealed isolated testosterone elevation. Because the tumor was unilateral, the capsule was intact, and the patient wished to preserve her fertility, left salpingo-oophorectomy was performed. Histopathological examination revealed a mixed Sertoli-Leydig/juvenile granulosa cell tumor with a cartilaginous heterologous component, which could be considered a gynandroblastoma. Symptoms of virilization progressively improved.

KEY WORDS

Sertoli-Leydig cell tumor. Gynandroblastoma. Ovary. Virilization. Fertile age.

612 INTRODUCCIÓN

Los tumores de células de Sertoli-Leydig son neoplasias muy raras ya que constituyen menos del 0,5% de todos los tumores ováricos¹. De ellos sólo un 20% presenta componente heterólogo, y con mucha menor frecuencia tienen un origen mixto (tumores de células de Sertoli-Leydig y de células de la granulosa).

Los tumores de células de Sertoli-Leydig se denominan también androblastomas² por la virilización que ocasionan en las pacientes, aunque habrá que tener en cuenta que la producción elevada de andrógenos también puede tener un origen suprarrenal³.

Los tumores con origen en los cordones sexuales y de la estroma gonadal se representan en la tabla 1.

A diferencia del tumor de células de la granulosa, en el que el componente celular es de origen propiamente ovárico y producirían estrógenos (en el de tipo adulto), en el de Sertoli-Leydig evocan un origen testicular y producirían andrógenos. En el ginandroblastoma coexisten los 2 tipos celulares, y la producción hormonal es mixta⁴⁻⁶.

A continuación se describe un caso de síndrome de virilización secundaria a un tumor mixto de células de Sertoli-Leydig/granulosa juvenil con componente heterólogo cartilaginoso en una paciente adolescente que fue tratada con anexectomía unilateral.

La rareza del resultado del estudio anatomo-patológico conlleva una revisión del tema basado en la evidencia disponible en la bibliografía.

CASO CLÍNICO

Mujer adolescente de 15 años de edad, con antecedentes de intervención quirúrgica por neuroblastoma pulmonar a los 4 años y tratamiento quimioterapéutico. Acude a nuestra consulta de ginecología por presentar un cuadro de dolor abdominal, hirsutismo y amenorrea de un año de evolución.

En los antecedentes ginecoobstétricos destacan ser nuligesta y presentar la menarquía a los 11 años de edad. La fórmula menstrual hasta hace un año era normal. El peso, la talla y el desarrollo mamario eran acordes con su edad. A la exploración presentaba signos de notable virilización (hirsutismo, cambio de timbre de voz, leve hipertrofia de clítoris). Se

Tabla 1 Clasificación de los tumores de los cordones sexuales/estroma (OMS, 2003)

Tumores de células de la granulosa/estroma
Tumores de células de la granulosa
Tipo adulto
Tipo juvenil
Tumores del grupo tecoma/fibroma
Tecoma
Típico
Luteinizado
Fibroma
Fibroma celular
Fibrosarcoma
Tumor estromal con elementos de los cordones sexuales minoritarios
Tumor estromal esclerosante
Tumor estromal con células «en anillo de sello»
No clasificados (fibrotecoma)
Tumores de células de Sertoli/estroma
Tumores de células de Sertoli-Leydig (androblastomas)
Bien diferenciados
Moderadamente diferenciados
Con o sin elementos heterólogos
Pobremente diferenciados
Con o sin elementos heterólogos
Retiforme
Con o sin elementos heterólogos
Tumor de células de Sertoli
Tumor de células de Leydig/estroma
Tumores de los cordones sexuales/estroma de tipo mixto o no clasificados
Tumor de los cordones sexuales con túbulos
Ginandroblastoma
No clasificados
Tumores de células esteroideas
Luteoma
Tumores de células de Leydig
Tumor de células hilares
Sin células hilares
No clasificados
Tumor de células esteroideas no especificados (NOS)
Bien diferenciado
Maligno

Modificado de Tavassoli y Devilee⁶.

palpaba tumoración abdominopélvica que sobrepasaba el nivel umbilical.

En la ecografía abdominal se observaba el útero y el anejo derecho normales. El anejo izquierdo estaba aumentado de tamaño con unas medidas de 15-11

7 cm, y presentaba un ecogenicidad mixta (sólido-quística) con estudio Doppler color normal (fig. 1).



Figura 1. Imagen ecográfica.

En la tomografía computarizada (TC) abdominal presentaba una imagen ocupante de espacio de 13 cm de diámetro máximo en el fondo de saco de Douglas, con características mixtas, sólidas o quísticas, heterogéneas en su distribución, compatible con una masa anexial izquierda. No presentaba hallazgos locoregionales pélvicos asociados. Se observaron imágenes de características residuales basales en el pulmón derecho, secundarias a una intervención de neuroblastoma pulmonar en la infancia.

El estudio analítico general era normal. Los marcadores tumorales (CEA, CA 19.9, CA 125, gonadotropina coriónica beta [BHCG] y alfafetoproteína) eran todos negativos.

En la analítica hormonal, sólo destacaba un aumento importante de testosterona (3,43 ng/ml). El resto de hormonas sexuales y suprarrenales estaban dentro de los valores normales.

Con el diagnóstico de tumor ovárico virilizante, se interviene a la paciente quirúrgicamente, practicándose una laparotomía media suprainfraumbilical. Como hallazgos intraoperatorios se encontró una gran tumoración ovárica izquierda con múltiples adherencias a epiplón y sigma, sin presencia de líquido ascítico libre; el resto de los órganos intraabdominales eran normales; a la palpación, las glándulas suprarrenales eran de tamaño normal. Se procedió a liberar las adherencias descritas y se practicó una anexectomía izquierda.

El estudio peroperatorio anatomo-patológico de la pieza es informado como tumoración compleja, diferenciándose el diagnóstico al estudio con parafina.

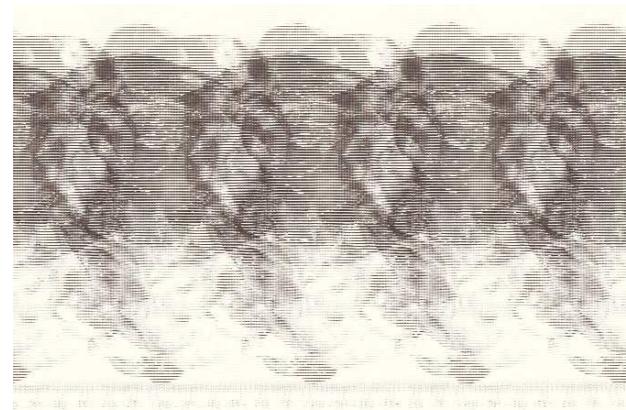


Figura 2. Aspecto macroscópico.

ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO

Descripción macroscópica

Tumoración compleja (fig. 2) de 16 × 10 × 7 cm, de dimensiones máximas que muestra una superficie grisácea y homogénea, ligeramente surcada en la superficie por una fina trama vascular y a cuya apertura se observa una cavidad quística central de 6 cm de dimensión máxima, en cuya pared se observa un área sólida de 8 cm de tonalidad pardusca-grisácea y consistencia blanda, que a los cortes seriados muestra aspecto hemorrágico. Asimismo, en conjunción con las zonas anteriormente descritas, se observa un área poliquística con quistes de paredes homogéneas que albergan un fluido amarillento seroso cuya evacuación permite apreciar diversas excrecencias papilares, la mayor de 4 cm de diámetro máximo.

Descripción microscópica

El estudio de la pieza quirúrgica reveló la ausencia de disrupción capsular e invasión de ésta por la neoplasia. La trompa de Falopio estaba libre de neoplasia.

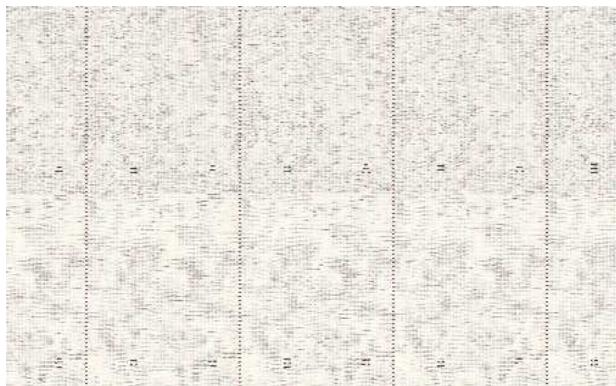


Figura 3. A) Células de la granulosa juvenil (40). B) Cordones de células de Sertoli con diferenciación intermedia (10). C) Cordones celulares (detalle) (40). D) Áreas escasamente diferenciadas (40).

El estudio histológico mostró un parénquima predominantemente edematoso con la presencia de células fusiformes del tipo estroma gonadal sin atipia. Sobre este fondo se identificaron numerosas hileras y cordones de células pequeñas con núcleo hiperchromático y discreta atipia, que recordaban a los cordones sexuales primitivos (células de Sertoli con diferenciación intermedia) (fig. 3), así como nódulos relativamente bien delimitados de células poligonales vacuoladas con núcleo paracentral, sin atipia, que se disponían en torno a luces constituyendo macrofolículos, cuyo contenido fluido mostraba un tono rosa-dedo-eosinofílico. Dichas células presentaban plegaduras nucleares evidentes de modo focal (células de la granulosa). El estudio exhaustivo de la pieza quirúrgica demostró asimismo la presencia de células rojizas poligonales, ligeramente estrelladas en ocasiones, que recordaban a los hepatocitos, con citoplasma granular y gran tamaño (células de Leydig) agrupadas o sueltas entre los cordones celulares anteriormente descritos (fig. 4). La región poliquística macroscópicamente descrita se correspondía en la histología con la presencia de múltiples cavidades quísticas, sin revestimiento epitelial, con contenido fluido seroso transparente en escasa cuantía. En torno a ellas se podía observar un componente fuso celular con patrón seudosarcomatoide, cuyas células

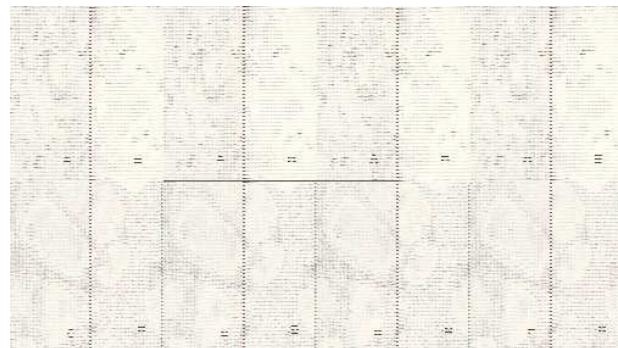


Figura 4. A) Células de Leydig (40). B) Cartílago inmaduro (40). C) Áreas quísticas (10). D) Inmunotinción positiva para inhibina (40).

mostraban una atipia nuclear de grado moderado (componente poco diferenciado). Por último, se observaron muy escasos focos de componente heterólogo de tipo condroide inmaduro. El estudio inmunohistoquímico de la neoplasia demostró inmunopositividad para inhibina, tanto en los cordones de diferenciación intermedia como en el componente de tumor juvenil de la granulosa. Se observó inmunopositividad heterogénea para citoqueratinas y vimentina en el componente de células de Sertoli y en la estroma. La negatividad para alfafetoproteína permitió hacer el diagnóstico diferencial entre las células de Leydig (negativas) y hepatocitos heterólogos (generalmente positivos), mostrando las primeras una clara inmunopositividad para vimentina y alfa-inhibina.

Si bien el elemento heterólogo más frecuente en este tipo de tumores es el epitelial (generalmente mucinoso), hay casos como el nuestro en que éste es de origen mesenquimal (cartílago), que presentan un peor pronóstico, según refiere la bibliografía. Por otro lado, hay que hacer hincapié en el hecho de que tales elementos heterólogos acompañan a las neoplasias de grados intermedio y alto pero no a las de bajo grado.

El diagnóstico definitivo podría establecerse como ginandroblastoma, si bien habría que hacer algunas observaciones. El ginandroblastoma es una neoplasia de aparición excepcional que, según la úl-

tima clasificación de tumores ováricos de la OMS, se define como un tumor compuesto por un tejido bien diferenciado de células de Sertoli y de células de la granulosa (este último constituye al menos el 10% de la lesión). Se trata de neoplasias de comportamiento benigno cuya presentación clínica bien pudiera corresponder con la de nuestro caso. Asimismo, la definición de sus componentes muestra gran analogía con las del tumor de células de Sertoli-Leydig que nos ocupa, si bien el componente de células de Sertoli es principalmente de bajo grado, lo cual contrasta con el predominio de áreas de grados alto e intermedio de nuestro caso. Del mismo modo, la presencia de elementos heterólogos de tipo mesenquimal, aunque infrecuentes en el tumor de células de Sertoli-Leydig, es excepcional en los casos de ginandroblastoma.

Se trataría pues de un tumor de células de los cordones sexuales-estroma de tipo mixto con elementos heterólogos que, catalogado de un modo u otro, constituye una neoplasia del todo infrecuente.

CURSO CLÍNICO

Tras la intervención la paciente evoluciona favorablemente, con un curso postoperatorio normal. En el tercer día de postoperatorio los valores de testosterona habían bajado a 0,445 ng/ml. Es dada de alta en el quinto día postoperatorio.

La paciente es evaluada por el comité de oncología ginecológica y, a pesar de ser estudiada como pT1A, las áreas indiferenciadas con componente heterólogo del tumor le confieren peor pronóstico con mayor probabilidad de recidiva. Pero teniendo en cuenta los deseos de la paciente de preservar la fertilidad, se le explican las diferentes opciones terapéuticas, que van desde la observación a la administración de radioterapia o quimioterapia adyuvante, cuya eficacia aún no ha sido demostrada. Tras esta información la paciente y sus padres eligieron la opción de realizar revisiones periódicas sin recibir tratamiento adyuvante.

Tras 9 meses de control periódico ha experimentado una gran mejoría en el estado de virilización (hirsutismo y timbre de voz), recuperando las menstruaciones normales a los 2 meses tras la intervención. Por el momento, no hay evidencias de recurrencia de la enfermedad.

DISCUSIÓN

Los tumores virilizantes fueron descritos a principios del siglo xx como una entidad aislada, en mujeres en su mayoría en edad reproductiva, casi siempre unilaterales.

Fue Meyer, en 1930, quien les dio el nombre de arrenoblastomas y los clasificó en bien diferenciados, moderadamente diferenciados y mal diferenciados⁴. En 1949 este nombre fue sustituido por androblastoma. Desde 1958, se denominan tumores de células de Sertoli y Leydig. En la actualidad, se utilizan indistintamente este último o androblastoma^{2,7}. Asimismo, fue Meyer, en 1930, el primero en describir el ginandroblastoma^{4,8}.

Ante un cuadro de virilización, hay que confirmar que el origen se encuentra en el ovario o en la glándula suprarrenal. Entre las causas no neoplásicas de androgenización están las formas graves de poliquistosis ovárica, hipertecosis estromal, hiperplasia suprarrenal congénita del adulto, síndrome de Cushing y los andrógenos exógenos. Los valores de testosterona son los que más se elevan en las neoplasias ováricas (más de 2,5 veces sobre su valor normal), a diferencia de la deshidroepiandrosterona [DHEA]-S, la cual se encuentra muy elevada en los tumores virilizantes de las glándulas suprarrenales. Otra característica de toda neoplasia funcional es que causa virilización progresiva de instauración rápida, usualmente en meses^{9,10}.

Cuando son pequeños, no visibles por los métodos de estudio por imagen, es necesaria la cateterización venosa selectiva para descubrir la fuente de andrógenos. El tumor de células de Sertoli-Leydig es poco frecuente, y supone menos del 0,5% de los tumores ováricos. La edad media de las pacientes es de 25 años y las formas de presentación más frecuente son el hirsutismo y el aumento de volumen abdominal^{10,11}.

En el ginandroblastoma^{4,5}, al ser un tumor mixto que contiene células de Sertoli-Leydig y de la granulosa, la producción hormonal suele ser mixta, detectándose en el estudio analítico una elevación de andrógenos y de estrógenos al mismo tiempo, lo que clínicamente puede determinar la aparición de un curioso caso en el que se entremezclan, en grado variable y no siempre constante, signos de virilización y de feminización^{8,12}. En el caso que nos ocupa, sólo se detectó un aumento de testosterona

616

y unos valores de estrógenos dentro de la normalidad, lo cual no es excluyente del diagnóstico de ginandroblastoma, ya que éste va ligado a los hallazgos anatomo-patológicos y no a la clínica.

En el 98% de los casos, la neoplasia es unilateral^{1,9} y con un tamaño medio de 13 cm de diámetro máximo, y de componente quístico y sólido. Frente a la sospecha de malignidad y de un tumor productor de hormonas, la forma de abordarlo debe ser la laparotomía, aunque hay publicaciones que citan la laparoscopia¹¹. No hay evidencia actual sobre qué técnica es la más adecuada, pero en casos bien seleccionados de mujeres jóvenes y con deseo de fertilidad la vía laparoscópica podría ser una alternativa.

El 80% de estos tumores se presenta en estadio IA (FIGO), la mayoría con la cápsula íntegra y son moderadamente diferenciados. Además, el hecho de ser mujeres jóvenes y en edad fértil conduce a una actitud conservadora, considerándose suficiente la realización de una anexectomía simple¹³. Sin embargo, la rotura de la cápsula, una peor diferenciación o un estadio más alto ensombrecen notablemente el pronóstico.

Los tumores se clasifican en grados histológicos, de acuerdo con su diferenciación, en bien diferenciados, moderadamente diferenciados o de diferenciación intermedia y poco diferenciados.

Además, se consideran los siguientes indicadores de peor pronóstico: *a)* el componente heterólogo (que aparece en el 20%), la mayoría de epitelio gástrico o intestinal y, menos frecuentes, los focos de carcinoide¹⁴ o elementos estromales, como el cartílago y el músculo, las células hepatoides, el hueso y el neuroblastoma, y *b)* patrón retiforme (similar a la rete testis).

El grado de diferenciación y el estadio del tumor son más importantes para el pronóstico que la presencia o no de tejido heterólogo¹⁵. En la serie de 207 tumores de Young y Scully sólo 29 tumores fueron clínicamente malignos. Ninguno de los 27 bien diferenciados, y sólo 4 de 100 de diferenciación moderada fueron malignos¹.

La lista de diagnósticos diferenciales en los tumores bien diferenciados incluye: carcinoma endometrioide, tumor de Krukenberg, tumor carcinoide,

tumor de células lipídicas, luteoma y carcinoma de células claras. En los menos diferenciados se incluye: tumor de la granulosa, sarcoma estromal endometrial, sarcomas ováricos, tumor mixto mesodérmico mulleriano, teratomas y tumores mucinosos quísticos.

En casos de duda diagnóstica se puede recurrir a la microscopía electrónica buscando cristales de Charcot-Böttcher en las células de Sertoli y cristaloides de Reinke en las células de Leydig¹⁶.

La inmunohistoquímica ayuda a confirmar el diagnóstico, ya que la alfa-inhibina es positiva tanto en las células de Sertoli como en las de Leydig¹⁷.

En general, los tumores de Sertoli-Leydig se consideran neoplasias de bajo potencial de malignidad^{1,14}. Debido a la edad de las pacientes y que en el 97,5% de los casos se diagnostican en estadio I, el tratamiento quirúrgico de elección es conservador en la mayoría de las pacientes. En el caso del ginandroblastoma la supervivencia es todavía mayor, ya que suelen ser tumores de bajo grado en el componente de células de Sertoli. Sin embargo, en el caso que presentamos, en el componente de células de Sertoli predominan áreas de grado alto e intermedio. Asimismo, la presencia de elementos heterólogos de tipo mesenquimal empeora el pronóstico y es lo que hace este caso tan particular.

La supervivencia a los 5 años oscila entre un 70 y un 90%. La evolución favorable se constata por la normalización de los valores hormonales, el retorno de los ciclos menstruales y la desaparición paulatina de rasgos virilizantes.

En los casos de mujeres posmenopáusicas se aconseja la hysterectomía con anexectomía bilateral¹⁸.

Dada la rareza de los tumores de Sertoli-Leydig, y más aún de los ginandroblastomas, así como los infrecuentes hallazgos de enfermedad avanzada o recurrente, hay poca experiencia en los tratamientos quimioterapéuticos, y menos aún con la radioterapia. Se tiene constancia de un caso de recurrencia fulminante en una paciente embarazada¹⁹. En caso de lesiones avanzadas o recurrentes (inusuales) se aconseja un régimen de quimioterapia basado en platino (VAC) y en la combinación de bleomicina-vinblastina^{18,20}.

BIBLIOGRAFÍA

1. Young RH, Scully RE. Ovarian Sertoli-Leydig cell tumors. A clinico-pathological analysis of 207 cases. *Am J Surg Pathol.* 1985;9:543-69.
2. Young RH. Sertoli-Leydig cell tumors of the ovary: review with emphasis on historical aspects and unusual variants. *Int J Gynecol Pathol.* 1993;12:141-7.
3. Sainz de la Cuesta R, Rock JA, Homsi R, Symonds DA, Horowitz IR. Analysis for steroid production of a Sertoli-Leydig cell tumor. *Gynecol Oncol.* 1994;52:276-80.
4. Novak E. Life and works of Robert Meyer. *Am J Obstet Gynecol.* 1947;53:50-64.
5. Young RH, Scully RE. Sex cord-stromal, steroid cell, and other ovarian tumors with endocrine, paraendocrine, and paraneoplastic manifestations. En: Kurman RJ, editor. Blaustein's pathology of the female genital tract. New York: Springer-Verlag; 2002. p. 905-66.
6. Tavassoli FA, Devilee P. World Health Organization classification of tumors: Tumours of the breast and other genital organs. Lyon: IARC Press; 2003. p. 114.
7. Correa B, Raimundo, Cuello F, Mauricio, Gejman E, Roger, et al. Tumor de células de Sertoli y Leydig del ovario. *Rev Chil Obstet Ginecol.* 2003;68:399-406.
8. Anderson MC, Rees DA. Gynandroblastoma of the ovary. *Br J Obstet Gynaecol.* 1975;82:68-73.
9. Roth LM, Anderson MC, Govan AD, Langley FA, Gowing NF, Woodcock AS. Sertoli-Leydig cell tumors: a clinicopathologic study of 34 cases. *Cancer.* 1981;48:187-97.
10. Zaloudek C, Norris HJ. Sertoli-Leydig tumors of the ovary. A clinico-pathological study of 64 intermediate and poorly differentiated neoplasms. *Am J Surg Pathol.* 1984;8:405-18.
11. Kriplani A, Agarwal N, Roy KK, Manchanda R, Singh MK. Laparoscopic management of Sertoli-Leydig cell tumors of the ovary. A report of two cases. *J Reprod Med.* 2001;46:493-6.
12. Chan R, Tucker M, Russell P. Ovarian ginandroblastoma with juvenile granulosa cell component and raised alpha fetoprotein. *Pathology.* 2005;37:312-5.
13. Hillemanns P, Kimmig R, Arnholdt H. Conservative management of Sertoli-Leydig cell tumor of the ovary. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1997;76:604-5.
14. Young RH, Prat J, Scully RE. Ovarian Sertoli-Leydig cell tumors with heterologous elements (I): gastrointestinal epithelium and carcinoid: a clinic pathologic analysis of thirty-six cases. *Cancer.* 1982;50:2448-56.
15. Kostopoulou E, Talerman A. Ovarian Sertoli-Leydig cell tumor of intermediate differentiation with immature skeletal muscle heterologous elements. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2003;82:197-8.
16. Moltz L, Pickartz H, Sorensen R, Schwartz U, Hammerstein J. A Sertoli-Leydig cell tumor and pregnancy. Clinical, endocrine, radiologic, and electron microscopic findings. *Arch Gynecol.* 1983;233:295-308.
17. Costa MJ, Ames PF, Walls J, Roth LM. Inhibin immunohistochemistry applied to ovarian neoplasms: a novel, effective, diagnostic tool. *Hum Pathol.* 1997;28:1247-54.
18. Salomone M, Wapnirsky H, Medina Milanesi R. Virilización por tumor ovárico de Leydig en paciente posmenopásica tratada con tamoxifeno. *Arch Gin Obstet.* 2002;40:30-7.
19. Widschwendter M, Meduri G, Loosfelt H, et al. Fulminant recurrence of a Sertoli-Leydig cell tumour during pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol.* 1999;106:284-5.
20. Gershenson DM, Morris M, Burke TW, Levenback C, Matthews CM, Wharton JT. Treatment of poor-prognosis sex cord-stromal tumors of the ovary with the combination of bleomycin, etoposide, and cisplatin. *Obstet Gynecol.* 1996;87:527-31.