

# Endotelio y reestenosis coronaria

Darío Echeverri · Bogotá

## Introducción

La reestenosis coronaria (RC) se define como todos los mecanismos de reparación arterial que se generan a nivel local en la arteria sometida a un trauma vascular agudo, luego de haber sido sometida a procedimientos de intervención percutánea tales como la angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP), implante de stents, aterectomías, láser, etc. Por ende, es una enfermedad iatrogénica. A pesar de conocerse muchos factores de riesgo independientes para desarrollar RC (diabetes mellitus, vasos pequeños, bifurcaciones, etc.), no se sabe con exactitud qué paciente, arteria o lesión sufrirá una RC. Existen diferentes criterios angiográficos para considerar la RC (Tabla 1).

La RC tiene la edad de la ACTP. Se presenta aproximadamente en 40% de los pacientes sometidos a este procedimiento. Esta incidencia es inaceptablemente alta y es causa importante de morbimortalidad, ya que 15-20% de las intervenciones percutáneas son en lesiones con RC. Más de 50.000 pacientes/año con RC requieren *bypass* coronario. Los costos anuales son superiores a 1.5 billones de dólares. Todas estas condiciones hacen que la RC sea considerada como un "problema de salud pública" y sea materia de investigación científica para entenderla, prevenirla y tratarla.

Existen diferencias profundas entre la aterosclerosis y la RC. Esta es por lo tanto considerada como una enfermedad independiente, con etiología, comportamiento, evolución, fisiopatología, clínica y tratamiento diferente a la aterosclerosis. Durante la aterosclerosis existe un trauma endotelial crónico persistente y la disfunción endotelial es

permanente. La lesión obstructiva es más superficial (subendotelial), por dentro de la lámina elástica interna. La neointima formada cursa por diferentes estadios, rica en células inflamatorias (macrófagos), lípidos (ésteres de colesterol) y calcio. El contenido de lípidos oxidados es abundante. La remodelación vascular es adaptativa durante la mayor parte del curso de la enfermedad. La aterosclerosis cuando cursa con características histopatológicas especiales, se convierte en una placa vulnerable, manifestándose clínicamente como síndromes coronarios agudos. La RC es diferente. El trauma endotelial es agudo por el balón, la disfunción endotelial es transitoria, la lesión vascular es profunda con lesión de la lámina elástica interna, la media y aun en ocasiones de la adventicia. La neointima está formada principalmente por células de músculo liso vascular (CMLV) y matriz extracelular (MEC). El contenido de lípidos y células inflamatorias es escaso. La remodelación vascular es inicialmente adaptativa por pocas semanas, y luego cursa con un fuerte componente constrictivo. Por las características histológicas de la neointima, la "vulnerabilidad" es muy rara y no es usual que se manifieste clínicamente como un síndrome coronario agudo.

## Fisiopatología de la reestenosis

La respuesta del vaso a las intervenciones coronarias es compleja, principalmente cuando hay trauma de la lámina elástica interna y la capa media. En algunos casos el proceso de reparación vascular es excesivo y se manifiesta como una estenosis recurrente con importancia clínica y angiográfica. Basados en experimentos animales, células en cultivo, evidencias clínicas y patológicas humanas, estudios angiográficos, ultrasonido intravascular (IVUS) y angioscopia, se ha logrado conocer una secuencia de eventos fisiopatológicos durante la RC. Se considera un proceso complejo que puede ser dividido en seis fases dinámicamente interrelacionadas entre sí, unas consecuencia de otras, que pueden presentarse al mismo tiempo o aun potenciarse recíprocamente. Durante el curso de la RC, existen las fases bien identificadas que contribuyen en forma independiente o de manera sinérgica al desarrollo de la RC. 1. Retroceso elástico; 2. Agregación plaquetaria y trombosis; 3. Formación neointimal; 4. Remodelación vascular; 5. Apoptosis y 6. Angiogénesis.

El endotelio desempeña un papel en la fisiopatología de la RC, de diferentes maneras: 1. Protagonista: dado por un

Tabla 1. Criterios diagnósticos de reestenosis con seguimiento angiográfico.

- |   |
|---|
| 1. Reducción $\geq 30\%$ en el diámetro de la estenosis (NHLBI 1).  |
| 2. Un resultado inmediato luego de la ACTP con diámetro de la estenosis $< 50\%$ , que incrementa $\geq 70\%$ al seguimiento (NHLBI 2). |
| 3. Retorno de 10% del diámetro de la estenosis pre ACTP (NHLBI 3).  |
| 4. Pérdida de al menos 50% de la ganancia inicial (NHLBI 4).  |
| 5. Diámetro de estenosis $\geq 50\%$ .  |
| 6. Diámetro de estenosis $\geq 70\%$ .  |
| 7. Área de estenosis $\geq 85\%$ .  |
| 8. Estenosis inmediata luego de la ACTP $< 50\%$ y que se incrementa a $\geq 50\%$ en el seguimiento.                                   |
| 9. Reducción de $\geq 20\%$ en el diámetro de la estenosis.   |
| 10. Pérdida de $\geq 1 \text{ mm}^2$ en el área de la estenosis.  |
| 11. Pérdida de $\geq 0.50 \text{ mm}$ en el diámetro luminal mínimo.  |
| 12. Pérdida de $\geq 0.72 \text{ mm}$ en el diámetro luminal mínimo.  |

F t0F ct"q"Gej gxgttK'ctekx-<Lghg"J go qf kpc co kc. 'Hspf cels»p'Ectf lq"tphcpwn"tphukwq" f g'Ectf lqmqi' tE0Dqi qv' .F (E0'

incremento en la síntesis endógena de endotelina-1 (ET-1), reducción en la síntesis de óxido nítrico (ON) e incremento en la síntesis de colágeno; 2. Facilitador: favorece la agregación plaquetaria, el retroceso elástico y la inflamación local y 3. Oculto: dado por el posible papel que tiene en el desarrollo de la angiogénesis, la apoptosis y la remodelación vascular.

### Endotelio y retroceso elástico

El retroceso elástico es la pérdida aguda (minutos a 24 horas) del lumen ganado con la ACTP. Existe un incremento de estenosis residual de más de 10% o pérdida  $\times 0.3$  mm en el diámetro del segmento intervenido. Se presenta entre 15 y 65% de los pacientes sometidos a ACTP. Se considera secundario a las propiedades elásticas de la arteria y a la vasoconstricción generada por la liberación aguda de las sustancias vasoactivas locales (ET-1, tromboxano A<sub>2</sub>, serotonina, etc.), muchas de ellas procedentes del endotelio traumatizado agudamente.

### Endotelio y trombosis

Los pacientes con trombosis local durante la ACTP tienen un mayor riesgo de RC. El trauma y la denudación endotelial existente, inducen una exposición de tejidos altamente trombogénicos a nivel subendotelial (factor tisular, lípidos, colágeno, etc.). Además, el gene del factor tisular sufre *up-regulation* a nivel de la media y adventicia arterial. La denudación endotelial se acompaña de activación plaquetaria aguda; las plaquetas sufren severos cambios conformacionales en los receptores celulares (Gp I $\alpha$ /IIIa), activación celular y liberación de sustancias vasoactivas y factores de crecimiento con gran actividad a nivel de las CMLV y activación de los macrófagos locales. De esta manera el trombo favorece el retroceso elástico, la inflamación, la proliferación celular y la síntesis de MEC.

### Endotelio y formación neointimal

Existe una gran variedad de vías por las cuales el endotelio disfuncionante por el barotrauma podría favorecer la formación neointimal. La síntesis de ET-1, la reducción de ON y el polimorfismo *FID* de la ECA son los principales mecanismos para tener en cuenta.

### Endotelina en la patogénesis de la reestenosis

La ET-1 tiene varios mecanismos por los cuales puede favorecer la RC (Tabla 2). Además de ser el vasoconstrictor más potente, la ET-1 es un inductor de proliferación de las CMLV en cultivo. Regula la expresión de varios genes que favorecen la fosforilación de proteínas citosólicas y transmembrana: proteína quinasa de mitógeno activada -p42(MAPK), S6 quinasa y proteína-tirosina-quinasa pp60 (c-src).

La ET-1 induce la expresión de protooncogenes: c-fos, c-jun, c-myc, y VL-30. Favorece la expresión de factores de crecimiento tales como PDGF, EGF, TGF-beta, bFGF, insulina, IGF-1, vasopresina y bombesina. Así mismo, la

ET-1 estimula la hipertrofia y la síntesis proteica de CMLV (a través del receptor ET(A)). Incrementa la incorporación de (3H) timidina y el número local de CMLV. Las CMLV de aorta estimuladas con balón en ratas, expresan el RNAm de la ET-1, sintetizan cinco veces más ET-1 biológicamente activa, la velocidad de crecimiento celular se incrementa seis veces y la respuesta es posteriormente frenada con antagonistas de la ET-1 (BQ-123). Además la ET-1 ha demostrado ser un comitógeno, con potente acción sinérgica sobre otros factores de crecimiento. La ET-1 incrementa la liberación de factores quimiotácticos (TNF-ALFA, MCP-1, IL-1Beta, IL-6, IL-8) que inducen la síntesis de moléculas de adhesión y facilitan la infiltración de células inflamatorias a nivel local. La ET-1, a través de receptores ET(A) y ET(B) incrementa la síntesis de colágeno tipo I y III y reduce la actividad de la colagenasa en fibroblastos cardíacos favoreciendo la formación y síntesis de MEC.

La ET-1 (1251) exógena administrada por vía parenteral se ha detectado en placas ateroscleróticas de conejos, lesiones hiperplásicas femorales de cerdos, ateromas de coronarias y puentes venosos humanos. La infusión en ratas de ET-1 induce un incremento de la neointima de las carótidas de 73%. Mediciones mediante RT/PCR, la expresión de RNAm que codifica la enzima convertidora de ET-1 (ECE-1) en carótidas de ratas, han permitido demostrar una duplicación de los niveles de ECE-1 a las 6 a 24 horas de un trauma, una duplicación del RNAm pre-endotelina en 3 a 7 días, un aumento del RNAm de receptores ET(A) en 20 veces en 3 a 7 días y un incremento del RNAm de receptores ET(B) en 20 veces en 1 a 3 días.

Existe evidencia del incremento en la producción de ET-1 en modelos animales de RC. En modelos de ratas con barotrauma, hay un incremento de la ET-1 en 3 a 7 días. Posteriormente la ET-1 proviene a nivel neointimal, con nivel máximo en 7 a 14 días. Hay inmunorreactividad plasmática bifásica de ET-1. El trauma con balón induce un incremento *de novo* en la síntesis de ET-1. El efecto de la ET-1 en la fase de remodelación vascular también ha sido considerado. La ET-1 suprime la apoptosis por privación sérica y la apoptosis inducida por ON. La ET-1 es un

Tabla 2. Papel de ET-1 en el desarrollo de la reestenosis.

- |     |  |
|-----|--|
| 1.  | Vasoconstricción.                              |
| 2.  | Inducción de mitogénesis.                      |
| 3.  | Favorece la síntesis de moléculas de adhesión. |
| 4.  | Favorece la acumulación de macrófagos.         |
| 5.  | Efecto citotóxico.                             |
| 6.  | Induce la proliferación y migración de CMLV.   |
| 7.  | Incrementa la síntesis de MEC.                 |
| 8.  | Favorece expresión de protooncogenes.          |
| 9.  | Facilita la apoptosis.                         |
| 10. | Ayuda a la remodelación vascular constrictiva. |

potente antiapoptótico de CMLV. El efecto de los antagonistas de la ET-1 en la formación intimal ha sido ampliamente investigado a nivel experimental. El efecto vasculoprotector en un modelo animal de reestenosis, usando SB209670 a dosis de 2.5 mg/kg por vía intraperitoneal, redujo en 53% la formación neointimal. Otros estudios han demostrado reducción de la lesión neointimal entre 28 y 79%, utilizando drogas como Ro46-2005, TAK-044, Bosentan, BMS182874, FR 139317 y BQ-123.

### Regulación de ON en la patogénesis de la reestenosis

La producción de ON se encuentra muy reducida luego del trauma endotelial durante la ACTP. Se ha encontrado una *down-regulation* de la sintetasa inducible del óxido nítrico (NOSi) encontrada en CMLV y macrófagos por los factores de crecimiento. Inicialmente hay una inducción de NOS tipo II, COX-2 y prostaciclina. Así mismo, métodos locales de liberación de ON o administración oral de L-arginina reducen la neointima hasta en 70%, con mínimo efecto sobre la remodelación vascular constrictiva inducida por el barotrauma.

El papel del ON, la ET-1 y la angiotensina II (AII) en la remodelación vascular de humanos es controvertido. Se ha demostrado que realizan papel central en la modulación de señales para RV los siguientes factores: 1. El VEGF (favorece la reendotelización, reduce la hiperplasia neointimal en 34%, promueve la neovascularización, incrementa la permeabilidad endotelial. 2. El PD-ECGF (45-kDa): promueve la angiogénesis y potencia el efecto de la remodelación vascular. 3. El FGF, PD-ECGF, PDGF que se correlacionan con angiogénesis.

### Endotelio y actividad de ECA tisular en la reestenosis

La enzima convertidora de la angiotensina (ECA) tiene un papel importante en la proliferación de CMLV, gracias a la ya demostrada activación de la AII y a la inhibición de bradiquininas. Además de los efectos proliferativos de la AII, mutaciones funcionales dentro o cerca al locus de la ECA pueden inducir polimorfismos. Existe documentación clínica acerca de la asociación entre RC y el genotipo D/D del gen de la ECA. Además, hay una estrecha relación entre los niveles séricos de ECA y la formación neointimal durante fenómeno de RC intrastent.

Además de obtener concentraciones séricas altas de ECA, 46.7% de los pacientes tenían genotipo D/D y la RC se presentó en 33.9%. Los individuos con genotipo I/D tuvieron RC en 16.3% y en pacientes con genotipo I/I la incidencia de RC fue de 2.9%.

### Endotelio, síntesis de colágeno y remodelación vascular

Existe una estrecha relación entre la cantidad de MEC y la remodelación vascular constrictiva (RVc). Lafont y cols, en un estudio realizado en conejos con aterosclerosis focal en arterias femorales demostraron que la severidad

de la reestenosis se correlaciona con la disfunción endotelial y la densidad local de colágeno, con base en los siguientes resultados:

- La reestenosis se correlaciona con RVc ( $r=0.69$ ,  $p=0.01$ ).
- La reestenosis no se correlaciona con formación neointimal ( $r=-0.06$ ,  $p=0.79$ ).
- La reestenosis se correlaciona con compromiso a la VD por Ach ( $r=0.61$ ,  $p=0.02$ ).
- La reestenosis no se correlaciona con VD por nitroprusiato de sodio ( $r=-0.25$ ,  $p=0.40$ ).
- La reestenosis se correlaciona positivamente con producción de colágeno ( $r=0.69$ ,  $p=0.004$ ).
- La relajación con la Ach fue menor en segmentos con RVc.
- El colágeno neointimal es mayor en arterias con RVc ( $34.5\% \pm 4.5\%$  vs  $18.2\% \pm 4.7\%$ ,  $p=0.03$ ).

### Bibliografía

1. Ardissino D, Barberis P, De Servi A, Merlini A, Brammuci E, Falcone C, Specchia G. Abnormal coronary vasoconstriction as a predictor of restenosis after successful coronary angioplasty in patients with unstable angina pectoris. *N Engl J Med* 1991; **325**:1053-1057.
2. Berk BC. Cell biology of restenosis: role of angiotensin II in neointimal cell proliferation. In: Vogel JHK, King III SD, eds. *The Practice of Interventional Cardiology*. St Louis, Mo: Mosby Year-Book Inc; 1993:527-533.
3. Chandra S, Clark L, Coatney RW, Phan L, Sarkar SK, Ohlstein EH. Application of serial in vivo magnetic resonance imaging to evaluate the efficacy of endothelin receptor antagonist SB 217242 in the rat carotid artery model of neointimal formation. *Circulation* 1998; **97**:2252-2258.
4. Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium. *Laboratory Investigation* 1983; **49**:327-333.
5. Echeverri D, Corzo O, Pineda M, Cortés A, Muñoz L, Santamaría G, Arias M, Rincón I, Rincón JD, López F, Briceño JC, González D, Velásquez C. Experiencia con porcinos como modelo experimental de reestenosis coronaria. *Rev Col Cardiol (Abstract)* 1997; **5**:71.
6. Echeverri D, Corzo O, Pineda M, Cortés A, Muñoz L, Santamaría G, Arias M, Rincón I, Rincón JD, López F, Briceño JC, González D, Velásquez C. Relación entre el diámetro del balón y el grado de trauma vascular en un modelo experimental en porcinos. *Rev Col Cardiol (Abstract)* 1997; **5**:75.
7. Echeverri D, Corzo O, Pineda M, Rincón JD, Rincón Y, Briceño JC, Charrys H, Arias M, Cortés A, Muñoz L, Ojeda P, Santamaría G. Comportamiento arterial ante el barotrauma en un modelo experimental en cerdos. Resúmenes Primeras Jornadas Latinoamericanas de Cardiología intervencionista. Agosto 1996.
8. Echeverri D, Pineda M, Corzo O, Arias M, Hernández C, Muñoz C. Modelo experimental de reestenosis coronaria posangioplastia en porcinos. *Rev Col Cardiol (Abstract)* 1997; **5**:46.
9. Echeverri D, Pineda M, Corzo O, Arias M, Muñoz C, Hernández C, Ibáñez M. Estudio de la remodelación vascular en un modelo experimental de reestenosis coronaria en porcinos. Resúmenes de Conferencias y Trabajos Libres. III Congreso Sociedad Latinoamericana de Cardiología Intervencionista. Santiago de Chile, Chile. 1999:23.
10. Echeverri D, Pineda M, Corzo O, Santamaría G, Arias ML, Hernández C, Muñoz C, Ibáñez M. Remodelación vascular: Comportamiento arterial para tener en cuenta. *Rev Col Cardiol* 1999; **7**:56-68.
11. Echeverri D, Pineda M, Corzo O, Santamaría G, Arias ML, Moncada M, Real E, Ibáñez M, López F, Rincón I. Comportamiento arterial ante el barotrauma coronario en un modelo experimental de reestenosis coronaria: Intervención con octreotido de somatostatina. *Rev Col Cardiol* 2000; **8**:49-61.
12. Echeverri D. Reestenosis coronaria: "latrogenia de fin de siglo?". *Cardiol Día* 1999; **2**: 665-674.
13. Echeverri D. Reestenosis Posevascularización. En: Roza R, Merchán A, Calderón J, Blanco M, Pineda M, Charria D, Vélez S eds. *Cardiología*. Ediciones Médicas Latinoamericanas; 1999: 523-526.
14. Fager G. Thrombin and proliferation of smooth muscle cells. *Circ Res* 1995; **77**:645-650.

15. Forrester JS, Fishbein M, Helfant R, Fagin J. A paradigm for restenosis based on cell biology: clues for the development of new preventive therapies. *J Am Coll Cardiol* 1991;17:758-769.
16. Gonzalez D, Briceño JC, Echeverri D. Análisis de modelaje computacional de los esfuerzos generados sobre cavidades de las arterias coronarias post angioplastia realizada en porcinos. *Rev Col Cardiol* (Abstract) 1997;5:53.
17. González D, Briceño JC, Echeverri D. Análisis de modelaje computacional de los esfuerzos generados sobre cavidades de las arterias coronarias por angioplastia realizada en porcinos. *Acta Med Colomb* 1998;24 (Abstract):53.
18. Graham DJ, Alexander JJ. The effects of thrombin on bovine aortic endothelial and smooth muscle cells. *J Vase Surg* 1990;11:307-313.
19. Hanke H, Strohschneider T, Oberhoff M, et al. Time course of smooth muscle cell proliferation in the intima and media of arteries following experimental angioplasty. *Cir Res* 1990;67:651-659.
20. Hirshfeld JW, Schwartz JS, Jugo R, et al. Restenosis after coronary angioplasty: a multivariate statistical model to relate lesion and procedure variables to restenosis. *J Am Coll Cardiol* 1991;18:647-656.
21. Ip J, Fuster V, Israel D, Badimon L, Badimon JJ, Stein B, Chesebro J. The role of platelets, thrombin and hyperplasia in restenosis after coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1991;17:77-88.
22. Lafont A, Durand E, Samuel JL, Besse B, Addad F, Lévy BI, Desnos M, Guérot C, Boulanger ChM. Endothelial dysfunction and collagen accumulation. Two independent factors for restenosis and constrictive remodeling after experimental angioplasty. *Circulation* 1999;100:1109-1115.
23. Lafont A, Guzman LA, Whitlow PL, Goormastic M, Cornhill JF, Chisolm GM. Restenosis after experimental angioplasty: intimal, medial and adventitial changes associated with constrictive remodeling. *Circ Res* 1995;76:996-1002.
24. Le Tourneau TL, Van Belle E, Coseaux D, Vallet B, Lebuffe G, Dupuis B, Leblanche JM, McFadden E, Bauters C, Bertrand ME. Role of nitric oxide in restenosis after experimental balloon angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit: Effects on neointimal hyperplasia and vascular remodeling. *J Am Coll Cardiol* 1999;33:876-882.
25. Lee PC, Gibbons GH, Dzau VJ. Cellular and molecular mechanisms of coronary restenosis. *Coron Art Disease* 1993;4:254-259.
26. Liu MW, Roubin GS, King II SB. Restenosis after coronary angioplasty. Potential biologic determinants and role of intimal hyperplasia. *Circulation* 1989;79:1374-1387.
27. Makkar RR, Sheth S, Whip P, Luo H, Fishbein MC, Dev V, Eigler NI, Litvach FI. Geometric remodeling predominantly accounts for luminal loss in rabbit iliac artery injury model: a serial intravascular ultrasound study. *Circulation* 1995;92:1-93.
28. Minamino T, Kurihara H, Takahashi M, Shimada K, Maemura K, Oda H, Ishikawa T, Uchiyama T, Tanzawa K, Yazaki Y. Endothelin-converting enzyme expression in the rat vascular injury model and human coronary atherosclerosis. *Circulation* 1997;95:221-230.
29. Nobuyoshi M, Kimura T, Nosaka H, et al. Restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty: serial angiographic follow-up of 229 patients. *J Am Coll Cardiol* 1988;12: 616-622.
30. Pineda M, Echeverri D, Corzo O, Arias M, Latorre J, Muñoz C, Hernández C. Uso de anticuerpos antiendotelina-1 en la prevención de la estenosis coronaria secundaria a barotrauma. Resúmenes de Conferencias y Trabajos Libres. III Congreso Sociedad Latinoamericana de Cardiología Intervencionista. Santiago de Chile, Chile. 1999:22.
31. Pineda M, Echeverri D, Corzo O, Latorre J, Arias ML, Santamaría G, Hernández C, Muñoz C. Impacto del uso de anticuerpos antiendotelina 1 sobre la estenosis arterial coronaria secundaria a barotrauma con balón en porcinos. *Rev Col Cardiol* 1999;7:394-403.
32. Rectenwald JE, Moldawer LL, Huber TS, Seeger JM, Ozaki K. Direct evidence for cytokine involvement in neointimal hyperplasia. *Circulation* 2000;102:1697-1702.
33. Ribichini F, Steffenino G, Dellavalle A, Matullo G, Colajanni E, Camilla T, Vado A, Benetton G, Uslenghi E, Piazza A. Plasma activity and insertion/deletion polymorphism of angiotensin I-converting enzyme. A major risk factor and a marker of risk for coronary stent restenosis. *Circulation* 1998;97:147-154.
34. Rodriguez AE, Santaera O, Larribeau M, Fernandez M, Perez Balino N, Newell JB, Roubin GS, Palacios IF. Coronary stenting decreases restenosis in lesions with early loss in luminal diameter 24 hours after successful PTCA. *Circulation* 1995 ;91:1397-1402.
35. Rodriguez AE, Santaera O, Larribeau M, Sosa MI, Palacios IF. Early decrease in minimal luminal diameter after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty predicts late restenosis. *Am J Cardiol* 1993;71:1391-1395.
36. Santamaría G, Ojeda P, Echeverri D. Imágenes de restenosis coronaria y aterogénesis en modelos experimentales. *Rev Col Cardiol* 2000;8:293-296
37. Steele P, Chesebro JH, Stanson AW, Holmes DR, Dewanjee MK, Badimon L, Fuster V. Balloon angioplasty: Natural history of the pathophysiological response to injury in a pig model. *Circ Res* 1992;57:105-112.