

# Descripción clínica y anatomopatológica de dos casos de holoprosencefalia

*Julio Cesar Mantilla\**  
*Hipólito Gutiérrez Rueda\*\**  
*Luis Miguel Jaimes Hernández\*\**

## RESUMEN

La holoprosencefalia es una de las más graves y la más común de las malformaciones cerebrales y faciales; consiste en la diverticulación nula o incompleta del prosencéfalo embrionario hacia los hemisferios cerebrales y ventrículos laterales; se acompaña de defectos en las estructuras de la línea media como boca y nariz, es de aparición temprana en el desarrollo del sistema nervioso central y ocurre como consecuencia de una posible falla en un conjunto de moléculas, que incluyen la proteína Sonic Hedgehog y a la superfamilia de genes BMP, indispensables para la formación normal del encéfalo; además, se ha asociado con anomalías en los cromosomas 13, 3, 7 y 18. Hasta el momento, el diagnóstico y clasificación es anatomopatológico. Se describen dos casos de la variante semilobar diagnosticados por ecografía, y posteriormente por necropsia. El objetivo de este artículo es exponer dichos casos y hacer una breve descripción del mecanismo fisiopatológico implicado. (MED.UIS. 2008;21(2):103-9)

Palabras clave: Holoprosencefalia. Aberraciones cromosómicas. Paladar fisurado.

## INTRODUCCIÓN

El término holoprosencefalia (HPE) hace referencia a la más común de las malformaciones cerebrales y faciales que afectan al hombre; agrupa un complejo conjunto de malformaciones congénitas del Sistema Nervioso Central (SNC); esta se caracteriza básicamente por la falta de desarrollo completo de los hemisferios cerebrales y la pobre división de los mismos. Aunque es una malformación frecuente del SNC, rara vez se ha descrito en Bucaramanga (Colombia)<sup>1</sup>. El objetivo de este artículo es exponer dos casos diagnosticados por necropsias y hacer una breve descripción del mecanismo fisiopatológico

implicado en la misma. La prevalencia de esta malformación en los Estados Unidos es de 4,8 por cada 100 000 nacidos vivos, y en niñas de 4,2 por cada 100 000 nacidas vivas<sup>2</sup>, Uno de los mayores estudios realizados en Colombia arroja prevalencias para la holoprosencefalia menores de 1 por cada 100.000 nacidos vivos, pero son datos que carecen de validez epidemiológica, considerando los casos sin diagnosticar, o que no son reportados, y constituyen más del 70% de los casos<sup>3</sup>.

## PRESENTACIÓN DE LOS CASOS CLÍNICOS

### CASO N° 1

Recién nacido de sexo femenino, producto de la tercera gestación de una madre de 38 años, procedente de Bucaramanga, con 36 semanas de gestación. Durante el control prenatal realizado al cuarto mes de embarazo, una ecografía en el Hospital Local del Norte reportó dilatación moderada de los ventrículos laterales, con solución de continuidad frontal y encefalocele, por lo que se recomendó ecografía de tercer nivel. Diez días después practican nueva ecografía que muestra embarazo único flotante de 19

\*MD patólogo. Director Departamento de patología. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga. Colombia.

\*\*Estudiante VIII semestre de Medicina. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga. Colombia.

Escuela de medicina, Facultad de Salud. Universidad Industrial de Santander. Carrera 32 No. 29-31. Bucaramanga, Colombia.  
e-mail: gutierrezhipolito@hotmail.com

Artículo recibido el 11 de febrero de 2008 y aceptado para publicación el 4 de junio de 2008.

semanas cuatro días, hidrocefalia y probable encefalocele frontal (Figura 1).

El 24 de diciembre de 2004, se realiza ecografía de tercer nivel, que evidencia retardo del crecimiento intrauterino asociado a severo dimorfismo craneofacial, que sugiere cromosomopatía. Posteriormente, se realiza amniocentesis para estudio genético prenatal, que informa constitución cromosómica 47, XX+13 en todas las metafases analizadas, sin evidencia de alteraciones estructurales (Trisomía 13 libre y universal). Se realiza además estudio para TORCH, que informa Elisa positivo para Rubéola, IgG positiva para Citomegalovirus e IgG positiva para Herpesvirus. Otras pruebas realizadas fueron hemoclasificación: grupo sanguíneo O Rh(-). Se remite al servicio de alto riesgo obstétrico del Hospital Universitario de Santander (HUS), donde continúa controles de su embarazo. El día 30 de marzo de 2005, ingresa a la institución para atención de parto. Parto vaginal espontáneo, se obtiene recién nacido de sexo femenino, con Apgar de 2 al minuto y 1 a los 5 minutos, quien presenta múltiples malformaciones faciales, dificultad respiratoria severa y bradicardia, fallece aproximadamente una hora después del nacimiento. Se remite feto y placenta para estudio de anatomía patológica.

En la necropsia al examen externo se encuentra un recién nacido de sexo femenino, con malformaciones congénitas externas a nivel craneofacial, peso de 2200 g, talla de 44 cm y perímetro cefálico 32,5 cm, en la cara, no hay proceso frontonasal, en medio de la región frontal se reconoce probóscide cilíndrica de 2 cm de longitud por 1 cm de diámetro, con orificio central de 0,2 cm, ausencia de globos oculares y en su lugar, justo por debajo de la probóscide descrita, se reconoce apertura de forma romboidal, que mide 1,7



Figura 1. Imagen ecográfica en donde se aprecia una sola cavidad (holosfera), probable hidrocefalia y dimorfismo facial. Imagen: Dr. Joaquín Gonzáles.



Figura 2. Recién nacido, femenino, en donde se pueden ver los defectos de línea media, probóscide cilíndrica de 2 cm. de longitud por 1 cm. de diámetro, no hay ojos, en cambio se evidencia un orificio tipo ciclope. Fotografía: Dr. Julio Cesar Mantilla.

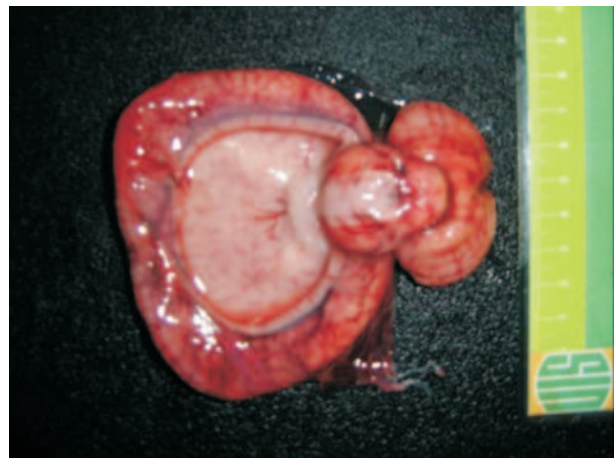


Figura 3. Se aprecia un encéfalo con una sola cavidad ventricular (holosfera) no hay división de los hemisferios, además de atrofia del parénquima cerebral. Fotografía: Dr. Julio Cesar Mantilla.

x 0,8 cm, que hace las veces de hendidura palpebral única, en cuyo interior no se identifica globo ocular, característica de la ciclope. Los pabellones auriculares tienen forma y tamaño normal para la edad, con adecuada implantación, micrognatia, los labios son finos, de tonalidad cianótica, el tórax es simétrico, sin alteraciones, la distancia entre los botones mamarios es de 7 cm. El ano es permeable y los genitales externos son femeninos, normales para la edad. En las extremidades no hay alteraciones (Figura 2)

Al realizarse el estudio de las cavidades se destaca, encéfalo que pesa 110 gramos, con fusión de ambos hemisferios y ausencia de cuerpo calloso, al corte hay severa dilatación del sistema ventricular, con atrofia secundaria del parénquima cerebral. (Figura 3)

## CASO N° 2

Recién nacido de sexo masculino (Figura 4), producto de la sexta gestación de una madre de 45 años, procedente de Bucaramanga, con 36 semanas de gestación, consulta al HUS por trabajo de parto, dolor abdominal y sangrado genital. Se examina en el servicio de urgencias obstétricas, encontrando paciente con pre-eclampsia severa, síndrome HELLP, en trabajo de parto con abrupcio de placenta, por lo que se le realiza cesárea de urgencia, obteniéndose recién nacido de sexo masculino, con Apgar de 3 al minuto y de 3 a los 5 minutos, con malformaciones cráneo faciales y en extremidades, con dificultad respiratoria progresiva, que no cede al tratamiento instaurado en el servicio de recién nacidos y fallece aproximadamente una hora después del nacimiento. Se remite feto y placenta para estudio en el departamento de patología.

En la necropsia al examen externo se encuentra un recién nacido de sexo masculino, con malformaciones congénitas externas a nivel craneofacial, abdominal y en extremidades, pesa 2200 g, talla de 44 cm, perímetro cefálico de 28 cm. En la cara no hay proceso frontonasal, ni nariz, los ojos son de color café, sin alteraciones. Los pabellones auriculares tienen forma y tamaño normal para la edad, con adecuada implantación, micrognatia, con labio hendido bilateral y paladar hendido completo. En las extremidades superiores se aprecia polidactilia postaxial bilateral por pequeño apéndice sobre el borde cubital de la falange proximal del quinto dedo



Figura 4. Aspecto general de recién nacido masculino, en donde se aprecia defecto facial, no hay nariz, labio leporino bilateral y paladar hendido completo, además onfalocele. Fotografía: Dr. Julio Cesar Mantilla

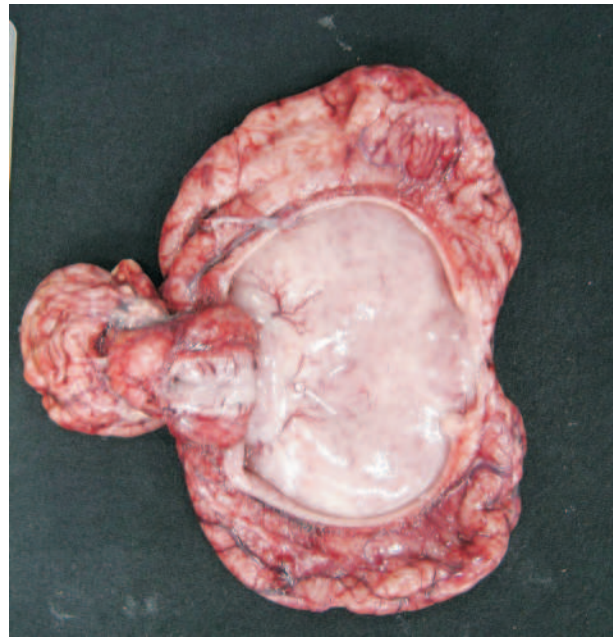


Figura 5. Aspecto de cerebro con fusión de ambos hemisferios, se observa una sola cavidad (holosfera), y atrofia secundaria del parénquima cerebral. Fotografía Dr. Julio Cesar Mantilla.

de ambas manos y en los pies se reconoce talón prominente que sobresale hacia la parte posterior.

En el abdomen se observa onfalocele y al realizar evacuación de las asas intestinales se reconoce persistencia del conducto onfalomesenterico.

Al examen interno se encuentra encéfalo que pesa 100 g (Figura 5), con fusión de ambos hemisferios y ausencia de cuerpo caloso, al corte hay severa dilatación del sistema ventricular, con formación de una cavidad quística de forma redondeada, con atrofia secundaria del parénquima cerebral. No hay alteraciones en diencéfalo, en tallo cerebral, ni en cerebelo.

## DISCUSIÓN

La HPE se define como un conjunto de malformaciones craneofaciales que compromete estructuras del SNC y la cara. Esta malformación se presenta debido a una falla en el desarrollo del cerebro anterior, probablemente por error en el crecimiento de la porción anterior final del tubo neural. Desde el punto de vista morfológico, se distinguen clásicamente tres formas de holoprosencefalia: lobar, semi-lobar y alobar<sup>4</sup>; recientemente se ha descrito una cuarta forma llamada variante interhemisférica de línea media o sintelencefalia<sup>5</sup>. Esta clasificación se basa en el grado de compromiso de los lóbulos cerebrales, pero más exactamente en la presencia o ausencia de

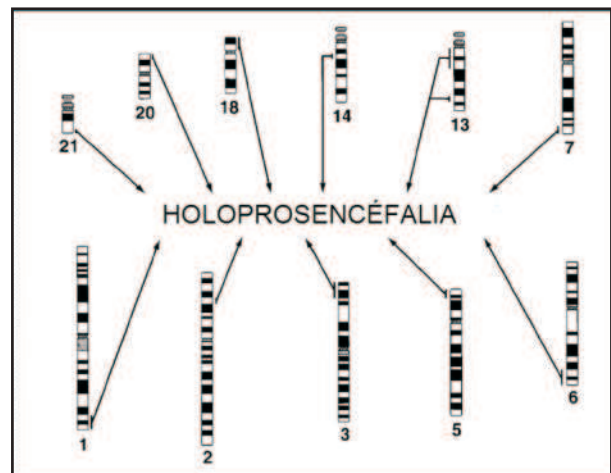


la cisura interhemisférica. En su forma más grave, la variante alobar, no existe esta cisura y se presenta generalmente asociada a microencefalia, en la forma semilobar se reconoce una cisura interhemisférica parcial, pero ésta no se extiende a la parte más rostral del cerebro como en los presentes casos; y en la forma lobar se denota la presencia de una cisura que divide virtualmente los hemisferios, excepto en sus extremos rostral y caudal, además se conserva un solo ventrículo (holoesfera). La variante sintelencefálica adicionada recientemente, consiste en una continuidad anormal de la línea media en las regiones frontales y parietales de los hemisferios cerebrales.

La HPE se asocia en la gran mayoría de los casos, a diversos defectos de las estructuras de la línea media de la cara, constituyendo las malformaciones oculares las de mayor incidencia, seguidas por las malformaciones nasales, del oído, la boca y el paladar. DeMeyer en 1964 al estudiar un grupo de pacientes con HPE, observó una estrecha relación entre la gravedad de las malformaciones faciales, y la severidad de las anomalías del SNC, esta observación le permitió concluir: "La cara predice al cerebro"<sup>2</sup>, un aforismo de gran utilidad en la evaluación inicial de estos casos, ya que al mismo tiempo sugiere la existencia de una vía conjunta en el desarrollo normal del prosencéfalo y de las estructuras faciales de la línea media.

Además de las malformaciones faciales descritas, que son las de mayor ocurrencia en la HPE, se ha encontrado un exceso en la incidencia de probóscide y nariz "chata" en las mujeres y de arrinia en los varones. Las anomalías faciales más severas afectan en mayor proporción a las mujeres, mientras que las anomalías como labio leporino y paladar hendido a los varones, aunque la razón de dicha asociación no se ha establecido claramente. La forma alobar de la HPE, se ha encontrado fuertemente asociada a las formas más severas de malformaciones nasales y oculares<sup>6</sup>.

La primera evidencia morfológica de inducción neural, aparece a la tercera semana de gestación, con la formación de la placa neural, que al plegarse y fusionar sus bordes, origina el tubo neural hacia el día 22, cuyos extremos permeables, los neuroporos anterior y posterior, se obliteran el día 24 y 26 respectivamente<sup>7</sup>. En esta etapa inicial, el tubo neural muestra dos divisiones que dan origen a la medula espinal y al encéfalo primitivo. Dentro de este último, se identifican tres dilataciones: prosencéfalo o cerebro anterior, mesencéfalo o cerebro medio y romboencéfalo o cerebro posterior. Hacia el día 36, se presenta la división del prosencéfalo en telencéfalo y diencéfalo



**Figura 6.** Once de los posibles genes implicados en la patogénesis de la HPE, se ha visto especial importancia en los cromosomas 13 y 21. Adaptado de Roessler E., Muenke M. Holoprosencephaly: A paradigm for the complex genetics of brain development. *J. Inher. Metab. Dis.* 21 (1998) 481-497

y del romboencéfalo en metencéfalo y mielencéfalo, mientras que el mesencéfalo no se divide, quedando así el encéfalo primitivo dividido en cinco vesículas<sup>8-9</sup>. La formación de los hemisferios cerebrales ocurre a la quinta semana de gestación, a partir del telencéfalo<sup>10</sup>.

El momento en que se genera el mecanismo desencadenante de la HPE, no está muy bien precisado, ya que si se tiene en cuenta sólo el evento de la formación de los hemisferios cerebrales, ésta se instalaría a partir de la quinta semana, sin embargo, la HPE en la gran mayoría de los casos cursa con malformaciones oculares, nasales, del oído y la boca, estructuras que se desarrollan entre los días 18 y 28 del período embrionario lo que hace suponer un origen más temprano de esta malformación. Así por ejemplo, los primordios ópticos aparecen muy temprano a la tercera semana de desarrollo a cada lado del prosencéfalo y una falla en su desplazamiento lateral alrededor del día 18, origina ciclopía; pero si la falla surge un poco más tarde, hacia el día 20, se presenta sinoftalmía. El hipotelorismo junto con la fusión ocular, constituyen defectos de aparición más tardía, pero anteriores a que se produzca la migración completa del primordio óptico. Es importante resaltar que aunque frecuentes, los defectos antes mencionados, no acompañan de manera constante a la HPE<sup>11</sup>.

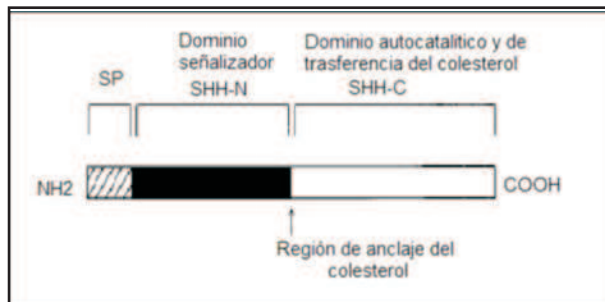
Las causas implicadas en la aparición de la HPE no están del todo claras, por lo que es necesaria la investigación experimental en modelos animales, aunque se han involucrado agentes teratogénicos como la *Veratum californicum*, una planta que

contiene alcaloides que inhiben la síntesis de colesterol; la diabetes materna, el consumo de alcohol etílico durante los estadios tempranos del embarazo<sup>11</sup>, el ácido retinóico, la hipervitaminosis A y la infección materna por citomegalovirus. Todas las condiciones anteriores tienden a confluir en un defecto en la vía de señalización del gen “Sonic Hedgehog” (Shh), asociado estrechamente con la biosíntesis de colesterol.

Por lo menos doce locus genéticos se encuentran implicados en la patogénesis de la HPE, especialmente los defectos en el cromosoma 13 y 21, lo que concuerda con nuestro hallazgo del primer caso reportado, aunque en el segundo no se realizaron estudios genéticos<sup>12</sup> (Figura 6).

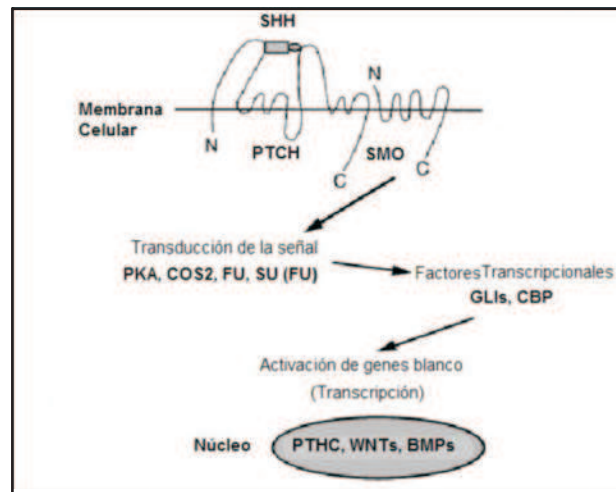
El neuroectodermo es inducido por el mesodermo adyacente especializado. Esta inducción es mediada por la proteína SHH, producto de la expresión del gen Shh. Primero al expresarse en la notocorda, la proteína SHH induce a la línea media de la placa neural para que se convierta en una región especializada del tubo neural conocida como la placa del piso que al ser inducida, comienza a expresar la molécula SHH<sup>12</sup>. En contraste con la relativa claridad que se tiene acerca del desarrollo del romboencéfalo y de la medula espinal, las bases moleculares del desarrollo de la porción rostral del neurotubo sólo hasta ahora comienzan a ser dilucidadas, lo que constituye un gran vacío en la explicación fisiopatogénica de esta alteración.

El mecanismo fisiopatológico de la HPE, se ha relacionado con la vía Shh. El gen Shh expresa una proteína SHH (Figura 7), la cual posee un dominio amino terminal y otro carboxilo terminal, este último con actividad catalítica que causa autoproteólisis, con la consecuente transferencia de un par de



**Figura 7.** Esquema general de la proteína SHH, en el que se muestran los dos dominios, señalizador (en negro) y autocatalítico (en blanco), además de la región de anclaje al colesterol.

Adaptada de Roessler E., Muenke M. Holoprosencephaly: A paradigm for the complex genetics of brain development. *J. Inher. Metab. Dis.* 21 (1998).



**Figura 8.** Vía de activación de los genes 15 indispensables para la formación de las estructuras craneofaciales de la línea media y del prosencefalo. Se aprecia el receptor para la proteína SHH, su correceptor que provoca la actuación de factores transcripcionales que posteriormente activaran los genes blanco<sup>11</sup> en el núcleo.

Adaptado de Cohen M Michael, Shiota J Kohei. Teratogenesis of Holoprosencephaly. *American Journal of Medical Genetics* 2002. 109:1–15.

moléculas de colesterol (CHOL) al dominio amino terminal, donde se liga por un enlace covalente. La parte señaladora activa, es decir la porción SHH-amino, es secretada a la superficie celular, mientras que la porción catalítica SHH-carboxi se disemina sin actividad biológica comprobada<sup>11</sup>.

El extremo SHH-amino posee dos formas, una ligada por enlace covalente a un colesterol CHOL en el COOH terminal, y la otra forma con su porción COOH ligada a un CHOL y un grupo palmítico en el amino terminal. Aunque las dos formas se encuentran in vivo, la función de la variante asociada al ácido palmítico es desconocida. La importancia del par de moléculas de colesterol en el desarrollo humano ha sido demostrada con la presencia de HPE como manifestación secundaria del síndrome de Smith-Lemli-Opitz<sup>14</sup>, el cual es causado por un bloqueo enzimático en la 7-dehidrocolesterol reductasa, la cual constituye el penúltimo paso en la biosíntesis del colesterol<sup>15</sup>. La evidencia de estos defectos en el metabolismo del colesterol sugiere a la hipocolesterolemia materna como un factor crítico en el desarrollo de anomalías congénitas<sup>16</sup>.

La proteína SHH es un ligando para una Proteína de Adhesión Transmembrana (PTC)<sup>17</sup>. Una vez que es secretada SHH, está se adhiere al receptor PTC, el cual interactúa con factores transcripcionales de la familia ZIC<sup>18</sup> (factores transcripcionales zinc-señaladores homólogos a la droshophila). Estos

factores translocan en el núcleo un complejo multiproteico, adherido a los microtúbulos del citosol, y conducen a una regulación de los genes blanco del SHH: el receptor PTC y los genes de la familia de la Proteína Morfogénica Ósea (BMP)<sup>9</sup> y WNT (wingless), que son críticos en la formación de la mayoría de las estructuras craneofaciales (Figura 8).

En ausencia de SHH, una de las funciones de la PTC es suprimir la activación de estos genes; en la membrana celular también existe un correceptor para SHH, el SMO (smothered). Además, en el citoplasma existen una serie de proteínas cinasas (serin-threonina protein kinases), que mantienen un estado de fosforilación que es modificado por una proteína cinasa dependiente del AMP cíclico. El objetivo de todo esto es permitir la expresión de genes críticos en el desarrollo del SNC<sup>19</sup>.

En síntesis, la proteína SHH produce una cascada de reacciones, desde la activación de genes blanco específico como la PTC y al mismo tiempo produce diversos efectos indirectos sobre los genes miembros de la familia WNT y BMP críticos en la mayoría de las estructuras craneofaciales. Cabe destacar que el gen además de influir sobre el desarrollo del SNC, también interviene en el desarrollo normal del ojo<sup>20</sup>.

## CONCLUSIÓN

La HPE es la más común de las malformaciones craneofaciales. Si el interés principal, como en este caso, es la descripción morfológica, se debe emplear la clasificación anatómica, que agrupa la HPE en cuatro categorías: alobar, semilobar, lobar y sintelencefálica. Algunos casos de HPE, pueden estar asociados con alteraciones cromosómicas como la trisomía 13 y con otras anomalías del sistema nervioso central. Dentro de las diversas teorías implicadas en la génesis de la HPE, las alteraciones en la expresión del gen *shh*, encargado de la expresión de moléculas claves en el desarrollo normal del prosencéfalo y estructuras craneofaciales de la línea media, constituyen la de mayor vigencia actual.

## SUMMARY

**Clinical and anatomopathological description of two holoprosencephaly cases.**

The holoprosencephaly is one of the most serious and common among the facial and brain malformations; it consists in the incomplete or null diverticulation of the embryonic prosencephalon through the brain hemispheres and lateral ventricles; is accompanied by defects of the middle line structures, as mouth and nose, it has an early showing in the development of the central nervous system, and it occurs as a consequence of a possible failure over a set of molecules, that include

the Sonic Hedgehog protein, and the superfamily genes BMP, indispensable to the normal formation of the encephalon, moreover it has been associated with anomalies over the 13, 3, 7 and 18 chromosomes. Till now, the diagnostic and classification is anatomic-pathologic. It describes two cases of the semilobar diagnostic by ecography, and later by necropsy. The objective of this article is to expose these cases and do a brief description of the physiopathology involve mechanism (MED. UIS. 2008;21(2):103-9).

**KEY WORDS:** Holoprosencephaly. Chromosome Aberrations. Cleft Palate.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cohen MM. Problems in the Definition of Holoprosencephaly. *Am J Med Genet.* 2001;103:183.
- DeMyer W, Zeman W, Palmer C. The face predicts the brain, diagnostic significance of median facial anomalies from holoprosencephaly (arhinencephaly). *Pediatrics.* 1964;34:711-8.
- Dubourg C, Bendavid C, Pasquier L, Henry C, Odent S, David V. Holoprosencephaly. *Orphanet J Rare Dis.* 2007;2(2):8.
- Towards a greater understanding of the pathogenesis of holoprosencephaly. *Brain & Development.* 1999;21:513-21.
- Biancheri R, Rossi A, Tortori-Donati P, Stringara S, Bonifacio S, Minetti C. Middle interhemispheric variant of holoprosencephaly: A very mild clinical case. *NEUROLOGY.* 2004;63:2194-6.
- Olsen Carolyn L, Hughes Jeffery P, Youngblood Lois G, Sharpe-Stimac Monica. Epidemiology of Holoprosencephaly and Phenotypic Characteristics of Affected Children: New York State, 1984-1989. *American Journal of Medical Genetics.* 1997;73:217-26.
- Roessler E., Muenke M. Holoprosencephaly: A paradigm for the complex genetics of brain development. *J. Inher. Metab. Dis.* 1998.
- Moore, K.I. y Persaud, T.V. Embriología clínica séptima edición. Mc. Graw Hill, Philadelphia, Pennsylvania, USA, 2006.
- Monuki ES. The morphogen signaling network in forebrain development and holoprosencephaly. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2007;66(7):566-75.
- Ten Donkelaar HJ. Major events in the development of the forebrain. *Eur J Morphol.* 2000;38(5):301-8.
- Cohen MM Jr, Shiota K. Teratogenesis of holoprosencephaly. *Am J Med Genet.* 2002;15;109(1):1-15.
- Muenke M, Beachy PA. Genetics of ventral forebrain development and holoprosencephaly. *Curr Opin Genet Dev.* 2000;10(3):262-9.
- Nanni L, Schelper RL, Muenke M. Molecular genetics of holoprosencephaly. *Frontiers in Bioscience.* 2000;334-42.
- Battaile KP, Steiner RD. Smith-Lemli-Opitz syndrome: the first malformation syndrome associated with defective cholesterol synthesis. *Mol Genet Metab.* 2000;71(1-2):154-62.
- Marcos J, Shackleton CH, Buddhikot MM, Porter FD, Watson GL. Cholesterol biosynthesis from birth to adulthood in a mouse model for 7-dehydrosterol reductase deficiency (Smith-Lemli-Opitz syndrome). *Steroids.* 2007;72(11-12):802-8.
- Roux C, Wolf C, Mulliez N, Gaoua W, Cormier V, Chevy F, Citadelle D. Role of cholesterol in embryonic development. *Am J Clin Nutr.* 2000;71(5 Suppl):1270S-9S.
- Cohen MM Jr. Holoprosencephaly: clinical, anatomic, and molecular dimensions. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2006;76(9):658-73.

18. Grinberg I, Millen KJ. The ZIC gene family in development and disease. *Clin Genet.* 2005;67(4):290-6.
19. Krauss RS. Holoprosencephaly: new models, new insights. *Expert Rev Mol Med.* 2007 2;9(26):1-17.
20. Cohen MM Jr. The hedgehog signaling network. *Am J Med Genet A.* 2003;123(1):5-28.