

CARACTERIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE DECALCIFICACIÓN DENTARIA CON OSTEOSOFT® PARA ESTUDIOS MICROSCÓPICOS CUALITATIVOS Y CUANTITATIVOS

Autores: Lepzimilet, Pérez Torres¹, Pedro Augusto, Díaz Rojas², Erik, Díaz González³.

¹ Especialista de Estomatología General Integral e Histología, Profesor Auxiliar. Departamento de Ciencias Básicas. <https://orcid.org/0000-0002-4167-7099>.

² Doctor en Ciencias. Especialista de Histología, Profesor Titular. Departamento de Ciencias Básicas. <http://orcid.org/0000-0003-4897-363X>.

³ Residente de Histología. Departamento de Ciencias Básicas.

Universidad de Ciencias Médicas de Holguín.

Holguín, Cuba.

lepszimilet@infomed.sld.cu

RESUMEN

Introducción: OSTEOSOFT® es uno de los productos que se utiliza para la decalcificación de los tejidos duros del diente para su estudio microscópico. Los cortes desmineralizados tienen la ventaja de que pueden usarse para obtener una vista del diente *in situ*. En combinación con la aplicación de técnicas morfométricas y estereológicas, podrían permitir la mejor comprensión de procesos fisiológicos y patológicos. **Objetivo:** caracterizar la técnica de decalcificación de tejidos dentarios con la solución de OSTEOSOFT® y proyectar resultados cualitativos y cuantitativos analizados. **Método:** se realizó el procesamiento de los tejidos dentarios utilizando la solución decalcificadora OSTEOSOFT® en combinación con la técnica de la parafina y tinción con H/E. Se realizó análisis cualitativo y se aplicaron técnicas de morfometría para obtener determinados indicadores. **Resultados:** la decalcificación dentaria se completó satisfactoriamente lo que permitió realizar una caracterización cualitativa y cuantitativa de los tejidos. **Conclusiones:** el empleo de OSTEOSOFT® es útil para el estudio de los tejidos dentarios, brindando la posibilidad de analizar

determinados parámetros morfométricos y estereológicos que complementarían el estudio de la reacción de estos tejidos a la acción de la caries y de materiales dentales, así como los cambios que sufren estos tejidos con la edad, entre otros aspectos.

DeCS: tejidos dentarios, morfometría, técnicas histológicas.

INTRODUCCION

Los dientes son órganos calcificados, componentes de la cavidad bucal. Son los órganos de la masticación, tienen la función de dividir los alimentos, para hacerlos más accesibles a la acción de los jugos gástricos, participan además en la fonación y las características estéticas de la boca y la cara. También juegan un rol importante como armas de defensa y ataque. Para el cumplimiento de las mencionadas funciones los dientes se encuentran firmemente fijados al hueso que forma los maxilares. Están formados básicamente por cuatro tejidos: esmalte, dentina, pulpa y cemento. Esos tejidos con excepción de la pulpa, poseen diferentes grados de mineralización y por lo tanto son considerados tejidos duros.¹

El esmalte cubre la corona del diente, es acelular y mineralizado. Formado por material inorgánico (96%) y una pequeña cantidad de sustancia orgánica. Posee una compleja organización estructural que le permite soportar grandes fuerzas masticatorias y el continuo ataque de ácidos procedentes de alimentos y bacterias. La dentina constituye la mayor parte del diente, formada en un 70% por material inorgánico. No contiene células, sino únicamente las prolongaciones citoplasmáticas de los odontoblastos. La pulpa dentaria ocupa la cavidad pulpar y contiene la mayoría de los elementos celulares y extracelulares del tejido conectivo laxo. El cemento cubre las raíces de los dientes, posee una estructura similar al hueso y proporciona el medio de fijación de los dientes a las estructuras vecinas.^{2,3}

La mineralización de gran parte del diente hace que para el estudio microscópico se preparen por la técnica de desgaste o por la de desmineralización. El método de desgaste permite ver el tejido mineralizado pero destruye los tejidos blandos; en cambio, la desmineralización extrae el mineral y retiene el tejido blando. Los cortes desmineralizados tienen la ventaja de que pueden usarse para obtener una vista del diente *in situ* y estudiar sus relaciones con las estructuras de sostén contiguas.⁴⁻⁷

Existen varios reactivos químicos que se utilizan para la decalcificación de tejidos con la finalidad de obtener diagnóstico celular en la medicina humana. Entre ellos se encuentra OSTEOSOFT®, una solución decalcificadora suave para uso en histología empleada para fijar, desmineralizar y decalcificar huesos, punciones de médula ósea, material queratinizado y otros materiales duros de origen humano. Se trata de una solución lista para el uso (su dilución no es necesaria) destinada para el tratamiento previo de material de examen histológico. Como resultado de

su utilización se obtiene un tejido con consistencia de caucho que exhibe solo una resistencia débil, que luego puede ser procesado con diferentes técnicas para su tinción y para la utilización de métodos inmunohistoquímicos.⁸

Las ventajas que ofrece el estudio de los cortes dentarios desmineralizados, procesados con diferentes técnicas de inclusión y tinción, en combinación con la aplicación de determinadas técnicas morfométricas y estereológicas, podrían permitir la mejor comprensión de procesos patológicos como la inflamación-reparación, las atrofas, la reacción de los tejidos dentarios a la acción de la caries y la utilización de materiales dentales, así como los cambios que sufren estos tejidos con la edad, estados carenciales⁹, efecto de determinadas sustancias¹⁰, entre otros, evidenciando las relaciones entre los procesos de desarrollo-forma y estructura-función.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es caracterizar la técnica de decalcificación de tejidos dentarios con la solución de OSTEOSOFT® y proyectar algunos resultados cualitativos y cuantitativos.

MATERIALES Y METODOS

Obtención y preparación de la muestra.

Se realizó un estudio experimental. Se seleccionó un diente (canino inferior derecho) de un paciente de 72 años de edad, sin lesión de caries ni obturaciones con indicación para la exodoncia por presentar enfermedad periodontal. Fueron utilizados instrumentos adecuados para la toma de la muestra y su fijación inmediata en Formalina. La muestra fue correctamente rotulada.

Técnica de decalcificación del material histológico.

Posteriormente se procedió a realizar la desmineralización siguiendo las instrucciones del fabricante para la aplicación de la solución OSTEOSOFT®.⁸

El material a desmineralizar se introdujo completamente en un recipiente de vidrio con un exceso de solución decalcificadora lista para el uso OSTEOSOFT® y se decalcificó allí completamente.

El tamaño y la densidad estructural del material influyen en el tiempo de decalcificación; también la composición de la solución decalcificadora tiene una influencia decisiva en este proceso.⁸

El tiempo de decalcificación y la cantidad de OSTEOSOFT® necesarios dependen del tamaño, tipo y densidad del material. Este proceso en los dientes fue controlado cuidadosamente. En este caso la desmineralización completa del diente tomado como muestra se produjo en varios días.

Comprobación del punto final de la decalcificación

El punto final de la decalcificación se comprobó pinchando con una aguja en una zona representativa del material no decisiva para el posterior estudio microscópico.

También se puede determinar cuando el material flota en la solución. Una decalcificación incompleta del material puede solventarse colocándolo nuevamente en el recipiente con OSTEOSOFT® y controlando el proceso de forma minuciosa. Por su parte una descalcificación demasiado prolongada del material puede llevar a destruir la morfología y a influir negativamente en la tinción nuclear siguiente.⁸

Resultado

Posteriormente se enjuagó en agua corriente. El material exento de cal mostró una consistencia cartilaginosa o gomosa y no presentó fuerte resistencia por lo que se obtuvo un tejido con consistencia de caucho que exhibió sólo una resistencia débil al corte. Se obtuvieron dos secciones de 5 mm a través de cortes transversales realizados en la corona del diente desmineralizado.

Procesamiento histológico de rutina.

Se procedió a realizar la técnica clásica de inclusión en parafina. Luego se realizaron cortes seriados de diez micrómetros en sentido transversal, ubicando dos cortes histológicos en cada portaobjetos; y se asignaron diez láminas. Se obtuvieron 20 cortes histológicos a los que se les aplicó la técnica de coloración con Hematoxilina y Eosina.

Procesamiento morfométrico:

De cada lámina se procedió a obtener mediante la digitalización, tres campos entre los dos cortes para un total de 60 campos, cuyas imágenes se capturaron con una cámara de video digital Moticam de tres megapíxel acoplada al microscopio trilocular Motic modelo BA-210 con la aplicación digital Motic ImagePlus 3.0 de la compañía Motic S.A. y conectada a una computadora Dell, modelo Optiplex 7010, de la compañía Dell, mediante cable USB. Los aumentos objetivos empleados fueron de 10X, 40X y 100X.

Los indicadores morfométricos se midieron con la aplicación en computación *ImageJ* del National Institutes of Health, versión 1.49p del National Institutes of Health, USA, 2015 (Figura 1).¹¹

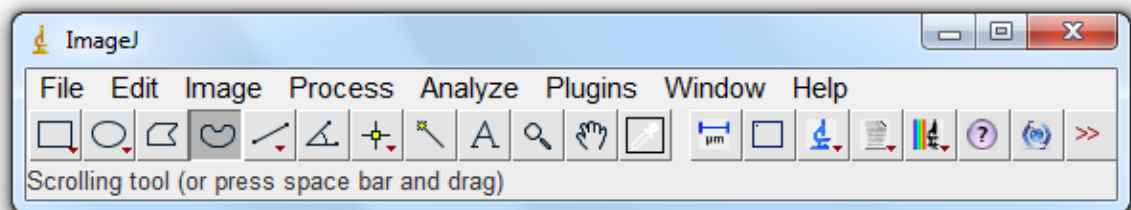


Figura 1. Presentación de la aplicación *ImageJ*1.49p.

Se procedió a calibrar para cada aumento objetivo utilizando un portaobjeto de calibración milimetrado múltiple de la Motic.

Indicadores morfométricos

Los indicadores morfométricos estudiados fueron: altura de la capa de predentina, índice de túbulos dentinales, densidad de cálculos pulpares, así como el área, perímetro y factor de forma nuclear de los odontoblastos.

Altura de la capa de predentina: se superpuso una rejilla sobre la imagen y mediante la opción distancia lineal de la aplicación *ImageJ* se procedió a medir en sentido perpendicular desde el borde interno hasta el borde externo de la capa de predentina.

Índice de túbulos dentinales: se obtuvo del cociente de la división del número de túbulos dentinales por micrómetros lineales.

Densidad de cálculos pulpares: se obtuvo del cociente de la división del número de cálculos pulpares en el área preestablecida ($9000 \mu\text{m}^2$).

Área y perímetro nuclear de los odontoblastos: se obtuvieron con la opción de contorneado del borde externo de los núcleos de las células a manos libres del sistema *ImageJ*.

Factor de forma nuclear de los odontoblastos: se obtuvo con la opción *Shape Descriptor*. Se contorneó el borde externo de los núcleos de las células a manos libres del sistema *ImageJ*, el sistema devuelve el valor de la circularidad o factor de forma, para lo cual utiliza los indicadores de perímetro y área calculados automáticamente por la aplicación. La fórmula que emplea *ImageJ* para determinar el factor de forma es:

$$FF = 4 \pi A / p^2$$

Donde: *FF*: Factor de forma

n: 3,1416

A: Área nuclear.

p: Perímetro nuclear.¹²

Procesamiento estadístico.

Se utilizaron hojas de cálculo de Excel para proceder a calcular indicadores que la aplicación *ImageJ* no nos permite calcular. En todas las series de casos se realizó la prueba de normalidad de *Shapiro-Wilk* con vistas a determinar que los datos obtenidos provienen de una población que cumple los parámetros de la distribución normal. Se determinaron estadígrafos descriptivos como media, desviación estándar, coeficiente de variación e intervalo de confianza para una $p \leq 0,05$. El editor estadístico utilizado fue el MyStat versión 12.0 del 2015 de la compañía SyStat. Los resultados se muestran en figuras y cuadros.

Aspectos éticos.

Se tuvo en cuenta los Principios Éticos para la Investigación Médica con datos provenientes de seres humanos de la *World Medical Association Declaration of*

Helsinki la Guía de OMS para los Comités de Ética de la investigación en humanos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Con la aplicación de la técnica de decalcificación con OSTEOSOFT® se obtuvo una muestra de tejidos dentarios correctamente desmineralizada, con la consistencia adecuada para realizar cortes tanto con bisturí como con el micrótopo (Figura 2) y susceptibles a ser teñidas con diferentes técnicas de coloración según la necesidad de la investigación, así como de aplicarles métodos inmunohistoquímicos.



Figura 2. Diente de consistencia gomosa cortado con bisturí.

Resultados cualitativos

Se realizó una caracterización de la dentina y la pulpa dentaria en la que se observó la disposición de los odontoblastos formando una capa sobre la superficie dentaria interna que está en contacto con la pulpa, estos poseen prolongaciones en su extremo apical que se disponen dentro de los túbulos dentinales. Las prolongaciones dentinales son más gruesas cerca de los cuerpos celulares y se adelgazan hacia la superficie externa de la dentina (Figura 3).

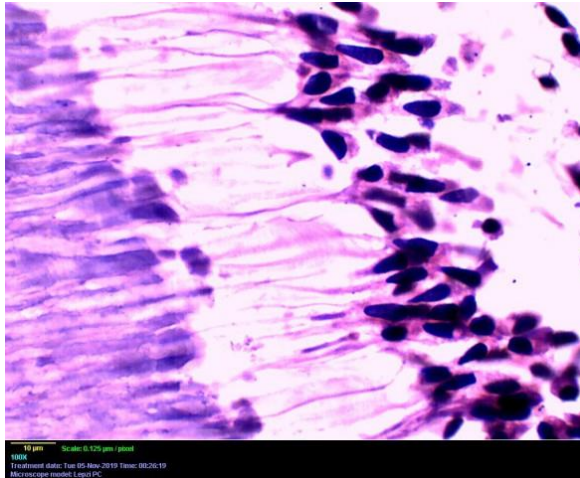


Figura 3. Disposición de los odontoblastos.

Se pudo observar la predentina como una capa que se tiñe de forma más pálida cerca del cuerpo de los odontoblastos y delimitada de la dentina formada previamente por una zona estrecha que se tiñe intensamente. Los túbulos dentinales se advierten como canales estrechos de recorrido ligeramente curvo (Figura 4).

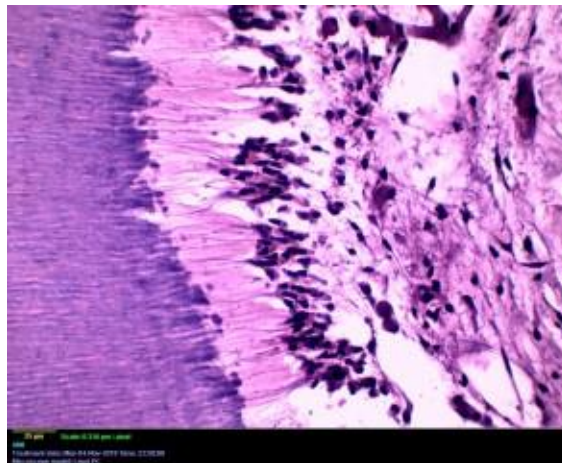


Figura 4. Túbulos dentinales y la capa de predentina.

En la pulpa se observó el tejido conectivo laxo que la forma y sus componentes como fibroblastos, fibras y la sustancia amorfa de la matriz extracelular. Se comprobó la presencia de una amplia red de vasos sanguíneos y terminaciones nerviosas en toda la extensión de la sección estudiada así como la distribución de cálculos pulpaes cuya presencia es característica en dientes más antiguos porque aumentan en tamaño y número conforme progresa la edad (Figura 5).

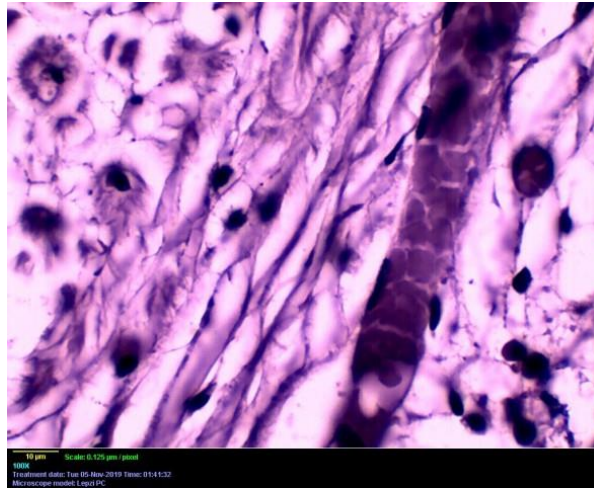


Figura 5. Componentes de la pulpa dentaria.

Resultados cuantitativos

Los parámetros morfométricos y estereológicos son herramientas que permiten la mejor comprensión de procesos patológicos como son la inflamación-reparación, las atrofias, las hipertrofias y las hiperplasias, entre otros, evidenciando las relaciones entre los procesos de desarrollo-forma y estructura-función. Está demostrada la eficacia de estos han permitido elevar el nivel de conocimientos sobre la estructura celular y tisular así como diversos procesos fisiológicos y patológicos a los que están sometidos dichos elementos.¹²

A partir de las mediciones se obtuvieron resultados cuantitativos. El cuadro 1 muestra los valores de los indicadores altura de la capa de predentina, índice de túbulos dentinales y densidad de cálculos pulpares.

Cuadro 1. Indicadores morfométricos de tejidos dentarios.

Indicador	Resultado
Altura de la capa de predentina	$47.98 \pm 8.67 \mu\text{m}$
Índice de túbulos dentinales	$0,23 \times \mu\text{m}$
Densidad de cálculos pulpares	$0,5 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2$

La predentina es la matriz orgánica recién sintetizada que está más cerca del cuerpo de los odontoblastos. Su formación y posterior mineralización no se efectúan con ritmo uniforme en todas las zonas por lo que resulta importante determinar la altura de esta capa en las diferentes regiones.^{2,3,14} En la muestra estudiada la altura de la capa de predentina tuvo un valor de $47.98 \pm 8.67 \mu\text{m}$.

Los túbulos dentinales están ocupados por las prolongaciones de los odontoblastos y su formación está determinada por la diferenciación de estas células. La disposición geométrica de la diferenciación de las mismas sugiere un patrón que establece unas distancias promedio entre los odontoblastos funcionales para, en el futuro, formar los túbulos.¹³

La relación entre los números de túbulos por unidad de superficie pulpar y en las superficies externas de la dentina es alrededor de 4:1, por lo que están más separados en las capas periféricas, y dispuestos más íntimamente cerca de la pulpa. Se plantea que cerca de la superficie pulpar de la dentina, el número por mm² varía entre 30 000 y 75 000, y que hay más túbulos, por unidad de superficie, en la corona que en la raíz.¹⁴ La determinación del índice de túbulos dentinales permite analizar las particularidades de esta disposición. En la sección estudiada se obtuvo índice de túbulos dentinales de 0,23 x µm.

Existen varios elementos que constituyen cambios regresivos que experimenta la pulpa con la edad, entre ellos se encuentran la disminución del área pulpar, el aumento de la cantidad de fibras de la matriz extracelular, así como la aparición y el incremento del número de cálculos pulpares.^{14,15} El cálculo de la densidad de estos últimos permite conocer las características de su distribución en determinada área de superficie. Este indicador morfométrico resultó ser de 0,5 x 10⁻³ µm² en este estudio.

Se demuestra por diferentes autores que el análisis morfológico del núcleo, incluidos elementos morfométricos y estereológicos puede proporcionar información importante sobre la estructura y la morfología de las células y los tejidos y contribuir así a estudios diagnósticos y pronósticos de lesiones, de igual manera se conoce que los cambios en el ciclo celular o el metabolismo celular, durante diferentes estados fisiológicos o intervenciones terapéuticas farmacológicas se acompaña de cambios en la arquitectura nuclear.¹² Esto resulta importante porque los estudios morfométricos nucleares pueden brindar información de mucha utilidad para el estudio de los tejidos dentarios.

El cuadro 2 muestra los valores de indicadores nucleares de los odontoblastos.

Cuadro 2. Estadísticos descriptivos según indicadores morfométricos nucleares de los odontoblastos.

Indicadores	AREA	PERIM	FF
N of Cases	164	164	164
Minimum	9.310	11.510	0.430
Maximum	43.200	29.400	0.930
Arithmetic Mean	21.030	19.009	0.729

95.0% Lower Confidence Limit	20.109	18.558	0.713
95.0% Upper Confidence Limit	21.952	19.461	0.745
Standard Deviation	5.978	2.928	0.102
Coefficient of Variation	0.284	0.154	0.140

El área es una medida de extensión de una superficie, y en este caso se refiere a la medida de extensión del núcleo celular. Es una unidad bidimensional cuyo valor se obtiene a partir de una fórmula. Este indicador nos permite conocer la medida del espacio del núcleo celular en una superficie. Permite interpretar el tamaño del núcleo celular y de la célula. Se emplea este indicador para comparar el estado de los núcleos en diferentes condiciones.¹²

Durante su ciclo vital, los odontoblastos sufren un proceso de diferenciación que ha sido ampliamente estudiado desde el aspecto funcional, bioquímico y genético. Estos participan activamente en la formación de la matriz de la dentina y los túbulos dentinales, proceso que no presenta un ritmo uniforme a lo largo de la vida. Este proceso se corresponde con cambios notables en el núcleo así como en el citoplasma de estas células.^{14,16} El área nuclear presentó el valor promedio de $21.0 \mu\text{m}^2$ con una desviación estándar de 5.9.

El factor de forma nuclear o índice de circularidad es el grado en que la forma del núcleo en un corte transversal se aproxima a un círculo perfecto. En la fórmula que se emplea para calcular este indicador se relaciona el valor del área nuclear y el valor al cuadrado del perímetro nuclear en una fracción de donde se infiere que a mayor perímetro nuclear, más se acerca el valor a uno y este valor indica un círculo perfecto. Si el valor del perímetro es bajo, el resultado tiende a alejarse de uno y aproximarse a cero lo que indica incremento de la forma elongada.¹²

El factor de forma presentó el valor promedio de 0.72 con una desviación estándar de 0.1, lo que se corresponde con su forma oval en relación con la forma cilíndrica del cuerpo de estas células.

El factor de forma proporciona información importante sobre la estructura y la morfología de las células, cambios en el ciclo celular, proceso de diferenciación, estado del metabolismo durante diferentes estados fisiológicos de la célula y contribuye a estudios diagnósticos y pronósticos.

Se encuentran en la literatura publicada y consultada por los autores pocos estudios de morfometría y estereología de los tejidos dentarios y sus componentes, ya sea tratados por desgaste o por decalcificación, por lo que consideramos que resulta importante continuar aprovechando las potencialidades de la solución decalcificadora OSTEOSOFT®, disponible en los Laboratorios de las Ciencias Básicas de nuestra institución, para el tratamiento de estos tejidos con la finalidad de realizar estudios microscópicos cualitativos y cuantitativos.

CONCLUSIONES

La utilización de la técnica de decalcificación dentaria con OSTEOSOFT® es útil para el estudio de los tejidos dentarios, en especial de la dentina, el cemento y la pulpa porque permite conservar los componentes más blandos de estos tejidos y estudiar las relaciones entre ellos. Esto brinda la posibilidad de realizar estudios cualitativos y de analizar determinados parámetros morfométricos y estereológicos que complementarían el estudio de la reacción de los tejidos dentarios a la acción de la caries y la utilización de materiales dentales, así como los cambios que sufren estos tejidos con la edad, entre otros aspectos.

BIBLIOGRAFIA

1. Mescher AL. Junqueira's Basic Histology. Text and Atlas. 15^{ta}ed. McGraw-Hill Education; 2018:300-305. Disponible en: <https://accessmedicine.mhmedical.com/book.aspx?bookID=2430>.
2. Nanci A. Ten Cate's Oral Histology. 9^{na} ed. Cánada, Elsevier; 2018:20-26. Disponible en: <https://www.elsevier.com/books/ten-cates-oral-histology/nanci/978-0-323-48524-1>.
3. Gartner LP. Textbook of Histology. 4^{ta}ed. Elsevier; 2017:421-427. Disponible en: <https://www.elsevier.com/books/textbook-of-histology/gartner/978-0-323-35563-6>.
4. Suvarna SK, Layton Ch, Bancroft JD. Theory and practice of histological techniques. 8^{va} ed. Elsevier; 2018:280-305. Disponible en: <https://www.elsevier.com/books/bancrofts-theory-and-practice-of-histological-techniques/unknown/978-0-7020-6886-7>.
5. Caracterización histológica de tejidos dentarios bovinos con utilización del micrótopo ISOMET® en la técnica histológica. Acta Odont Venez [Internet]. 2016 [citado 2020 May 19]; 54(2). Disponible en: <https://www.actaodontologica.com/ediciones/2016/1/art-2>.
6. Arana-Chavez VE, Castro-Filice LS. Transmission Electron Microscopy (TEM) and Scanning Electron Microscopy (SEM) for the Examination of Dental Hard Tissues. Methods Mol Biol. [Internet]. 2019 [citado 2020 May 19]; 1922:325-332. Disponible en: <https://europepmc.org/article/med/30838587>.
7. Connolly AJ, Finkbeiner WE, Ursell PC, Davis RL. Autopsy Pathology: A Manual and Atlas: 3^{er} ed. Elsevier, 2016:90-100. Disponible en: <https://www.clinicalkey.es/#!/content/book/3-s2.0-B9780323287807000081?scrollTo=%23hl0000879>.

8. Canadá, Sigma-Aldrich®. OSTEOMOLL[®] solución descalcificadora rápida para histología; 2019. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/101736?lang=en®ion=CU>.
9. Miriam Machado Martínez M, Vázquez Curdis I, Grau Ábalos R. Malnutrición fetal y sus consecuencias en el crecimiento y desarrollo. Una mirada para el estomatólogo. Acta Médica del Centro. [Internet]. 2011 [citado 2019 Nov 26]; 5(4). Disponible en: http://www.actamedica.sld.cu/r4_11/malnutricion.htm.
10. Di Prinzio A, Mejías G, Lamura A. Alteraciones ultraestructurales sobre el esmalte dental producidas por el efecto de las sustancias gaseosa y efervescente. Acta odontológica. [Internet]. 2015 [citado 2020 Ene 17]; 53(Suplemento). Disponible en: <https://www.actaodontologica.com/ediciones/2015/suplemento/art-30/#>.
11. ImageJ. National Institutes of Health, USA, 2015.
12. Díaz Rojas P. Introducción a la Morfometría y la Estereología. Universidad de Ciencias Médicas de Holguín. 82 p. 2016. Disponible en: <http://uvs.ucm.hlg.sld.cu/mod/resource/view.php?id=3459>.
13. Niño Barrera Javier Laureano, Garzón-Alvarado Diego Alexander. Morfogénesis de los túbulos dentinales: un modelo matemático. Rev Cubana Invest Bioméd [Internet]. 2012 Sep. [citado 2020 Ago 27]; 31(3): 352-362. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002012000300009&lng=en.
14. Orban. Histología y Embriología Bucles. La Habana, Editorial Pueblo y Educación; 1982:39-173.
15. Nerella Narendra Kumar, Mamatha Gowda Panchaksharappa, Rajeshwari G. Annigeri. Digitized morphometric analysis of dental pulp of permanent mandibular second molar for age estimation of Davangere population. Journal of Forensic and Legal Medicine. [Internet]. 2016 [citado 2020 Ene 16]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jflm.2016.01.019>.
16. Miyazaki T, T Baba T, Mori M, Komori T. Collapsin Response Mediator Protein 1, a Novel Marker Protein for Differentiated Odontoblasts. Acta Histochem Cytochem. [Internet]. 2018 [citado 2020 Abr 02]; 51(6):185-190. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6328366/>.