

La citología nasal en rinitis crónica como predictor de sinusitis paranasal

Myr. M.C. Fernando Gpe. **García-Jasso,*** Myr. M.C. Azucena del C. **Hernández Martínez,****
Cor. M.C. Octavio **Martínez Natera*****

Hospital Central Militar. Ciudad de México.

RESUMEN. Con el objeto de determinar si la citología nasal en niños con rinitis crónica tiene relación con sinusitis paranasal, se hizo un estudio prospectivo, descriptivo y comparativo en 48 niños entre 9 meses y 9 años, de ambos sexos, de septiembre de 1994 a agosto de 1996 por presentar datos clínicos compatibles con rinitis crónica. El grupo control fue de pacientes encamados en las salas de Pediatría por padecimientos no respiratorios, hematológicos o inflamatorios. Se tomó citología exfoliativa de la mucosa nasal del cornete inferior en ambas fosas y se relacionaron los hallazgos considerados como inflamación crónica de la nariz con opacidad de los senos paranasales en radiografías simples. Se encontró relación significativa ($p < 0.05$) entre la presencia de metaplasia escamosa-senos opacos y neutrófilos-senos opacos, además de hiperemia y acúmulo de moco-metaplasia y neutrófilos. Se concluye que la célula de metaplasia escamosa puede ser una célula adaptada o en respuesta a la inflamación crónica de la mucosa nasal donde el neutrófilo es la célula inflamatoria predominante. La citología nasal con presencia de metaplasia escamosa y neutrófilos es un probable predictor de sinusitis.

Palabras clave: rinitis, citología nasal.

La nariz tiene dentro de sus funciones la de filtrar el aire atmosférico, el cual es cada vez más contaminado de múltiples partículas extrañas debido a los adelantos de la civilización humana.¹

La obligatoriedad de la respiración nasal es evidente en los recién nacidos y hasta los 5 a 6 meses de edad, aun cuando

SUMMARY. This prospective trial was carried out in 48 male and female children between 9 months and 9 years, from september 1994 through August 1996 in order to determine if chronic rhinitis assessed by nasal cytology can be a predictive factor for sinusitis. Control group was integrated by children hospitalized by other diseases than respiratory, hematologic or inflammatory. Exfoliative cytology was taken from the nasal mucosa of the lower turbinate bilaterally and findings were correlated to opacity of the paranasal sinuses in plane X-rays. Significant correlation was found ($p < 0.05$) between squamous metaplasia-sinusal opacity, and neutrophil cells-sinusal opacity, as well as between hyperemia and mucous-metaplasia and neutrophilic cells. It is concluded that the squamous metaplasia cells can be either adapted cells or a response to the chronic inflammation of the nasal mucosa where the neutrophil is the predominant inflammatory cell. Squamous metaplasia and neutrophil cells in the nasal mucosa can be a predictive factor of sinusitis.

Key words: rhinitis, cytology nasal.

también los adultos respiran por la nariz en un 85% de los casos. La respiración buconasal o bucal sólo se observa con el ejercicio, con el uso de la voz y cuando existe congestión nasal. La nariz no es un conducto pasivo: filtra, calienta y humidifica el aire y asimismo es el primer sistema de defensa contra agentes patógenos, de tal forma que su mucosa tiene un sistema inmune y reflejos neurohumorales protectores locales.^{2,6}

Al nacimiento los senos maxilares y etmoidales están formados pero no se pueden identificar con una radiografía simple. El seno frontal se hace evidente alrededor de los 6 a 12 meses de vida extrauterina y se observa en las radiografías simples hacia los 3 a 7 años de vida. Los senos esfenoidales se desarrollan por el tercer año de vida y se hacen visibles por radiografía hasta después de los 9 años.⁵

La mucosa que cubre la cavidad nasal, está formada por epitelio columnar ciliado pseudoestratificado y una pequeña parte,

* Residente de Pediatría, Escuela Militar de Graduados de Sanidad, UDEFA.

** Departamento de Patología, Hospital Central Militar.

*** Subdirector, Escuela Militar de Graduados de Sanidad, UDEFA.

Correspondencia:

Mayor M.C. Azucena del C. Hernández Martínez. Depto. de Patología. Hospital Central Militar. Lomas de Sotelo. México DF 11200.
A.P. 35-510

en el vestíbulo nasal, es escamoso estratificado y moderadamente queratinizado. Dentro del epitelio hay tres tipos de células: las basales, las caliciformes y las cilíndricas, estas últimas pueden ser ciliadas y no ciliadas. Las células basales se localizan sobre la membrana basal y no se encuentran en la luz.

Las caliciformes, producen secreciones apócrinas que contribuyen a formar el moco hialino y sólo una parte marginal toca la membrana basal. Las células cilíndricas, ciliadas y no ciliadas están cubiertas por 300 a 400 microvellosidades distribuidas por toda la superficie apical. Estas no son precursoras de los cilios y corresponden a digitaciones de la membrana celular, su función es la de aumentar la superficie para el intercambio a través de las células y también evitan que esté seca la superficie.

Esta humedad es esencial para la función de los cilios, que son microtúbulos de tubulina con motilidad extrínseca para la propulsión en la superficie líquida de cuerpos extraños.⁶

La rinitis crónica (RC) puede ser infecciosa en un 52% y no infecciosa en un 48% pudiendo esta última ser alérgica, eosinofílica no alérgica y vasomotora.⁷

La morbilidad de la rinitis es significativa y se estima que en Estados Unidos de América, se gastan varios cientos de millones de dólares anuales por pérdida de productividad y costos médicos y afecta desde los lactantes hasta los adultos.¹⁶

La RC es una entidad clínica, caracterizada por rinorrea, obstrucción, estornudos, prurito nasal y signos variables, por un lapso mayor de 3 meses.⁷ Desde el punto de vista anatómopatológico, la mucosa nasal es hipertrófica; hay pérdida del estroma mucoide y de células caliciformes, cubiertas por epitelio respiratorio con focos de metaplasia escamosa, con infiltrado de linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos con engrosamiento de la membrana basal; cambios que pueden ser de naturaleza reactiva o adaptativa a la lesión.^{8,9}

El hallazgo más característico de la RC, es la presencia de células de metaplasia escamosa, considerada ésta como una adaptación de la mucosa respiratoria a condiciones anormales. La histogénesis de la metaplasia escamosa se inicia como una alteración en el epitelio con una fisura o desprendimiento del mismo, que posteriormente degenera a las células caliciformes y ciliadas. Así, con la expulsión de estas células, el epitelio basal restante, sin cilios, da lugar a epitelio de transición que evolucionará a metaplasia escamosa acompañado de células polimorfonucleares como respuesta inflamatoria.

La aparición de células cilíndricas degeneradas, da lugar a un fenómeno de ciliocitoforia, en que la placa terminal y los cilios aislados de la célula simulan globos filamentosos o penachos.^{10,11}

La sinusitis desde el punto de vista fisiopatológico se conceptualiza como la inflamación de la mucosa de los senos paranasales que es secundaria a la pérdida de permeabilidad del ostium, función ciliar, calidad de las secreciones, y alteración de la inmunidad local.^{5,11}

Se considera que la citología nasal es capaz de detectar cambios patológicos tempranos de la mucosa, es un método no invasivo de bajo costo y de fácil manejo para toma de muestra en niños y es parte de los estudios indicados para la evaluación del niño con RC.

El objetivo del presente trabajo es definir las características clínicas y citológicas de la nariz de niños con RC, si la citología es un predictor de senos maxilares opacos en una radiografía simple del cráneo; y si esto puede corresponder a sinusitis paranasal.

Material y métodos

El estudio fue descriptivo, prospectivo y comparativo llevado a cabo en la Consulta Externa de Pediatría, en el departamento de Patología y en el Departamento de Radiología e Imagen del Hospital Central Militar. Abarcó de Septiembre de 1994 hasta Agosto de 1996 y fueron incluidos aquellos pacientes con un cuadro clínico caracterizado por rinorrea, obstrucción nasal, estornudos, prurito nasal y signos variables, por un lapso mayor de 3 meses. Todos residentes del área metropolitana, de la ciudad de México.

Las características macroscópicas de la mucosa nasal consideradas fueron la hiperemia, palidez, acúmulo de moco, mucosa friable y sangrante, y atrofia de la mucosa nasal.

La sinusitis, para efectos de este estudio, se definió desde el punto de vista radiológico, como la opacidad de los senos maxilares en radiografías simples de la cabeza.

El estudio citológico nasal se realizó entre las 8:00 y 14:00 horas por el mismo médico. En todos los casos por rinoscopia anterior y bajo iluminación directa, se extrajo el exceso de secreción de moco; procediendo al raspado de la mucosa nasal con un fragmento romo de madera del cornete inferior de ambas narinas, evitando tocar el vestíbulo nasal.

Las muestras se fijaron en alcohol etílico al 95% durante tres minutos y se tiñeron con el método de Papanicolaou para su observación.

La evaluación celular la realizó un solo patólogo que desconocía la información clínica de los pacientes. La cuantificación celular se hizo por medio de microscopía de luz a 40X, realizando el conteo de 5 campos por laminilla en cada caso, anotándose los siguientes hallazgos: células columnares ciliadas, células caliciformes, células de metaplasia escamosa, polimorfonucleares y eosinófilos, y considerando las proporciones de 1-25% (leve), 26-50% (moderada) y más de 50% (acentuada).

Esta distribución se realizó a partir de la citología con mayor recuento celular, haciendo la suma de los 5 campos para cada tipo.

Se determinó la opacidad de uno o ambos senos paranasales en una radiografía simple de cráneo, en proyección de mentoplaque.

El grupo control estuvo constituido por 20 niños asintomáticos que se encontraban encamados en las salas de pediatría sin padecimientos respiratorios hematológicos o autoinmunes; sin tratamiento de medicamentos, que residen en esta ciudad. Sus radiografías fueron interpretadas por un radiólogo que desconocía el cuadro clínico de los pacientes.

La prueba estadística para análisis de los datos fue la de Ji cuadrada con nivel de significancia estadística de $p < 0.05$.

Cuadro 1. Características generales de los pacientes con rinitis crónica según edad (n = 48).

<i>Edad en meses</i>	
Media:	47.9
DS:	± 27.6
VaMin:	9
VaMax:	108

Cuadro 2. Características generales de los pacientes con rinitis crónica según sexo (n = 48).

	<i>n</i>	<i>%</i>
Femenino	16	33
Masculino	32	67

Cuadro 3. Signos y síntomas de los pacientes con rinitis crónica (n = 48).

	<i>n</i>	<i>%</i>
Constipación nasal	48	100
Respirador bucal	39	81
Tos nocturna	26	54
Estornudos	22	46
Prurito nasal	19	40
Tos vespertina	14	29
Epistaxis	6	12

Cuadro 4. Características de la rinorrea en el grupo de estudio (n = 48).

	<i>n</i>	<i>%</i>
Hialina	37	77.0
Verde	7	14.5
Amarilla	4	8.3

Cuadro 5. Características radiológicas de los senos maxilares en el grupo de estudio.

	<i>Control n = 20</i>		<i>Rinitis crónica n = 48</i>	
	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>
Senos opacos				
Ambos	2	10	35	73
Sólo uno	4	20	13	27
Ninguno	14	70	—	—

Cuadro 6. Características macroscópicas de la mucosa nasal (n = 48).

	<i>n</i>	<i>%</i>
*Hiperemia	42	87.5
*Ac. moco	31	64.5
Palidez	12	25.0
Friable y sangrante	5	10.0

*p < 0.05

Resultados

Fueron analizados 48 pacientes, 32 niños y 16 niñas, correspondiendo a diferentes edades, como se muestra en los cuadros 1 y 2.

Los signos y síntomas encontrados, por orden de frecuencia, fueron la constipación nasal, respiración bucal, tos nocturna, prurito nasal, estornudos y la tos vespertina y en 6 casos epistaxis (Cuadro 3).

Las características de la rinorrea fueron hialina en 37 casos, de aspecto verdoso en 7 y 4 amarilla (Cuadro 4).

Ambos senos maxilares se catalogaron como opacos en 35 casos y en 13 se encontró opacidad unilateral. En el grupo control 4 presentaron un seno opaco; 2 ambos y 14 tuvieron los senos de aspecto normal (Cuadro 5).

Las características macroscópicas en orden de frecuencia fueron la hiperemia; acúmulo de moco, palidez y la mucosa friable y sangrante (Cuadro 6).

La distribución de células se anota en el cuadro 7. Destacando que hubo 43 casos con polimorfonucleares en cantidad moderada y en 5 acentuada. Para la metaplasia escamosa 32 en cantidad moderada, 10 acentuada y 6 leve. Las cilíndricas 23 casos con cantidad moderada y 13 con leve. En el grupo control 4 presentaron metaplasia moderada y 16 leve; neutrófilos en cantidad leve 12 y moderada 8 células cilíndricas y

caliciformes, 17 y 13 en cantidad leve, respectivamente; y solo 5 pacientes con eosinófilos en cantidad leve. Con diferencia estadística (p < 0.05) para las células de metaplasia escamosa, células cilíndricas y caliciformes. Siendo la proporción moderada la que predominó en los pacientes.

Al hacer la relación entre metaplasia y polimorfonucleares, con la presencia de opacidad de uno o dos senos opacos, ésta tuvo significancia estadística (p < 0.05), así como la relación entre metaplasia y neutrófilos, con la presencia de hiperemia y acúmulo de moco (p < 0.05) también fue significativa.

Discusión

La citología exfoliativa de la nariz aporta datos adicionales a los obtenidos por la rinoscopía anterior. Al evaluar la relación entre la presencia de metaplasia escamosa y neutrófilos, como células de inflamación crónica de la nariz, con la presencia de sinusitis, como senos maxilares opacos, la encontramos significativa. Semejante a lo reportado en la literatura para neutrófilos-sinusitis,^{17,18} en la que se describe que más de 5 neutrófilos por campo en una citología se puede correlacionar con sinusitis crónica; que se debe corrobo-

Cuadro 7. Características microscópicas de la citología nasal comparando grupo control vs rinitis crónica.

	No. de pacientes (%)											
	Control (n = 20)						Rinitis crónica (n = 48)					
	L		M		A		L		M		A	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Cel. metaplasia	16	80	4	20			*6	12.5	*32	66	*10	21
Neutrófilos	12	60	8	40			0	0.0	*43	89	*5	10
Cel. cilíndricas	17	85	3	15			13	27.0	23	48	12	25
Caliciformes**	13	65	4	35			13	27.0	27	54	11	23
Eosinófilos	5	25					6	12.0	7	14		

* $p < 0.05$ ** en 3 pacientes no se observaron. Abreviaturas: L = leve, M = moderado, A = acentuado.

rar con tomografía axial o coronal del cráneo para aquellos casos en los que no hay mejoría con el tratamiento inicial llevado de manera adecuada y pueden ser candidatos a cirugía o exploración endoscópica.^{19,23,24}

Asimismo las radiografías simples en niños sintomáticos, pueden tener una especificidad de un 92% y una sensibilidad de 54%.²⁰ Ya que la variabilidad de senos opacos puede corresponder a hipoplasia del seno afectado, ángulo del paciente al momento de tomar la radiografía según la edad, que se sobrepongan estructuras óseas, el movimiento del paciente, tamaño pequeño de los senos,²¹ septum intranasal, asas de molares y falta de migración de un molar, todas estas situaciones se observan en pacientes asintomáticos hasta en un 50%.^{20,22}

El estudio ideal para la valoración de los senos paranasales, es la tomografía axial y coronal computada de cráneo (TAC axial y coronal), para visualizar la integridad del complejo osteomeatal.

La metaplasia escamosa, se considera como un cambio secundario o de adaptación a la lesión crónica de la mucosa nasal. En este estudio se encontró que las células cilíndricas y caliciformes se encuentran en proporciones semejantes, con presencia de células de metaplasia escamosa en la mayoría de los casos. Se puede especular que representa una respuesta celular del epitelio, que en el niño, es sinérgica: aumenta el recambio celular por la lesión en la submucosa, membrana basal y epitelio y la célula de metaplasia escamosa se considera un factor de protección inespecífico probablemente regulado por linfocitos T y que tiene una capacidad de protección de la mucosa aunque no puede llevar a cabo un proceso de aclaramiento nasal típico. En el estudio histológico, con microscopía electrónica, se describe que la metaplasia es de las células caliciformes.²³ Esta metaplasia además se acompaña de cambios celulares como fue la presencia de neutrófilos en grado moderado, que probablemente esté en relación con infección.

Para la citología compatible con rinitis crónica hiperplásica, descrita por Rodríguez y cols.²³ han reportado la presencia «ocasional» de metaplasia, con incremento de neutrófilos y disminución de las células cilíndricas sin variar la

cantidad de las células caliciformes.²⁴ Esta situación de depleción celular puede tener un sesgo y no aplicarse a pacientes pediátricos, porque su población era pacientes entre 12 y 60 años.

En otro estudio,²⁵ la población se encontró entre los 9 y los 24 meses de edad, con una distribución parecida en nuestro trabajo. Los niños fueron la mayor proporción de portadores de rinitis crónica o recurrente.

Desde el punto de vista clínico la rinitis crónica es semejante a la sinusitis crónica, siendo de importancia la valoración radiológica ya que el manejo es distinto. Se ha demostrado que la tomografía axial o coronal computada es superior a las placas simples del cráneo.²⁶

Desde el punto de vista clínico la rinorrea hialina se considera de tipo mucoso; y la amarilla o verde mucopurulenta y acompaña a la sinusitis. En estudios de citología cuantitativa se han encontrado diferencias entre una y otra. Esto es: para la primera la cuenta absoluta de neutrófilos es de 5,800 células/mm³ y para la segunda 45,000 células/mm.³ Haciendo notar que el neutrófilo es una célula que permite la condición inflamatoria más importante en la sinusitis crónica²⁴ y concuerda con los hallazgos de este trabajo.

La distribución de las características macroscópicas de la mucosa nasal es semejante a la de otros estudios^{14,25} y tuvo una relación significativa para la hiperemia y acúmulo de moco, aunque también estos cambios, para la Ciudad de México se relacionan con factores ambientales no considerados en este trabajo.^{26,27}

Conclusión

La mucosa nasal con células de metaplasia escamosa puede corresponder a inflamación crónica y representa una alteración celular cuya consecuencia puede ser la disminución de la función normal de la mucosa nasal.

La sinusitis es una entidad clínica que puede ser semejante a la rinitis crónica, que requiere valoración radiológica para su diagnóstico.

En este estudio todos los niños que presentan opacidad de los senos paranasales tienen además en la citología nasal, la presen-

diado era referido con datos clínicos de cronicidad y opacidad de los senos paranasales.

Antes de indicar un estudio radiológico simple de los senos paranasales, se puede efectuar la toma de citología exfoliativa nasal, lo que permite clasificar el padecimiento en función de la celularidad.

De no encontrar metaplasia y/o neutrófilos en cantidad leve a moderada, como mínimo, la posibilidad de encontrar senos opacos es menor.

Referencias

1. Corey JP. Environmental control of allergens. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; 111: 340-7.
2. Peden DB. Effect of air pollution in asthma and respiratory allergy. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1996; 114: 242-7.
3. Jaffe BF. Classification and management of anomalies of the nose. *Otolaryngol Clin North Am* 1981; 14: 989-1004.
4. Arredondo de AG, López SN, De Hoyos PR, Arreola SMA. Morphogenesis of the lateral nasal wall from 6 to 36 weeks. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1996; 114: 54-60.
5. Corren J, Rchelefesky GS, Shapiro GG, Slavin GR. Sinusitis En: Bierman CW, Pearlman DS: Allergy, asthma, and immunology from infancy to adulthood. Philadelphia, Pennsylvania. W.B. Saunders Company, 1996: 428-434.
6. Philip G, Naclerio RM. Physiology and diseases of the nose. En: Bierman CW, Pearlman DS: Allergy, asthma, and immunology from infancy to adulthood. Philadelphia, Pennsylvania. W.B. Saunders Company, 1996: 393-410.
7. Moulton-Barrett R, Passy V, Horlick D, Brauel G. Infrared coagulation of the inferior turbinate: A new treatment for refractory chronic rhinitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; 111: 674-9.
8. Batsakis JG. The pathology of head and neck tumors. Nasal Cavity and paranasal sinuses. Part. 5. *Head Neck Surg*. 1980; 2: 410-19.
9. Rosai J. Nasal cavity, paranasal sinuses, and nasopharynx. larynx and trachea, lung and pleura. En: Respiratory tract Chapter 7. Ackerman's: Surgical pathology. The C.V. Mosby Company, St. Louis Missouri, 1989: 229.
10. Fontanes TE, Guevara CE. Aparato respiratorio. En: Citología Clínica. La Prensa Médica Mexicana 1989. 16-55.
11. Meltzer E, Jalowasky A. Nasal cytology in clinical practice. *Am J Rhinol* 1988; 2: 47-54.
12. Wald ER, Guerra N, Byers C. Upper respiratory tract infections in young children: Duration and frequency of complications. *Pediatrics* 1991; 87: 129-133.
13. Evans FO, Syndor JB, Moore WEC. Sinusitis of the maxillary antrum. *N Eng J Med* 1975; 293: 735-739.
14. Newman LJ, Platts-Mills PAE, Phillips CD. Chronic sinusitis. *JAMA* 1994; 271: 363.
15. Friedman WH, Katsantonis GP, Bumpous JM. Staging of chronic rhinosinusitis: treatment strategies. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995; 112: 210-4.
16. Hogan MB, Grammer LC, Patterson R. Rhinitis. *Ann Allergy* 1994; 72: 293-300.
17. Wilson NW, Jalowayski AA, Hamburger RN. A comparison of nasal cytology with sinus x-rays for the diagnosis of sinusitis. *Am J Rhinol* 1988; 2: 55-9.
18. Gill FF, Neiburger JB. The role of nasal cytology in the diagnosis in chronic sinusitis. *Am J Rhinol* 1989; 3: 13-15.
19. Druce HM. Emerging techniques in the diagnosis of sinusitis. *Ann Allergy* 1991; 66: 132-136.
20. McAlister WH, Lusk R, Muntz HR. Comparison of plain radiographics and coronal CT scans in infants and children with recurrent sinusitis. *Am J Radiol* 1989; 153: 1259-64.
21. Jorgensen F, Hansson H-A, Petruson B. The nasal mucosa in healthy and frequently infected children. *Otorhinolaryngol Head Neck Surg. Proceedings of the XIV World Congress of otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Madrid Spain, September 10-15, 1989. Edited by T. Sacristán, JJ, Alvarez-Vincent, J. Bartual, F Antolí-Candela, 1990 Kugler & Ghedini Publications, Amsterdam, Berkeley, Milano. 1989; 1577-1588.*
22. Jorgensen F, Hansson H-A. Morphological basis for impaired protective efficiency by the nasal mucosa in infants with and without recurrent acute otitis media: a light electron microscopy study. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990; 91: 257-265.
23. Rodríguez-Adrados F, Rodríguez Archilla AM, Fernández A. Contributions to nasal cytology. In: *Otorhinolaryngol Head Neck Surg. Proceedings of the XIV World Congress of otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Madrid Spain, September 10-15, 1989. Edited by T. Sacristán, JJ, Alvarez-Vincent, J. Bartual, F Antolí-Candela et al. 1990 Kugler & Ghedini Publications, Amsterdam, Berkeley, Milano. 1589-1592.*
24. Sik LH, Majima Y, Sakakura Y, Shinogi J, Kawaguchi S, Woo KB. Quantitative cytology of nasal secretions under various conditions. *Laryngoscope* 1993; 103: 533-537.
25. Knani J, Campbell A, Enander I, Peterson GBC, Michel FB, Bousquet J. Indirect evidence of nasal inflammatory mediators and enumeration of cells in nasal secretions of patients with chronic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90: 880-9.
26. Calderón GL, Hernández MA, Bravo AH, López LH. Nasal Cytology in Southwest Metropolitan Mexico, City Inhabitants. Air Waste Management Association. For Presentation at the 85th Annual Meeting Exhibition Kansas City, Missouri. 1992; 21-26.
27. Calderón GL, Osorno VA, Bravo AH, Delgado CHR, Barrios MR. Histopathologic changes of the nasal mucosa in southwest metropolitan Mexico city inhabitants. *Am J Pathol* 1992; 140: 225-232.