

EVIDÊNCIA DE HEMORRAGIA PULMONAR INDUZIDA PELO EXERCÍCIO EM CAVALOS DE SALTO DE 1,00 M – 1,20 M

Mariana Muller da Silva¹, Yolanda Dufour Eisenback¹, Evelyn Medeiros Novicky Durães¹, Karla Ribeiro da Silva¹, Luis Fernando Coelho Bastos¹, Pedro Vicente Michelotto Júnior¹

¹ PUC-PR

Correspondência: Pedro Vicente Michelotto Júnior: michelottojunior@yahoo.com.br

RESUMO: O presente estudo avaliou a ocorrência de hemorragia pulmonar induzida pelo exercício (HPIE) em cavalos de hipismo de 1,00m – 1,20m. Sete cavalos foram avaliados em três oportunidades, sendo que nas duas primeiras foi através de endoscopia das vias aéreas 60 minutos após o segundo dia de prova, em dois finais de semana de competição. Após a avaliação endoscópica, os animais foram sedados para a colheita do lavado broncoalveolar (LBA), intilando-se 300 mL de solução salina estéril pré-aquecida a 37°C e aspirada em seguida. As amostras foram imediatamente centrifugadas e, com o sedimento foram realizadas as contagens total de leucócitos e eritrócitos e, diferencial de células. A terceira avaliação foi realizada após 50 dias de repouso. A presença de sangue no lume traqueal foi graduada de 0 a 4. Nenhum cavalo apresentou epistaxe. Na segunda avaliação endoscópica, apenas um animal apresentou grau 1 de hemorragia. A contagem total de células nucleadas foi maior na segunda avaliação em relação à primeira (83,0 ± 34,8 vs. 55,0 ± 24,5 células/ µL de LBA, $p = 0,017$) e, reduzindo após o período de repouso (15,5 ± 9,1 vs. 83,0 ± 34,8, células/ µL de LBA, $p = 0,003$). Na avaliação citológica diferencial 50 dias após a segunda competição, a quantidade percentual de neutrófilos foi maior em relação à primeira (25,9 ± 5,6% vs 17,7 ± 4,3%, $p = 0,033$) e segunda (25,9 ± 5,6% vs 7,6 ± 7,4%, $p = 0,005$) avaliações. Somou-se a isto a ocorrência de HPIE, evidenciada pelo aumento de eritrócitos do LBA na segunda avaliação em relação à primeira (5,2 ± 3,1 vs. 0,9 ± 0,4 eritrócitos/ µL de LBA, $p = 0,048$) e maior quantidade de hemossideróforos no período de repouso ($p = 0,032$). Concluiu-se que cavalos que realizam exercícios submáximos estão sujeitos à HPIE e a inflamação pulmonar está associada.

Palavras-chave: endoscopia; inflamação pulmonar; neutrófilo; hemossideróforo

EVIDENCE OF EXERCISE-INDUCED PULMONARY HEMORRHAGE IN JUMPING HORSES OF 1.00M – 1.20M

ABSTRACT: The present study evaluated the occurrence of exercise-induced pulmonary hemorrhage (EIPH) in jumping horses of 1.00 m - 1.20 m. Seven horses were evaluated three times. Two of the evaluations were performed with airway endoscopy 60 minutes after the second day of competition. Following endoscopy, animals were sedated for the collection of bronchoalveolar lavage (BAL) fluid, instilling 300 mL of sterile saline prewarmed at 37°C and immediately aspirated. The samples were centrifuged, the cell pellet was used for total nucleated cell count (TNCC), total erythrocyte count and differential cytology. The third evaluation was performed after 50 days of rest following competitions. Presence of blood in the tracheal lumen was graded 0 to 4. Epistaxis was not observed in the evaluated horses. One animal showed grade 1 of EIPH. BAL fluid TNCC was higher in the second evaluation in comparison with the first one (83.0 ± 34.8 vs. 55.0 ± 24.5 cells/µL BAL fluid, $p = 0.017$), reducing after 50 days of rest (15.5 ± 9.1 vs. 83.0 ± 34.8 cells/µL BAL fluid, $p = 0.003$). In the BAL differential cytology proceeded after 50 days of rest, there was a higher percentage of neutrophils in comparison with the first (25.9 ± 5.6% vs. 17.7 ± 4.3%, $p = 0.033$) and second (25.9 ± 5.6% vs. 7.6 ± 7.4%, $p = 0.005$) evaluations, indicating pulmonary inflammation after the period of competition. This was associated with EIPH, evidenced by the increased number of erythrocytes in BAL fluid of the second evaluation in comparison with the first (5.2 ± 3.1 vs. 0.9 ± 0.4 erythrocytes/µL BAL fluid, $p = 0.048$) and increased percentage of hemosiderophages after 50 days of rest ($p = 0.032$). It was concluded that horses performing submaximal exercise are prone to EIPH and it is associated with pulmonary inflammation.

Key Words: endoscopy; pulmonary inflammation; neutrophil; hemosiderophage

INTRODUÇÃO

A hemorragia pulmonar induzida pelo exercício (HPIE) é uma condição frequentemente experimentada por cavalos durante exercícios máximos, caracterizada por sangramento da vasculatura pulmonar (Araya *et al.*, 2005). Ocorre normalmente em cavalos que correm a altas velocidades (Birks *et al.*, 1997).

A HPIE é considerada por muitos como a maior causa de redução no desempenho atlético e uma das condições médicas mais comumente tratadas em cavalos atletas, sendo observada com maior frequência em cavalos de corrida. Contudo, já foi descrita em diversas raças de cavalos realizando diferentes intensidades de exercício (Pascoe, 1996; Birks *et al.*, 2003).

Estudos prévios mostram que a prevalência da HPIE está mais relacionada à intensidade do exercício do que à sua duração ou à predisposição racial. Alguns estudos relatam associação com a idade, sendo a incidência maior em cavalos mais velhos (Robinson, 1987; Birks *et al.*, 2003).

Considera-se, como evento fisiopatológico para a HPIE, a ruptura dos capilares pulmonares (falência pulmonar capilar) devido ao aumento da pressão transmural através do capilar, gerada tanto pelo aumento da pressão arterial pulmonar como pelas pressões pleurais bastante negativas (Holcombe, 2006).

Contudo, apesar de aceitar-se que são requeridas pressões elevadas para que ocorra a falência dos capilares pulmonares (West e Mathieu-Costello, 1994), cavalos que realizaram exercício submáximo também apresentaram HPIE (Epp *et al.*, 2006; Viccino, 2007), constituindo um dilema para o

entendimento da fisiopatologia da HPIE (West, 2000).

Vários métodos para o diagnóstico da HPIE são sugeridos. Inicialmente utilizou-se a detecção de sangue em ambas as narinas, após o exercício. Atualmente, a visualização endoscópica das vias aéreas superiores e da traquéia é rotineiramente empregada para confirmar hemorragia pulmonar (Birks *et al.*, 2003).

Outrossim, a contagem de eritrócitos recuperados no fluido do lavado broncoalveolar (LBA), foi proposto como um método semiquantitativo da gravidade da HPIE, preferencialmente realizado entre 30 e 60 minutos após o exercício (Araya *et al.*, 2005).

Adicionalmente, a presença dos hemossiderófagos pode ser utilizada para detectar episódios prévios de hemorragia, pois eles mantêm-se presentes nas vias aéreas por até 3 semanas após um episódio de HPIE (Araya *et al.*, 2005).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência de HPIE, através de exame endoscópico das vias aéreas e citologia do lavado broncoalveolar, após dois dias de competição de hipismo durante o final de semana. Nossa hipótese foi de que cavalos de hipismo de provas de 1,00m -1,20m estão sujeitos a HPIE.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados sete cavalos, sendo 3 fêmeas e 4 machos, com idades entre 6 e 14 anos de idade, da equipe de hipismo da Polícia Militar do Estado do Paraná (PMPR), que treinavam no Regimento de Polícia Montada Coronel Dulcídio, em Curitiba, Paraná e competiam nas alturas de 1,00m a 1,20m.

Realizou-se ao todo 3 avaliações. Duas delas foram após o segundo dia

de provas realizadas no primeiro semestre do ano hípico, aproximadamente 60 minutos após o esforço, consistindo de avaliação endoscópica e colheita do LBA. Uma terceira avaliação ocorreu, na metade do ano de competições, após um período de repouso de 50 dias.

A avaliação endoscópica foi feita com fibroscópio flexível Pentax de 170 cm de comprimento e 12 mm de diâmetro, para a avaliação das vias aéreas até a bifurcação da traqueia. A presença de muco no lume traqueal foi graduada de 0-5 conforme Gerber *et al.* (2004) e a presença de sangue foi graduada de 0-4 conforme Hinchcliff *et al.* (2005).

Para a colheita do LBA os animais foram sedados previamente através da administração de acepromazina (0,03 mg/kg, IM) seguida da administração de xilazina (0,3 mg/kg, IV) associada ao butorfanol (0,05 mg/kg, IV) (Viel e Hewson, 2003). Utilizou-se um catéter flexível de silicone próprio para a colheita de LBA de equinos de 300cm de comprimento e 8mm de diâmetro (V-PBAL-300, Cook Vet Products, Hamburg, Germany). O cateter foi introduzido via naso-traqueal até se alojar em um brônquio, quando o *cuff* em sua extremidade foi inflado com 10 mL de ar. Foram utilizados 300 mL de solução salina de NaCl 0,9% heparinizada (5 UI/mL de solução salina) pré-aquecida a 37°C. Foram infundidas alíquotas de 120 mL, aspirando-se gentilmente após cada alíquota. O material recolhido foi acondicionado em frasco plástico estéril para a análise imediata. Os LBA foram centrifugados a 340g a temperatura ambiente descartando-se o sobrenadante e ressuspensando o sedimento de células em 1 mL de solução salina. As contagens de eritrócitos e do total de células nucleadas foram realizadas a partir do sedimento de células ressuspensado,

utilizando-se um hemocítômetro de Neubauer.

A preparação dos esfregaços, para a avaliação citológica diferencial, foi realizada com 10 μ L da suspensão de células. As lâminas foram deixadas secar ao ar e foram coradas com Romanowski, sendo que foram contadas 300 células em microscópio ótico em magnificação de 1000 vezes. Considerou-se achado citológico normal para o LBA contendo em média 60% de macrófagos, 35% de linfócitos, <5% de neutrófilos, <2% de mastócitos, <1% de eosinófilos (Michelotto Jr *et al.*, 2010).

A análise estatística dos dados foi realizada por teste ANOVA 'one-way' e teste de *Mann Whitney* e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média (SD), considerando-se os valores de $p < 0,05$ como significativos.

RESULTADOS

Nenhum dos animais avaliados apresentou epistaxe em algum momento após a competição. Na avaliação endoscópica apenas um equino apresentou grau 1 de hemorragia, que ocorreu durante a avaliação após o segundo final de semana de competição.

A contagem total de células nucleadas no LBA foi maior após a avaliação feita após a segunda competição em relação à primeira ($p = 0,017$). Entretanto, a avaliação após o período de repouso mostrou contagem de células menor em relação à segunda avaliação ($p = 0,003$) (Tabela 1).

No início do estudo, o percentual médio de neutrófilos estava acima do limite superior considerado para o LBA de cavalos normais. Observou-se um aumento na porcentagem de neutrófilos no LBA após o período de repouso quando comparado aos valores da primeira ($p = 0,033$) e da segunda avaliação ($p = 0,005$) (Tabela 1).

A percentagem média de linfócitos no LBA foi menor durante o repouso quando comparado com a segunda ($p = 0,020$) e primeira avaliação pós-exercício ($p = 0,017$) (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultados (médias \pm desvio padrão da média) da contagem total de células nucleadas e de eritrócitos e, contagem diferencial de células do lavado broncoalveolar de cavalos avaliados após 2 dias de competição de salto em 1,00 m – 1,20 m e após período de 50 dias de repouso.

Avaliação	Primeira	Segunda	Terceira (Repouso)
NTCN (célis/ μ L de LBA)	55,0 \pm 24,5	83,6 \pm 34,8	15,5 \pm 9,1 ^a
Macrófagos	25,2 \pm 1,2	31,5 \pm 5,1	27,0 \pm 3,3
Neutrófilos	17,7 \pm 4,3	7,6 \pm 7,4	25,9 \pm 5,6 ^b
Linfócitos	53,5 \pm 5,1	53,9 \pm 10,6	37,8 \pm 6,8 ^c
Eosinófilos	0,7 \pm 1,2	1,7 \pm 2,8	1,6 \pm 1,8
Mastócitos	0,3 \pm 0,3	1,7 \pm 1,0 ^d	2,4 \pm 2,0 ^d
Hemossiderófagos	0,0 \pm 0,0	1,1 \pm 0,7	2,6 \pm 1,6 ^e
Eritrócitos (célis/ μ L de LBA)	0,9 \pm 0,4	5,2 \pm 3,1	1,0 \pm 0,5 ^f

NTNC, número total de células nucleadas. ^a $p = 0,017$ vs. Primeira; ^b $p = 0,005$ vs. Segunda; ^c $p = 0,020$ vs. Segunda; ^d $p = 0,030$ vs. Primeira; ^e $p = 0,032$ vs. Segunda; ^f $p = 0,014$ vs. Segunda.

Ocorreu aumento significativo na percentagem de mastócitos na segunda avaliação e no repouso ($p = 0,030$) quando comparados aos valores da primeira avaliação, que ocorreu após a competição (Tabela 1).

A contagem total de eritrócitos no LBA foi maior na segunda avaliação em relação à primeira ($p = 0,048$), sendo menor no repouso quando comparada à segunda avaliação ($p = 0,014$).

Com relação aos hemossiderófagos, o percentual médio foi maior na avaliação no período de repouso do que na segunda avaliação ($p = 0,032$), não aparecendo nas avaliações de LBA após a primeira competição (Tabela 1).

DISCUSSÃO

A HPIE, apesar de ainda ser considerada um problema do cavalo que realiza exercício de alta intensidade, foi demonstrada anteriormente em cavalos

de hipismo após competições de 1,00 m até 1,50 m (Viccino, 2007). No estudo citado, as avaliações foram realizadas através de endoscopia e, lavado traqueobrônquico para a observação de hemossiderófagos. No presente estudo também se demonstrou que o exercício considerado de intensidade máxima, como o salto em alturas em 1,00m a 1,20m, causa HPIE, detectado através da contagem total de eritrócitos e observação de hemossiderófagos no LBA.

A HPIE em cavalos após a realização de exercício submáximo foi inicialmente descrita por Epp *et al.* (2006), quando trotaram cavalos na esteira até atingirem a fadiga, demonstrando a ocorrência de HPIE. Portanto, sugeriram a existência de fatores extravasculares na etiopatogenia da HPIE. No estudo de Viccino (2007), citado acima, investigando a ocorrência de HPIE em cavalos que saltavam alturas entre 1,00m - 1,20m e, 1,30m - 1,50m, a HPIE foi detectada em 50% dos cavalos das alturas mais baixas e 66,7% nos demais. Entretanto, no presente estudo pode-se demonstrar a ocorrência de hemorragia decorrente de um período de competição e a associação com a inflamação pulmonar.

Contudo, em nosso estudo não se observou epistaxe assim como no estudo de Viccino (2007) e, somente observou-se sangue na traquéia de um cavalo em uma única avaliação. Outrossim, a HPIE foi evidenciada pelo aumento nas quantidades de eritrócitos no LBA na segunda avaliação realizada, o que reduziu significativamente após o período de repouso (Tabela 1). De fato, a contagem total de eritrócitos no fluido do LBA foi o método utilizado por Epp *et al.* (2006) para quantificar a HPIE e, demonstrado como eficiente para avaliar a ocorrência do quadro agudo de hemorragia pulmonar. A não ocorrência de epistaxe nos cavalos avaliados,

associado ao aumento na contagem de eritrócitos pós-competição, condiz com os achados de Meyer *et al.* (1998) que não observou epistaxe ou sinais de HPIE em animais avaliados após o esforço, porém a contagem de eritrócitos no LBA aumentou significativamente após o exercício, retornando aos valores de referência após uma semana. Assim, a não identificação de sangue no trato respiratório superior não garante que o cavalo é negativo para HPIE (Sweeney *et al.*, 1990).

Normalmente, cavalos são diagnosticados com HPIE quando vestígios de sangue são detectados na traqueia durante a endoscopia e/ou se houver presença de eritrócitos ou hemossideróforos no LBA (Sánchez *et al.*, 2005). No estudo de Michelotto Jr *et al.* (2011) a presença de hemossideróforos no LBA foi escolhido como marcador de HPIE e, esteve associado com inflamação pulmonar nos animais avaliados determinado pelo aumento na atividade do mediador pró-inflamatório fator de ativação plaquetária e nos indicadores de estresse oxidativo. O aumento no número de hemossideróforos demonstra que os animais sofreram algum episódio anterior de HPIE, já que o hemossideróforo pode ser detectado até 3 semanas após um único episódio de hemorragia (Araya *et al.*, 2005).

No presente estudo, a inflamação pulmonar foi evidenciada inicialmente pelo aumento na contagem total de células nucleadas após o exercício, tal como no estudo de McKane *et al.* (1993) onde a contagem foi maior após o treino de intensidade mais elevada havendo redução dos valores com a diminuição na intensidade do treino. Essa característica se repetiu na avaliação da porcentagem de linfócitos, macrófagos e eosinófilos assim como observado por McKane *et al.* (1993).

O número percentual médio de neutrófilos no LBA dos cavalos no momento da primeira avaliação estava acima dos 5% considerados para cavalos normais (Michelotto Jr *et al.*, 2010) e em valor considerado para cavalos com doença inflamatória das vias aéreas (DIVA) (Couëtil *et al.*, 2007). A associação entre a HPIE e a DIVA foi demonstrada anteriormente em potros Puro Sangue Inglês de corrida (Michelotto Jr *et al.*, 2011). No presente estudo, o aumento na porcentagem de neutrófilos no LBA após o período de repouso indicou um processo inflamatório pulmonar que persistiu após o período de treinos e competições, estando relacionado com a presença do eritrócito nas vias aéreas, assim como observado no estudo de McKane e Slocombe (2002) quando inocularam sangue autólogo nas vias aéreas de cavalos, desenvolvendo uma inflamação moderada com uma resposta neutrofílica. Contudo, como os animais avaliados apresentavam DIVA no início do presente estudo, não se pode descartar que a inflamação pulmonar existente tenha sido fator de risco para a HPIE. Entretanto, apesar da associação entre ambas ter sido demonstrada os mecanismos fisiopatológicos ainda precisam ser demonstrados e, a falta de um grupo controle sem inflamação pode ser considerado como um ponto fraco do estudo e que poderia ter respondido a esta questão.

As alterações inflamatórias provocadas pela presença de eritrócitos associada à lenta remoção destas células das vias aéreas trás implicações no manejo de cavalos sangradores, como observado por Derksen *et al.* (2009) acumulando os efeitos adversos provocados pelo eritrócito nas vias aéreas devido ao curto intervalo entre competições e a recuperação.

CONCLUSÃO

No presente estudo demonstrou-se a ocorrência de hemorragia pulmonar induzida pelo exercício em cavalos de salto competindo em alturas de 1,00m – 1,20m, e a ocorrência de um processo inflamatório pulmonar associado.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Polícia Militar do Estado do Paraná e ao Regimento de Polícia Montada Coronel Dulcídio.

REFERÊNCIAS

ARAYA, O.; PALMA, P.; SALVI, M. *et al.* Endoscopic determination of exercise-induced pulmonary haemorrhage in Chilean Criollo horses. **The Veterinary Journal**, n.169, n.2, p.311-313, 2005.

BIRKS, E.K.; MATHIEU-COSTELLO, O.; FU, Z. *et al.* Very high pressures are required to cause stress failure of pulmonary capillaries in Thoroughbred racehorses. **Journal of Applied Physiology**, v.82,n.5, p.1584-1592, 1997.

BIRKS, E. K.; DURANDO, M. M.; Mc BRIDE, S. – Exercise-induced pulmonary hemorrhage. **Vet Clin Equine** v.19, n.1, p.87-100, 2003.

COUËTIL, L.L.; HOFFMAN, A.M.; HODGSON, J. *et al.* Inflammatory airway disease of horses. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.21, n.2, p.356-361, 2007.

DERKSEN, F.J.; WILLIAMS, K.J.; PANNIRSELVAM, R.R. *et al.* Regional distribution of collagen and haemosiderin in the lungs of horses with exercise-induced pulmonary haemorrhage. **Equine Veterinary Journal**, v.41, n.6, p.586-591, 2009.

EPP, T.S.; McDONOUGH P.; PADILLA, D.J. *et al.* Exercise-induced pulmonary haemorrhage during submaximal exercise. **Equine Veterinary Journal Suppl**, v.36, p.502-507, 2006.

GERBER, V.; STRAUB, R.; MARTI, E. *et al.* Endoscopic scoring of mucus quantity and quality: observer and horse variance and relationship to inflammation, mucus

viscoelasticity and volume. **Equine Veterinary Journal**, v.36, n.7, p.576-582, 2004.

HINCHCLIFF, K.W.; JACKSON, M.A.; BROWN, J.A. *et al.* Tracheobronchoscopic assessment of exercise-induced pulmonary hemorrhage in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.66, n.4, p.596-598, 2005.

HOLCOMBE, S.J.; ROBINSON, N.E.; DERKSEN, F.J. *et al.* Effect of tracheal mucus and tracheal cytology on racing performance in Thoroughbred racehorses. **Equine Veterinary Journal**, v.38, n.4, p.300-304, 2006.

McKANE, S.A.; CANFIELD, P.J.; ROSE, R.J. Equine bronchoalveolar lavage cytology: survey of thoroughbred racehorses in training. **Australian Veterinary Journal**, v.70, n.11, p.401-404, 1993.

McKANE, S.A.; SLOCOMBE, R.F. Alveolar fibrosis and changes in equine lung morphometry in response to intrapulmonary blood. **Equine Veterinary Journal Suppl.**, v.34, p.451-458, 2002.

MEYER, T.S.; FEDDE, M. R.; GAUGHAN, E. M. *et al.* Quantification of exercise-induced pulmonary hemorrhage with bronchoalveolar lavage. **Equine Veterinary Journal**, v.30, n.4, p.284-288, 1998.

MICHELOTTO, P.V.; MUEHLMANN, L.A.; ZANATTA, A.L. *et al.* Platelet-activating factor and evidence of oxidative stress in the bronchoalveolar fluid of Thoroughbred colts during race training. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.24, n.2, p.414-419, 2010.

MICHELOTTO, P.V.; MUEHLMANN, L.A.; ZANATTA, A.L. *et al.* Pulmonary inflammation due to exercise-induced pulmonary haemorrhage in Thoroughbred colts during race training. **The Veterinary Journal**, v.190, n.2, p.e3-e6, 2011.

PASCOE, J. R. Exercise-induced hemorrhage: a unifying concept – **Proceedings of the 42nd Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, December 8-11, 1996.

ROBINSON, N. E. Exercise induced pulmonary haemorrhage (EIPH): could Leonardo have got it right? **Equine Veterinary Journal**, v.19, n.5, p.370-376, 1987.

SÁNCHEZ, A.; COUËTIL, L.L.; WARD, M.P. *et al.* Effect of airway disease on blood gas exchange in racehorses. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.19, n.1, p.87-92, 2005.

SWEENEY, C. R.; SOMA, L. R.; MAXSON, A. D. *et al.* Effects of furosemide on the racing times of Thoroughbreds. **Am J Vet Res**, v.51, n.5, p.772-778, 1990.

VICINO, C. **Ocorrência de hemorragia pulmonar induzida por esforço em cavalos cavalos de salto no estado de São Paulo**. 2007. São Paulo, 66f. Dissertação (Mestrado), Curso de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo.

VIEL, L.; HEWSON, J. Bronchoalveolar Lavage. In: ROBINSON, N.E. **Current Therapy in Equine Medicine**, 5.ed., St. Louis: Saunders, 2003, p.407-411.

WEST, J.B. Pulmonary capillary stress failure. **Journal of Applied Physiology**, v.89, n.6, p.2483-2489, 2000.

WEST, J.B.; MATHIEU-COSTELLO, O. Stress failure of pulmonary capillaries as a mechanism for exercise induced pulmonary haemorrhage in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v.26, n.6, p.441-447, 1994.