

PERFIL LABORATORIAL NA DOENÇA ICTÉRICA DE ETIOLOGIA VIRAL E NÃO-VIRAL E A POSSÍVEL RELAÇÃO COM A DOENÇA RENAL

ALESSANDRA DE SOUZA E SILVA¹
MANOEL GOMES DA SILVA FILHO²
MANOEL DO CARMO P. SOARES²
JOSÉ RICARDO DOS SANTOS VIEIRA³

1. Farmacêutica-bioquímica, Curso de Especialização em Análises Clínicas, Centro Universitário do Pará, PA.
2. Pesquisador, Instituto Evandro Chagas, Belém, PA.
3. Professor Adjunto, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará. Pesquisador, Laboratório de Hematologia e Biologia Molecular, Trav. Breves, 1180, 66025-220, Belém. PA.

Autor responsável: J.R.S. Vieira. E-mail: jrvieira@ufpa.br

INTRODUÇÃO

A icterícia manifesta-se pelo depósito de bilirrubina na pele e mucosas e é caracterizada, quando os níveis séricos de bilirrubina total (BT) elevam-se acima de 2,0 mg/dL, podendo atingir valores acima de 30 mg/dL em doenças graves (STRAUSS, 2006). É um dos principais sinais associados à lesão do parênquima hepático que ocorre com a elevação da bilirrubina direta (BD) nas hepatites por vírus ou por causas metabólicas (p.ex.: hepatite alcoólica; síndromes de Gilbert, Dubbin-Johnson e do Rotor), ou quando o equilíbrio entre produção e remoção de bilirrubina é rompido pela produção excessiva de bilirrubina indireta (BI) em casos de hemólise (p.ex.: eritoblastose fetal, malária e anemias de causa genética), ou quando há comprometimento no fluxo biliar intra ou extra-hepático (p.ex.: litíase e atresia biliar) levando ao aumento de BD, principalmente (MORRIS, 2008; TOBÓN, 2009; AHLFORS, 2010; MUNCIE & NOURAIIE *et al.*, 2010; FLETCHER, 2001; KHALIL, 2010).

Uma importante causa de lesão hepática não viral está associada às reações adversas a medicamentos das mais variadas classes como antineoplásicos, antibióticos, ansiolíticos e anti-inflamatórios (ARANA, 2000; BJÖRNSON, 2009). Importante observar que doenças não-hepáticas, como o câncer de pâncreas, podem gerar icterícia em virtude de mecanismos obstrutivos no canal hepatopancretático que induz o refluxo da bile tanto para o fígado quanto para o pâncreas, uma vez que ambos os órgãos compartilham o mesmo duto excretor (SPERTI *et al.*, 2007).

Nas hepatites virais, fenômenos inflamatórios e necróticos são responsáveis pela lesão hepática e também pela indução de processos tumorais e mecanismos de obs-

trução intra-hepática e a consequente icterícia (TSAI & CHUNG, 2010). Além dos vírus das hepatites A (HAV) e B (HBV), três outros vírus são relacionados à hepatite viral: o da hepatite C (HCV), o da hepatite D (HDV) e o da hepatite E (HEV). O vírus da hepatite G (HGV), embora sem evidência de patogenicidade hepática, tem sido descrito em casos de hepatites (PURCELL, 1993; FOSTER, 2009). O HAV, o HBV e o HCV são prevalentes em toda a Amazônia enquanto que HDV está restrito a determinadas áreas da Amazônia Ocidental (BENSABATH *et al.*, 1997; FOSTER, 2009). O HEV tem sua prevalência marcadamente acentuada na Ásia Central, Oriente Médio, África e México, não possuindo importância epidemiológica no Brasil, apesar de ter havido uma mudança no padrão geográfico de sua distribuição nos últimos anos com vários registros em países Europeus (KRAWCZYNSKI *et al.*, 2001; PISCHKE *et al.*, 2010).

A icterícia corresponde a um sinal clínico importante, porém pode contribuir para a sintomatologia da doença associada, induzindo, desde prurido cutâneo, até lesões cerebrais graves, como nos casos de deposição de bilirrubina indireta no sistema nervoso (*kernicterus*), principalmente em neonatos (OKUMURA, *et al.*, 2009; AHLFORS, 2010).

Além da lesão hepática, uma importante implicação fisiopatológica observada em casos de icterícia pode ser a lesão renal induzida por aumento de fatores como a endotelina 1 (ET-1) e prostaglandina E2 (PGE2) que podem exercer papel nas complicações renais observadas em pacientes que apresentam icterícia de longa duração, como nos casos de icterícia obstrutiva (PADILLO *et al.*, 2009). Outra possível causa de lesão renal está associada à indução por anticorpos IgA ou depósito de fibrinogênio produzidos durante hepatites severas causadas por HAV,

que demonstram que a relação observada entre icterícia e lesão renal pode não ser apenas uma coincidência clínica (KAMURA *et al.*, 1993; HCAPARAKKADAVATHU *et al.*, 2007; CHEEMA *et al.*, 2004; SHROFF *et al.*, 2004).

Desta forma, em pacientes portadores de icterícia de origem viral ou não, a dosagem de uréia, creatinina, BT e frações (BD e BI) aliada às dosagens de enzimas hepáticas alanina-aminotransferase (AST ou TGO), aspartato-aminotransferase (ALT ou TGP), gama-glutamilmtransferase (GGT) e fosfatase alcalina (FA), além da avaliação de parâmetros hematimétricos (hemácias, hematócrito e hemoglobina) para a investigação de alterações hemolíticas, são atitudes rotineiras que podem ajudar a esclarecer a relação entre os parâmetros bioquímicos e hematimétricos em casos de icterícia.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados 111 prontuários de atendimento clínico-laboratorial de pacientes icterícios atendidos e cadastrados no banco de dados (HEPATOWARE®), procedentes de Belém e outras localidades do estado do Pará, atendidos e/ou recebidos na Seção de Hepatologia do Instituto Evandro Chagas (IEC) da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, referentes ao período de 02 de janeiro de 2007 a 30 de dezembro de 2008.

Foram selecionados pacientes com idade que variaram de dois a 82 anos, com idade média de 28 anos ($\pm 16,1$) e incluídos na amostragem aqueles que apresentaram concentração de BT igual ou superior a 2,0 mg/dL, que realizaram as dosagens bioquímicas de FA, GGT, AST, ALT e a pesquisa dos antígenos e anticorpos para infecção pelos vírus das hepatites A (anti-HAV IgM), B (HBsAg, anti-HBc IgM) e C (anti-HCV total). As dosagens bioquímicas foram realizadas por métodos espectrofotométricos e os métodos imunoenzimáticos foram realizados utilizando kits comerciais (Biomérieux®, Biokit®, Ortho-3®), os quais foram realizadas no laboratório de bioquímica da seção de patologia do IEC em Autoanalisador de Bioquímica Clínica Cobas Mira Plus®, da Roche®.

Os parâmetros bioquímicos e hematimétricos foram analisados em distribuições de frequências e em análise gráfica, para visualização do comportamento e distribuição das variáveis. A análise de variância (ANOVA) comparativa entre as diversas etiologias associadas à icterícia (viral e não-viral) foi realizada utilizando-se a correção de Bonferroni, quando necessária. Para a comparação entre os valores dos parâmetros laboratoriais e os valores de referência (Tabela 1), um teste *T-student* foi realizado. A análise de relação entre os eventos foi estimada por meio do parâmetro *Odds Ratio*. Em todas as análises estatísticas foi considerado significativo um valor $p < 0,05$. Na tabu-

lação dos dados foram utilizadas planilhas eletrônicas do MS Excel® e as análises estatísticas foram realizadas por meio do programa BIOESTAT versão 5.0 (AYRES, 2007).

Tabela 1. Valores de referência para os parâmetros bioquímicos e hematimétricos utilizados para análise estatística no presente estudo.

Parâmetros laboratoriais	Valores de Referência*
Bilirrubina total	0,1 – 1,2 mg/dL
Bilirrubina direta	< 0,3 mg/dL
Bilirrubina indireta	0,1 – 1,0 mg/dL
TGO/AST	5 – 40 UI/L
TGP/ALT	7 – 56 UI/L
Fosfatase alcalina	20 – 130 UI/L
Gama-GT	5 – 40 UI/L
Uréia	10 – 40 mg/dL
Creatinina	0,6 – 1,2 mg/dL
Hemoglobina**	12,3 – 17,5 g/dL
Hematócrito**	35,9 – 50,4%
Hemácias**	4,5 – 5,9 x 10 ⁶ /μL

* Segundo ZAGO *et al.* (2005) e HENRY (2001)

** Considerando o valor mínimo para mulheres e máximo para homens

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 111 prontuários de pacientes portadores de icterícia analisados, 56% (62) pertenciam ao sexo masculino e 44% (49) ao sexo feminino. Foi observada uma prevalência de icterícia de etiologia viral em 68,5% (76) dos casos, com 61 casos (80,3%) de HAV, oito casos de HBV (10,5%) e oito casos de HCV (9,2%) (Figura 1). Em apenas um dos casos, o paciente era portador de HAV e HBV, conjuntamente. Não foram observados casos de HCV concomitante com outro vírus. Estes resultados corroboram os dados do Ministério da Saúde que apontam a HAV como o principal agente etiológico de hepatites virais (BRASIL, 2005).

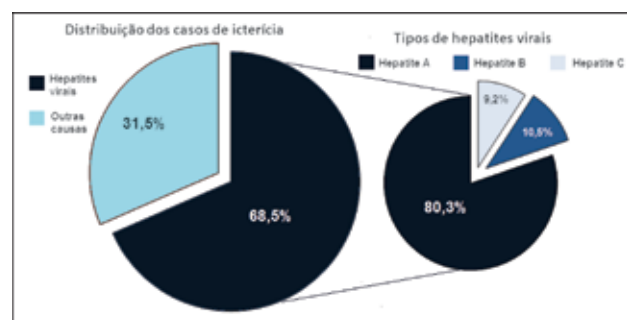


Figura 1. Distribuição das etiologias entre 111 pacientes portadores de icterícia atendidos no Instituto Evandro Chagas em 2007 e 2008.

Nos 35 demais casos correspondentes à icterícia não viral (31,5%), malária por *Plasmodium vivax*, etilismo e litíase biliar foram descritas em três pacientes diferentes (8,6%), enquanto que a presença de esteatose hepática e doença autoimune foram descritas em somente um paciente cada. Em um prontuário, foi constatada a informação de que o paciente era portador do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), malária e etilismo e em outro o paciente apresentava esteatose e hanseníase. Uma possível razão para a icterícia nesses casos pode estar relacionada à hepatite tóxica em consequência à terapia medicamentosa agravada pelas demais etiologias. A ocorrência de

outras etiologias (não descritas no prontuário) totalizou 24 casos (21,6%), indicando que o preenchimento dos prontuários precisa ter maior acurácia.

Como era de se esperar, os valores médios de todas as dosagens bioquímicas relacionadas à função hepática (bilirrubinas, ALT, AST, GGT e FA), apresentaram elevação altamente significativa em relação aos valores de referência ($p < 0,001$) (Tabela 2).

Contudo, a análise de variância dentre os casos de icterícia viral em relação aos casos de icterícia não-viral, revelou haver diferença significativa entre alguns parâmetros laboratoriais, como pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 2. Variação dos parâmetros bioquímicos e hematimétricos em 111 pacientes portadores de icterícia atendidos pelo Instituto Evandro Chagas em 2007 e 2008.

Parâmetros Laboratoriais	Bilirrubina plasmática (mg/dL) (Média ± desvio padrão)				
	Não-Viral	Viral (Total)*	Hepatite A	Hepatite B	Hepatite C
Bilirrubina total (mg/dL)	6,5 (4,1)	7,3 (4,2)	7,5 (4,1)	9,0 (4,2)	3,4 (2,1)
Bilirrubina direta (mg/dL)	3,3 (3,3)	3,3 (2,6)	3,3 (2,5)	5,1 (3,4)	1,2 (1,0)
Bilirrubina indireta (mg/dL)	3,2 (2,0)	4,0 (2,1)	4,3 (2,2)	3,9 (1,9)	2,2 (1,3)
TGO/AST (UI/L)	306 (567)	539 (797)	592 (866)	512 (427)	123 (55)
TGP/ALT (UI/L)	311 (605)	896 (962)	969 (998)	917 (899)	271 (328)
Fosfatase alcalina (UI/L)	392 (424)	318 (208)	336 (219)	215 (81)	322 (176)
Gama-GT (UI/L)	466 (584)	294 (216)	301 (223)	261 (186)	306 (201)
Uréia (mg/dL)	35,6 (34,9)	29,5 (25,8)	23,8 (28,6)	20,1 (8,8)	25,5 (8,3)
Creatinina (mg/dL)	1,1 (1,2)	0,7 (0,6)	0,7 (0,6)	0,7 (0,2)	8,8 (0,1)
Hemoglobina (g/dL)	12,7 (1,5)	13,4 (1,8)	13,4 (1,8)	13,6 (1,7)	13,0 (1,4)
Hematócrito (%)	33,7 (5,0)	41,0 (5,3)	41,0 (5,5)	41,9 (5,1)	39,9 (4,8)
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	4,5 (0,6)	4,8 (0,6)	4,9 (0,6)	4,8 (0,6)	4,4 (0,5)

* Correspondente a todos os casos de icterícia viral por hepatites A, B e C.

Tabela 3. Análise de variância (ANOVA um critério) para parâmetros laboratoriais de 111 pacientes portadores de icterícia de origem viral atendidos pelo Instituto Evandro Chagas em 2007 e 2008 em relação aos pacientes com icterícia não-viral.

Parâmetros laboratoriais	Tipo de icterícia viral *			
	Total**	Hepatite A	Hepatite B	Hepatite C
Bilirrubina total (mg/dL)	0,6557	0,2278	0,1261	0,0464
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,9437	0,0026	0,1767	0,0871
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,0472	0,0159	0,6579	0,1721
TGO/AST (UI/L)	0,1181	0,0798	0,6572	0,6173
TGP/ALT (UI/L)	0,0017	0,0010	0,0236	0,0729
Fosfatase alcalina (UI/L)	0,2202	0,5892	0,2479	0,5234
Gama-GT (UI/L)	0,0241	0,0478	0,6625	0,5970
Uréia (mg/dL)	0,0426	0,0720	0,2219	0,5094
Creatinina (mg/dL)	0,0330	0,0553	0,6695	0,5653
Hemoglobina (g/dL)	0,0457	0,0565	0,1266	0,6178
Hematócrito (%)	0,0343	0,0449	0,1046	0,5966
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	0,0107	0,0058	0,1563	0,7284

* Valores p com valores significativos ($< 0,05$) estão destacados em negrito.

** Correspondente a todos os casos de icterícia viral por hepatites A, B e C.

Os resultados demonstram que há um aumento significativo dos valores de BI casos de hepatite viral ($p = 0,0472$), preferencialmente nos casos de hepatite A, o que pode estar relacionado a um erro amostral, tendo em vista os valores limítrofes de p , uma vez que não há correlação clínica entre o aumento preferencial de BI em casos de icterícias virais, uma vez que os valores de hematócrito e hemácias nos portadores de hepatite A mostram-se significativamente aumentados ($p = 0,0449$ e $p = 0,0058$, respectivamente).

Os casos de hepatite A revelaram aumento significativo de BD ($p = 0,0026$), ALT ($p = 0,0010$) e GGT ($p = 0,0478$), o que corrobora os dados que indicam que a lesão hepática causada pelo HAV são as mais extensas dentre as hepatites virais, apesar de reversíveis (BRASIL, 2005). Da mesma forma, os valores de ALT ($p = 0,0236$) em pacientes portadores de HBV e valores de BD ($p = 0,0464$) em portadores de HCV mostraram valores significativamente menores em relação aos demais tipos de icterícia virais e não virais, reforçando a ideia de que a lesão hepática desses vírus é menor em relação às demais etiologias.

Todavia, há de se convir que a amostragem não foi estratificada quanto ao tempo de instalação da doença de base o que pode ser um importante *bias* na análise estatística, aliado ao fato do pequeno número amostral de portadores de HBV (oito pacientes) e HCV (sete pacientes).

Em relação à investigação da função renal, analisando os dados da Tabela 2, apenas sete pacientes apresentaram creatinina significativamente elevada em relação aos valores de referência ($p = 0,0218$) e dez pacientes apresentaram hiperúremia significativa ($p = 0,0085$), dentre os quais seis pacientes possuíam também hipercreatininemia. Entretanto, as dosagens de uréia ($p = 0,2730$) e creatinina ($p = 0,5704$) não variaram significativamente na amostragem, quando relacionadas com a presença de icterícia, sem relacionar com a etiologia (viral ou não viral), o que sugere não haver relação entre o aumento dos níveis de uréia e creatinina em relação à presença de icterícia nos pacientes investigados. Não foram observadas diferenças significativas entre os valores hematimétricos em todos os grupos estudados.

Entretanto, a análise da Tabela 3 demonstra um aumento significativo das dosagens de uréia ($p = 0,0426$) e creatinina ($p = 0,0330$) nos pacientes portadores de hepatite de origem não-viral em relação aos portadores de icterícia viral, quando não se define o tipo de hepatite. Contraditoriamente, a análise de risco (*Odds Ratio*) se revelou não significativa para as dosagens de creatinina ($p = 0,6830$) mas significativa para as dosagens de uréia ($p = 0,0010$; OR = 0,0900), o que pode ser um indicador de que há uma tendência a aumento preferencial dos parâmetros de avaliação da função renal em pacientes com icterícia

não-viral e uma certa “proteção” contra a lesão renal em pacientes portadores de hepatite viral, uma vez que os valores de OR mostram-se abaixo de 1,0.

Estes dados podem ser relacionados a uma lesão renal induzida por aumento de fatores como a endotelina 1 (ET-1) e prostaglandina E2 (PGE2) típicos dos processos não-virais, não se podendo descartar a possibilidade da existência de *bias* estatístico, pois a amostra não foi estratificada quanto à duração da doença de base, uma vez que existe a possibilidade de haver uma queda relativa nas concentrações de uréia em pacientes com extensa lesão hepática (HENRY, 2001; BRASIL, 2005). Por outro lado, pode-se supor que os casos de hepatites virais, por não cursarem com icterícia com longa duração em relação às causas não virais, sejam as formas de icterícia que tenham esta certa “proteção” contra o aumento de uréia e creatinina.

Os resultados do presente trabalho apontam para uma possível relação entre a presença de icterícia não viral e o aumento de uréia e creatinina plasmática, porém somente a dosagem dos fatores ET-1 e PGE2 e uma melhor caracterização da amostragem quanto ao tempo de instalação da doença, bem como informações complementares que podem melhorar a elucidação dos resultados, como o tipo e o tempo de uso de medicamentos, poderá elucidar uma definitiva relação da icterícia com a insuficiência renal.

AGRADECIMENTOS

Ao pessoal técnico e à Direção do Laboratório de Hepatologia do IEC por fornecer os dados necessários para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLFORS, C.E. Predicting bilirubin neurotoxicity in jaundiced newborns. *Curr Opin Pediatr.* v.22, p.129-33, 2010.
- ARANA, G.W. An overview of side effects caused by typical antipsychotics. *J Clin Psychiatry.* v.61, p.5-11, 2000.
- AYRES, A.M, AYRES-JR, A.M., AYRES, D.L., SANTOS, A.S. *BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas de ciências biológicas e médicas.* Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 2007.
- BENSABATH, G. Hepatites por virus. In: Leão RNQ. *Doenças Infecciosas e Parasitárias Enfoque Amazônico.* Belém, CEJUP, p.3135-334, 1997.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Hepatites virais: o Brasil está atento. Série B. Textos Básicos de Saúde.* Ministério da Saúde, Brasília, 2005.

- BJÖRNSSON, E. The natural history of drug-induced liver injury. *Semin Liver Dis.* v.29n.4, p.357-63, 2009.
- CHEEMA, S.R., ARIF, F., CHARNEY, D., MEISELS, I.S. IgA-dominant glomerulonephritis associated with hepatitis A. *Clin Nephrol.* 62(2):138-43, 2004.
- FLETCHER, D.R. Gallstones. Modern management. *Aust Fam Physician.* v.30, p.441-5, 2001.
- FOGARTY, B.J., PARKS, R.W., ROWLANDS, B.J., DIAMOND, M.R.T. Renal dysfunction in obstructive jaundice. *British Journal of Surgery.* v.82, p.877-884, 2005
- FOSTER, G.R. Recent advances in viral hepatitis. *Clin Med* v.9, p.613-6, 2009.
- HENRY, J.B. Diagnósticos Clínicos e Tratamento Por Métodos Laboratoriais. 20 ed, Manole, São Paulo, 2001.
- KAMURA, M., NAGASHIMA, T., IMAI, T., FURUKAWA, K., YAMAMOTO, N., IKEDA, Y. A case of acute hepatitis A with renal failure caused by fibrinogen deposits. *Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi.* v.90, p.2936-9, 1993.
- KHALIL, B.A., PERERA, M.T., MIRZA, D.F. Clinical practice: management of biliary atresia. *Eur J Pediatr.* v.169, n.4, p.395-402, 2010.
- KRAWCZYNSKI, K., KAMILI, S., AGGARWAL, R. Global epidemiology and medical aspects of hepatitis E. *Forum (Genova).* v.11, n.2, p.166-79, 2001.
- MUNCIE, H.L., CAMPBELL, J. Alpha and beta thalassemia. *Am Fam Physician.* v.80, p.339-44, 2009.
- NOURAIIE, M., READING, N.S., CAMPBELL, A., MINNITI, C.P., RANA, S.R., LUCHTMAN-JONES, L., KATO, G.J., GLADWIN, M.T., CASTRO, O.L., PRCHAL, J.T., GORDEUK, V.R.. Association of G6PD with lower haemoglobin concentration but not increased haemolysis in patients with sickle cell anaemia. *Br J Haematol.* v.150, p.218-225, 2010.
- OKUMURA, A., KIDOKORO, H., SHOJI, H., NAKAZAWA, T., MIMAKI, M., FUJII, K., OBA, H., SHIMIZU, T. Kernicterus in preterm infants. *Pediatrics.* v.123, n.6, p.1052-8, 2009.
- PADILLO, F.J., CRUZ, A., ESPEJO, I., BARCOS, M., GÓMEZ-ALVAREZ, M., MUNTANÉ, J. Alteration of the renal regulatory hormonal pattern during experimental obstructive jaundice. *Rev Esp Enferm Dig.* v.101, n.6, p.408-12, 2009.
- PARAKKADAVATHU, R.T., PISHARATH, S.V., CHEKKURA, A.P., KHANDEKAR, A., SONI, S.S., PARAMESWARAN, R.M., MELOTHVALAPIL, A. Acute renal failure in a patient with non-fulminant hepatitis A infection. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* v.18, n.3, p.422-5, 2007.
- PISCHKE, S., POTTHOFF, A., HAURÖDER, B., SCHLUÉ, J., MANNS, MP., CORNBERG, M., WEDEMEYER, H. Hepatitis E virus infection: a paradigm shift? *Dtsch Med Wochenschr.* v.135, n.22, p.1129-33, 2010.
- PURCELL, R.H. The Discovery of the hepatitis viruses. *Gastroenterology,* v.104, p.955-63, 1993.
- SHROFF, G.R., BADVE, S.V., JOSHI, A.G., DESAI, D.C., ABRAHAM, P., SIRSAT, R.A. Acute renal tubular injury with acute hepatitis A infection: is it just a coincidence? *Nephrology (Carlton).* v.9, n.1, p.44-6, 2004.
- SPERTI, C., FRISON, L., LIESSI, G., PEDRAZZOLI, S. The management of obstructive jaundice in pancreatic cancer. *Ann Ital Chir.* v.78, n.6, p.469-74, 2007.
- STRAUSS, E. Síndrome icterica. *Gastroenterol Endosc Dig.* v.25, p.76-86, 2006.
- SUZUKI, A., KUMASHIRO, R., SHIRACHI, M., KUROKI, M., SUZUKI, H., TANIKAWA, K., SATA, M. Markedly prolonged jaundice from simultaneous infection with hepatitis E virus and leptospira. *Kurume Med J.* v.50, n.3-4, p.155-9, 2003.
- TOBÓN, A. Danger signs in the malaria patient. *Biomedica.* 29(2):320-9, 2009.
- TSAI, W.L., CHUNG, R.T. Viral hepatocarcinogenesis. *Oncogene.* v.29, n.16, p.2309-24, 2010.
- ZAGO, M.A., FALCÃO, R.P., PASQUINI, R. Hematologia: fundamentos e prática. Atheneu. São Paulo, 2005.