

## LAPAROSCOPIA VERSUS MINILAPAROTOMIA IN PAZIENTI CON MIOMI UTERINI SINTOMATICI: DATI INTRAOPERATORI E RIPRODUTTIVI

*Cristiano Alex De Marzi MD<sup>a</sup>, Raffaele Tinelli MD<sup>a</sup>, Andrea Tinelli MD<sup>a</sup>, Francesco Giuseppe Tinelli MD<sup>a</sup>, Antonio Malvasi MD<sup>b</sup>, Addolorata Pastore MD<sup>a</sup>*

<sup>a</sup> Dipartimento di Ostetricia e Ginecologia, Ospedale Vito-Fazzi, Lecce.

<sup>b</sup> Dipartimento di Ostetricia e Ginecologia, Clinica Santa-Maria, Bari.

**Scopo:** L'obiettivo del nostro studio è stato quello di confrontare retrospettivamente la fattibilità, sicurezza, morbidità e fertilità dopo miomectomia laparoscopica (LPS) e minilaparotomica (LPT) nel trattamento dei miomi uterini sintomatici.

**Materiali e Metodi:** tra Gennaio 2002 e Gennaio 2008 580 donne con miomi uterini sintomatici sono state ricoverate per sanguinamento uterino anomalo, infertilità, poli-abortività e dolore e sottoposte a miomectomia laparoscopica (LPS) o minilaparotomica (LPT) presso il centro di Ginecologia Mini-Invasiva dell'Ospedale Vito-Fazzi, Lecce e sono state retrospettivamente incluse nel nostro studio.

**Risultati:** Il tempo operative medio è stato di circa 63 minuti  $\pm$  21 (95% CI 48-143) nel gruppo LPS e 57 minuti  $\pm$  23 (95% CI 38-121) nel gruppo LPT ( $p=0.059$ ). La perdita ematica media è stata di 145 ml  $\pm$  39 nel gruppo LPS (95% CI 45-260) e 195 ml  $\pm$  52 nel gruppo LPT (95% CI 50-290) ( $p<0.01$ ). Il tempo medio di ospedalizzazione è stato maggiore nel gruppo LPT ( $3.1 \pm 0.5$ , 95% CI 1-5) che LPS ( $2.1 \pm 0.8$ , 95% CI 1-4) ( $p<0.01$ ). Il tasso globale di gravidanze spontanee conseguente a miomectomia è stato del 53 %; il tasso di gravidanze dopo miomectomia LPS (56 %) non è stato significativamente più alto rispetto alla miomectomia LPT (50 %).

**Conclusioni:** La laparoscopia ha mostrato una più bassa morbidità rispetto a quella riportata nella chirurgia minilaparotomica ed è risultata essere caratterizzata da minori perdite ematiche intraoperatorie e più breve ospedalizzazione, con un più alto tasso di gravidanze.

Il tempo operative medio non è stato significativamente più lungo nel gruppo laparoscopico e le complicanze intraoperatorie e postoperatorie sono apparse accettabili e non superiori a quelle tradizionalmente verificatesi nell'approccio minilaparotomico.

**Introduzione:** L' introduzione di nuove tecniche chirurgiche mini-invasive e della laparoscopia nel trattamento di numerose patologie ginecologiche ha determinato numerosi vantaggi per la paziente come una più breve ospedalizzazione ed un più rapido recupero della normale attività quotidiana <sup>1,2</sup>.

La laparoscopia ha dimostrato essere una valida alternativa alla tecnica standard open con evidenti vantaggi e risultati a lungo termine paragonabili ed una più breve ospedalizzazione, minore morbilità e migliore qualità di vita. Tuttavia, la miomectomia laparoscopica può in alcuni casi essere una procedura difficile, specialmente per miomi di grande volume <sup>3,4</sup>.

Nel 1996, uno studio propose la minilaparotomia (LPT) come una valida ed efficace alternativa alla laparoscopia nel trattamento delle patologie ginecologiche benigne e l'uso della LPT nel trattamento dei miomi uterini è già stato esaminato in un altro studio <sup>5</sup>.

Un recente studio ha dimostrato che la minilaparotomia rappresenta una sicura ed efficace alternativa chirurgica mini-invasiva e può essere utilizzato nel management delle patologie benigne e neoplastiche <sup>6-9</sup>.

Sebbene diversi studi hanno confrontato la miomectomia eseguita per via laparoscopica e laparotomica <sup>10-13</sup>, sono disponibili pochi dati a lungo termine sull'efficacia e la morbilità degli approcci laparoscopici e minilaparotomici nel trattamento dei miomi uterini.

Scopo del nostro studio è stato quello di confrontare la fattibilità, sicurezza, morbilità e i dati riproduttivi in una serie di 580 donne con miomi uterini sintomatici e sottoposte a miomectomia laparoscopica (LPS) o minilaparotomica (LPT).

**Materiali e Metodi:** Tra Gennaio 2002 e Gennaio 2008 580 donne con miomi uterini sintomatici sono state sottoposte a miomectomia laparoscopica (LPS) o minilaparotomica (LPT) presso il centro di Ginecologia Mini-Invasiva dell'Ospedale Vito-Fazzi, Lecce e sono state retrospettivamente incluse nel nostro studio.

Tutte le pazienti che sono state sottoposte a LPS sono state informate che sarebbe stata eseguita una LPT in caso di difficoltà incontrata durante l'approccio laparoscopico e tutte le donne hanno dato il consenso informato.

Le indicazioni principali per la miomectomia sono state sanguinamento uterino anomalo, infertilità inspiegata, poliabortività e dolore.

La diagnosi di infertilità inspiegata è stata fatta dopo esclusione di anomalie endocrinologiche, e di infertilità legata ad anomalie tubariche dopo dosaggi ormonali, isterosalpingografia e spermogramma. Sono state escluse le pazienti i cui partner hanno presentato severa oligoastenospermia.

Criteri di inclusione sono stati miomi sottosierosi o intramurali sintomatici da circa 3 a 10 cm, numero di miomi da 1 a 5.

250 pazienti sono state sottoposte a miomectomia LPS e nessuna è stata convertita in laparotomia e 230 pazienti sono stati sottoposti a miomectomia LPT.

La decisione tra le due procedure mini-invasive è stata presa prima dell'intervento in base alla preferenza del chirurgo ed in base alle caratteristiche della paziente e del mioma.

Le pazienti non sono state considerate candidate per la LPS e sono state sottoposte a LPT in presenza di uno dei seguenti fattori: una significativa patologia cardio-polmonare, infarto del miocardio, angina instabile, o broncopneumopatia ostruttiva polmonare controindicante il Trendelenburg; precedente radioterapia ad domino-pelvica; scarsa funzionalità epatica, renale. Precedenti interventi chirurgici addominali non sono stati considerati una controindicazione all'intervento chirurgico laparoscopico. Tutti le pazienti che presentavano una di queste patologie sono state sottoposte a LPT.

Criteri di esclusione sono stati: miomi sottomucosi, controindicazioni per l'anestesia generale, infezioni sistemiche, presenza di più di 5 miomi uterini e di miomi con diametro medio maggiore di 10 cm, anomali annessiali ecograficamente accertate, anomalo Pap test, e test di gravidanza positivo.

Tutte le pazienti sono state sottoposte ad esame pelvico ed eco-ttransvaginale con color Doppler per la valutazione del numero, localizzazione e dimensione del mioma, presenza/assenza di malattie pelviche e ad isteroscopia diagnostica per escluderela presenza di un mioma sottomucoso.

Tutte le pazienti sono state sottoposte ad antibiotico profilassi (cefotina 2 g endovena) e profilassi con eparina a basso peso molecolare (40 mg/24h subcutaneously).

Le caratteristiche riportate di seguito sono state età, parità, peso, altezza, body mass index (BMI), tempo operativo, perdite ematiche medie, numero di trasfusioni, ospedalizzazione, complicanze intraoperatorie e postoperatorie, dati riproduttivi.

Il decline medio dell' emoglobina è stato determinato 24 ore dopo chirurgia.

Tutte le pazienti sono state sottoposte ad esame ginecologico ed ecografico per verificare la ricorrenza del mioma 6 mesi dopo l'intervento chirurgico.

Delle 680 pazienti che hanno eseguito la miomectomia, 164 erano desiderose di gravidanza dopo chirurgia e sono state considerate per questo studio: di queste 91 avevano eseguito miomectomia LPS e 73 LPT.

Informazioni riguardo i pazienti sono state ottenute dai registri ospedalieri, medici o direttamente dalle pazienti. Informazioni riguardo le pazienti desiderose di prole sono state raccolte anche attraverso interviste telefoniche. La lunghezza media del follow-up è stata di circa 35 mesi (range, 4-63).

**Analisi Statistica:** Il test di  $\chi^2$ , il test di Fisher, il Mann-Whitney U test, ed il Student's *t* test sono stati utilizzati per l'analisi statistica.

Variabili con normale distribuzione sono stati espressi come media ( $\pm$  deviazione standard) ed 95% CI. Variabili Nonparametriche sono state espresso come mediana e range.

Il tasso globale di gravidanza è stato calcolato con il metodo di Kaplan-Meier, e la differenza tra i due gruppi è stata calcolata con il long-rank test.

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il Statistical Package for Social Science for Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL). Un valore di  $P < 0.05$  è stato considerato statisticamente significativo.

**Risultati:** Età, BMI, numero, diametro, tipo e localizzazione dei miomi rimossi sono risultati simili nei due gruppi.

Varie caratteristiche delle pazienti sono esposte nella Tabella 1.

Il tempo operative medio è stato di circa 63 minuti  $\pm$  21 (95% CI 48-143) nel gruppo LPS e 57 minuti  $\pm$  23 (95% CI 38-121) nel gruppo LPT ( $p=0.059$ ).

Nella nostra esperienza, nessun paziente ha richiesto trasfusione intra o post-operatoria nei due gruppi e nessun paziente ha eseguito un secondo intervento chirurgico nel gruppo LPT.

Febbre post-operatoria è stata riportata in 17 pazienti (5.4 %) che sono state sottoposte a miomectomia LPS ed in 21 pazienti (6.3 %) che sono state sottoposte a miomectomia LPT ( $p=0.45$ ).

In un paziente del gruppo LPS abbiamo osservato ematoma post-operatorio nelle prime 24 ore dopo chirurgia come netto calo di emoglobina risolto con emostasi con bipolare e punti staccati sulla parete uterina per via LPS dopo che la cavità è stata adeguatamente drenata e senza convertire in LPT. Nessuna deiscenza della parete chirurgica è stata osservata nei primi 30 giorni dopo chirurgia nei due gruppi. Nessuna recidiva del miome è stata osservata nei successivi 6 mesi dopo chirurgia all'esame ecografico transvaginale.

51 delle 91 pazienti (56%) che sono state sottoposte a miomectomia LPS e 37 delle 73 pazienti (50%) che sono state sottoposte a miomectomia LPT hanno avuto un totale di 97 gravidanze spontanee ( $p= N.S.$ ): 59 nel gruppo LPS e 38 nel gruppo LPT group; oltretutto, ci sono stati 8 aborti spontanei nel gruppo LPS e 13 nel gruppo LPT (Table 2).

Il tasso globale di gravidanze dopo miomectomia è stato del 53 % (88/164 patients).

42 gravidanze (26 nel gruppo LPS e 16 nel gruppo LPT) sono state vaginali (43 %) e 55 (33 nel gruppo LPS e 22 nel gruppo LPT) dopo taglio cesareo (57 %).

Alla fine dello studio, il tasso cumulative di gravidanze ed il tasso di nati vivi sono stati simili nei due gruppi ( $p= N.S.$ ).

**Discussione:** In passato, diversi trials randomizzati hanno dimostrato i benefici della miomectomia laparoscopica versus laparotomica <sup>11</sup> e della minilaparotomia versus laparotomia <sup>14</sup>. Un recente studio <sup>12</sup> ha dimostrato che, in donne con un numero medio di 2.7 miomi ed una larghezza media del mioma di circa 7 cm, la LPS riduce dolore postoperatorio, ospedalizzazione se confrontati con la miomectomia laparotomica. In ogni caso, non tutti i chirurghi hanno dimestichezza con la tecnica della miomectomia LPS e con la sutura uterina. La minilaparotomia è stata proposta per mantenere l'efficacia della sutura uterine e per ridurre l'impatto clinico della miomectomia laparotomica <sup>15</sup>. Nella miomectomia LPS, l'abilità per eseguire una rapida e sicura sutura LPS è probabilmente il maggiore limite tecnico <sup>16-18</sup>.

Nella nostra esperienza, la LPS è risultata essere associata con una minore riduzione dell'emoglobina, un riduzione dell'ileo postoperatorio, ed una minore ospedalizzazione se paragonata alla LPT; la perdita ematica media è stata significativamente più alta nel gruppo LPT e non ci sono state trasfusioni intra-operatorie o post-operatorie ed un solo paziente nel gruppo LPS è stato sottoposto ad un secondo intervento per complicanza precoce. Il follow-up a 6-mesi ha suggerito che la miomectomia LPS ed LPT hanno la stessa efficacia terapeutica.

Il basso tasso di complicanze, nella nostra esperienza, ha mostrato che la miomectomia LPS è fattibile anche in presenza di miomi multipli, sebbene il prolungato tempo operatorio potrebbe essere responsabile di problemi anestesiológicos durante le procedure chirurgiche. Diversi autori <sup>16, 19-20</sup> hanno notato che il tasso di complicanze anche se davvero basso era correlato positivamente con il numero ed il diametro maggiore dei miomi. Sebbene i miomi infraligamentari sono stati confermati essere ad alto rischio di complicanze, la maggior parte delle quali emorragiche. Sebbene tutti i chirurghi coinvolti nel seguente protocollo erano esperti in entrambe le procedure e noi abbiamo considerato la maggior parte delle pazienti come candidate sia alla LPS che alla LPT, i miomi misuranti tra 8 e 10 cm, miomi multipli (oltre 3-4) o localizzati in sede infraligamentaria sites sono stati considerati preferibilmente come candidati alla LPT.

La laparoscopia è una tecnica in evoluzione che richiede training, strumentazione specializzata, notevole capacità nell'eseguire nodi intra o extracorporei e adeguato ed attento uso del morcellatore; in ogni caso, potenziali danni vascolari o viscerali possono accadere <sup>21</sup>.

Un recente studio randomizzato di Alessandri et <sup>22</sup> al ha confrontato 148 pazienti operate di miomectomia LPS or LPT. La LPT è risultata essere associate con una significativa riduzione della concentrazione dell'emoglobina, una ridotta lunghezza dell'ileo post-operatorio, ed una ridotta ospedalizzazione. Dolore dopo 6 ore dall'intervento è risultato essere minore nel gruppo LPS. Ci sono state due complicazioni nel gruppo LPS (una laparoconversione ed una peritonite acuta diffusa causata da perforazione ileale).

In un recente studio prospettico multicentrico di Sizzi et <sup>19</sup> al su 2050 miomectomie LPS, gli eventi avversi più seri riportati sono stati emorragie (14 casi) richiedenti trasfusioni di sangue in 3 casi, 10 ematomi postoperatori, 1 danno intestinale e due sarcoma inaspettati; lo studio ha mostrato che la probabilità di complicanze aumenta significativamente con l'aumento del numero e con la localizzazione intramurale o infraligamentari dei miomi mentre la dimensione del mioma sembra influenzare particolarmente il rischio di complicanze maggiori.

Un altro studio ha riportato le complicanze e i dati riproduttivi di 982 <sup>20</sup> miomectomie LPS singole o multiple. Il tasso di conversione in LPT è stato del 1.29% e non si sono verificate gravi complicanze intraoperatorie. Il tasso globale di gravidanze intrauterine successive a miomectomia LPS è stato del 62.53% ed il tasso di aborti del 15.9%.

In un recente trial randomizzato su 136 miomectomie LPS or LPT Palomba et al <sup>23</sup> hanno osservato che le perdite ematiche intraoperatorie, le variazioni dei livelli di emoglobina, la quantità di analgesici usati postoperatori e l'ospedalizzazione sono stati significativamente più bassi nel gruppo LPS che LPT, mentre LPT è stato associato con un minore tempo intra-operatorio. Essi hanno quindi concluso che un'attenta valutazione delle dimensioni e della localizzazione dei miomi è necessaria per selezionare l'approccio migliore.

Sebbene la fattibilità e sicurezza della miomectomia LPS sono stati confermati negli ultimi due decenni<sup>17</sup>, l'impatto della miomectomia sulla fertilità non è stato adeguatamente studiato.

Nel presente studio, su 164 pazienti che desideravano gravidanza dopo miomectomia, il tasso globale di gravidanze spontanee dopo miomectomia è stato del 53 % ed il tasso di gravidanze dopo miomectomia LPS (56 %) non è stato significativamente più alto che nel gruppo della miomectomia LPT (50 %), in linea con precedenti studi sulla miomectomia LPT o LPS, nei quali il tasso di gravidanze in donne infertili variava tra 36 and 65%<sup>1,24</sup>.

I nostri dati sono in accordo con diversi studi<sup>12, 13, 25</sup>, che non hanno trovato differenze in fertilità e dati riproduttivi in donne infertili con miomi grandi che sono state sottoposte a miomectomia LPS o LPT. Nella nostra esperienza, il tasso cumulative di gravidanze ed il tasso cumulative di nati vivi valutato utilizzando le curve di Kaplan-Meier, sono risultati simili in donne sottoposte a miomectomia per via LPS o LPT<sup>26-29</sup>.

Nel nostro studio, più di metà donne sottoposte a trattamento chirurgico sono rimaste gravide ed il 43% dei parti dopo miomectomia sono stati vaginali (26 nel gruppo LPS e 16 nel gruppo LPT).

Il nostro studio conferma che la miomectomia LPT è caratterizzata da un basso grado di difficoltà chirurgica e che è una procedura altamente fattibile e sicura, anche se la LPS rimane, in mani esperte, la procedura che dà i migliori risultati a breve termine<sup>23</sup>.

Inoltre, l'esperienza dell'operatore e la preferenza della paziente dovrebbero essere punti importanti nella selezione di uno specifico approccio chirurgico in tutte le pazienti con miomi candidate all'intervento chirurgico<sup>30</sup>.

La miomectomia LPS potrebbe essere considerata un'alternativa sicura ed efficace terapeutica alla LPT per il trattamento dei miomi uterini sintomatici. La LPS ha mostrato una più bassa morbilità, minori perdite ematiche e minore ospedalizzazione, con un più alto tasso di gravidanze. Il tempo intraoperatorio non è risultato essere significativamente più lungo nel gruppo LPS ma le complicanze intra e postoperatorie sembrano accettabili e non più di quelle tradizionalmente attese con l'approccio laparotomico, sebbene trials clinici multicentrici e randomizzati con un più lungo follow-up sono necessarie per valutare i risultati a lungo termine di questa procedura.

## Bibliografia

1. Verkauf BS. Myomectomy for fertility enhancement and preservation. *Fertil Steril*, 58:1-15, 1992)
2. Damiani G, Campo S, Dargenio R, et al. Laparoscopic vs. laparotomic ovarian cystectomy in reproductive age women: an economic evaluation. *Gynaecol Endosc*, 7:19-23, 1998)
3. Nezhat F, Nezhat C, Gordons S, et al. Laparoscopic versus abdominal hysterectomy. *J Reprod Med*, 37: 247-250, 1992)
4. Hidlebaugh DA, Vulgaropoulos S, Orr RK. Treating adnexal masses. *J Reprod Med*, 42: 551-558, 1997)
5. Benedetti-Panici P, Maneschi F, Cuttillo G, et al. Surgery by minilaparotomy in benign gynecologic disease. *Obstet Gynecol*, 87: 456-459, 1996)
6. Marana E, Scambia G, Maussier ML, et al. Neuroendocrine stress response in patients undergoing benign ovarian cyst surgery by laparoscopy, minilaparotomy and laparotomy. *J Am Assoc Gynecol Laparosc*, 10: 159-165, 2003)
7. Fagotti A, Ferrandina G, Longo R, et al. Minilaparotomy in early stage endometrial cancer: an alternative to standard and laparoscopic treatment. *Gynecol Oncol*, 86: 177-186, 2002)
8. Fanfani F, Fagotti A, Ercoli A, et al. A prospective randomized study of laparoscopy and minilaparotomy in the management of benign adnexal masses. *Hum Reprod*, 19: 2367-2371, 2004)
9. Fanfani F, Fagotti A, Longo R, et al. Minilaparotomy in the management of benign gynecologic disease. *Eur J Obstet Gynecol Rep Biol*, 119: 232-236, 2005)

10. Vermesh M, Silva PD, Rosen GF, et al. Management of unruptured ectopic gestation by linear salpingostomy: a prospective, randomized clinical trial of laparoscopy versus laparotomy. *Obstet Gynecol*, 73: 400–404, 1989)
11. Mais V, Ajossa S, Guerriero S, et al. Laparoscopic versus abdominal myomectomy: a prospective, randomized trial to evaluate benefits in early outcome. *Am J Obstet Gynecol*, 174: 654–658, 1996)
12. Seracchioli R, Rossi S, Govoni F, et al. Fertility and obstetric outcome after laparoscopic myomectomy of large myomata: a randomized comparison with abdominal myomectomy. *Hum Reprod*, 15: 2663–2668, 2000)
13. Campo S, Campo V, Gambadauro P. Reproductive outcome before and after laparoscopic or abdominal myomectomy for subserous or intramural myomas. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 110: 215–219, 2003)
14. Cagnacci A, Pirillo D, Malmusi S, et al. Early outcome of myomectomy by laparotomy, minilaparotomy and laparoscopically assisted minilaparotomy. A randomized prospective study. *Hum Reprod*, 18: 2590–2594, 2003)
15. Nakagoe T, Sawai T, Tsuji T, et al. Use of minilaparotomy in the treatment of colonic cancer. *Br J Surg*, 88: 831–836, 2001)
16. Rossetti A, Sizzi O, Soranna L, et al. Long-term results of laparoscopic myomectomy: recurrence rate in comparison with abdominal myomectomy. *Hum Reprod*, 16: 770–774, 2001)
17. Dubuisson JB, Facounnier A, Fourchette V, et al. Laparoscopic myomectomy: predicting the risk of conversion to an open procedure. *Hum Reprod*, 16: 1726–1731, 2001)
18. Malzoni M, Rotondi M, Perone C, et al. Fertility after laparoscopic myomectomy of large uterine myomas: operative technique and preliminary results. *Eur J Gynaecol Oncol*, 24: 79–82, 2003)
19. Sizzi O, Rossetti A, Malzoni M, et al. Italian multicenter study on complications of laparoscopic myomectomy. *J Minim Invasive Gynecol*, 14: 453–62, 2007)
20. Malzoni M, Sizzi O, Rossetti A, et al. Laparoscopic myomectomy: a report of 982 procedures. *Surg Technol Int*, 15: 123–9, 2006)
21. Sinha R, Hegde A, Warty N, et al. Laparoscopic excision of very large myomas. *J Am Assoc Gynecol Laparosc*, 10: 461–468, 2003)
22. Alessandri F, Lijoi D, Mistrangelo E, et al. Randomized study of laparoscopic versus minilaparotomic myomectomy for uterine myomas. *J Minim Invasive Gynecol*, 13: 92–97, 2006)
23. Palomba S, Zupi E, Russo T, et al. A multicenter randomized, controlled study comparing laparoscopic versus minilaparotomic myomectomy: short-term outcomes. *Fertil Steril*, 88: 942–51, 2007)
24. Berkeley AS, De Cherney AH, Polan ML. Abdominal myomectomy and subsequent fertility. *Surg Gynecol Obstet*, 156: 319–22, 1983)
25. Palomba S, Zupi E, Falbo A, et al. A multicenter randomized, controlled study comparing laparoscopic versus minilaparotomic myomectomy: reproductive outcomes. *Fertil Steril*, 88: 933–41, 2007)
26. Bulletti C, Polli V, Negrini V, et al. Adhesion formation after laparoscopic myomectomy. *J Am Assoc Gynecol Laparos*, 3: 533–536, 1996)
27. Dubuisson JB, Facounnier A, Chapron C, et al. Second look after laparoscopic myomectomy. *Hum Reprod*, 13: 2102–6, 1998)
28. Diamond MP, Freeman ML. Clinical implications of postsurgical adhesions. *Hum Reprod Update*, 7: 567–76, 2001)
29. Dessole L, Soriano D, Poncelet C, et al. Determinants of pregnancy rate and obstetric outcome after laparoscopic myomectomy for infertility. *Fertil Steril*, 76: 370–4, 2001)

30. Fanfani F, Fagotti A, Bifulco G, et al. A prospective study of laparoscopy versus minilaparotomy in the treatment of uterine myomas. *J Minim Invasive Gynecol*, 12: 470-474, 2005)