

## ARTIGO ORIGINAL

# Expressão de receptores de estrogênio, progesterona e Ki-67 em transexuais feminino para masculino em uso de androgênios

*Estrogen, progesterone and Ki-67 receptors expression in female to male transgender patients undergoing androgen therapy*

Ana Clara Araújo Costa<sup>2</sup>, Aline Regina Nunes<sup>1</sup>, Rosemar Macedo de Souza Rahal<sup>2</sup>, Mariluz Terra Silveira<sup>1</sup>, Marise Amaral Rebouças Moreira<sup>3</sup>, Denis Masashi Sugita<sup>3</sup>, Ruffo Freitas-Junior<sup>2</sup>

## Descritores

Transexuais  
Marcadores biológicos  
Androgênios

## RESUMO

**Introdução:** Os homens transexuais (TX) fazem uso de androgênios por uso prolongado, eventualmente, de forma indiscriminada. Sabe-se que os androgênios endógenos têm efeito inibitório no tecido mamário, enquanto a testosterona exógena pode exercer efeito indireto na mama ao ser convertida em estrogênio pela aromatização, colaborando, assim, para aumentar o risco de câncer de mama. **Objetivos:** Avaliar a expressão dos receptores de estrogênio, progesterona e Ki-67 no tecido mamário de transexuais feminino para masculino, mulheres biológicas e homens com ginecomastia. **Material:** Estudo de série de casos que incluiu 17 pacientes, sendo 5 transexuais submetidos à adenomastectomia, que fazem acompanhamento no Ambulatório de Transexualismo do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (UFG), 4 mulheres que realizaram mamoplastia redutora e 8 homens biológicos submetidos à cirurgia para correção de ginecomastia. Os espécimes cirúrgicos foram avaliados por imuno-histoquímica. **Resultados:** Os transexuais apresentaram menor taxa de reatividade dos receptores de estrogênio e progesterona, quando comparados com mulheres e homens biológicos, e todos os pacientes em uso de androgênio tiveram expressão do Ki-67  $\leq 1\%$ . A maior taxa de expressão do Ki-67 encontrada foi de 4,18% em homem com ginecomastia. **Conclusão:** A reatividade dos receptores de estrogênio e progesterona é menor nos pacientes transexuais feminino para masculino que fizeram uso de androgênios do que em mulheres e homens biológicos. A taxa de expressão do Ki-67 também é menor nos transexuais.

## ABSTRACT

**Introduction:** The female to male transsexual patients use androgens for a prolonged period and often without any medical supervision. Endogenous androgens have inhibitory effects on breast tissue, while exogenous testosterone may exert an indirect effect on the breast because of its aromatization into estrogen and it may even increase the risk of breast cancer. The Ki-67 is one of the most used antibodies for evaluation of cell proliferation. **Objectives:** Evaluate the expression of estrogen and progesterone receptors and Ki-67 expression in breast tissue of female to male transsexuals, biological women and men with gynecomastia. **Methods:** The study consists of a case series of 17 patients, 5 transgender submitted to adenomastectomy as part of their treatment at the Service to Transgenders provided by the

## Keywords

Transgendered persons  
Biological markers  
Androgens

Trabalho conduzido no Serviço de Transexualidade, no Programa de Mastologia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, e no Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás (UFG) – Goiânia (GO), Brasil.

<sup>1</sup>Serviço de Transexualidade no Programa de Mastologia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da UFG – Goiânia (GO), Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da UFG – Goiânia (GO), Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFG – Goiânia (GO), Brasil.

Endereço para correspondência: Ruffo Freitas-Junior – Programa de Mastologia do Hospital das Clínicas (UFG) – 1ª Avenida, s/n – Setor Leste Universitário – CEP: 74605070 – Goiânia (GO), Brasil – E-mail: ruffojr@terra.com.br

Conflito de interesses: nada a declarar.

Recebido em: 25/01/2015. Aceito em: 27/01/2015

*“Hospital das Clínicas” of the Federal University of Goiás, 4 women who underwent breast reduction and 8 biological men that underwent surgery for gynecomastia. All surgical specimens were evaluated by immunohistochemistry. Results: The transsexuals had a lower rate of expression of estrogen and progesterone receptors compared with biological men and women, and in all patients using androgen the expression of Ki-67 was  $\leq 1\%$ . The highest rate of expression of Ki-67 was 4.18% in a man with gynecomastia. Conclusion: The expression of estrogen and progesterone receptor is lower in female to male transsexual patients who used androgens in relation to biological men and women. The rate of expression of Ki-67 is also lower in transsexuals.*

## Introdução

O transexualismo é conceituado como uma condição na qual uma pessoa com diferenciação somática de um gênero está convencida de que ele ou ela é membro do sexo oposto<sup>1</sup>. Tal convicção é acompanhada por um desejo irresistível de viver no outro gênero, o que requer adaptações hormonais, legais, psicossociais e anatômicas<sup>2</sup>, sendo que as alterações anatômicas objetivando a aquisição das características sexuais secundárias do outro gênero são essenciais no processo de redesignação sexual<sup>3</sup>.

Em estudo com transexuais masculino para feminino evidenciou-se que o núcleo do leito da estria terminal, que corresponde à área de diferenciação sexual do cérebro, segue um padrão feminino<sup>4,5</sup>, sugerindo, dessa forma, uma condição de desordem intersexo, em que a diferenciação sexual do cérebro não é consistente com o padrão cromossômico, assim como com o sexo gonadal<sup>6</sup>.

O diagnóstico de transexualismo foi introduzido no Manual Diagnóstico e Estatístico das Desordens Mentais (DSM-III), em 1980, para os indivíduos com gênero disfórico que demonstrassem durante, pelo menos, dois anos um interesse contínuo em transformar o sexo do seu corpo e o *status* do seu gênero social<sup>7</sup>. Sua incidência é de 1:11.900 homens e de 1:30.400 mulheres<sup>8</sup>.

O transexualismo é um tema ainda pouco estudado e por isso permanecem vários questionamentos em aberto na literatura. No Brasil, são poucos os serviços especializados. Em estudo avaliando serviços de saúde que fornecem atendimento aos transexuais no país foram identificados dez centros especializados, sendo que somente quatro eram credenciados ao Sistema Único de Saúde (SUS) como Centros de Referência para o atendimento interdisciplinar a usuários transexuais e recebiam recursos para realização de procedimentos cirúrgicos<sup>9</sup>. Consequentemente, grande parte desses indivíduos chega a um serviço de redesignação sexual já em uso prolongado e indiscriminado de hormônios sexuais. Ressaltando que pouco se sabe sobre os efeitos colaterais e as consequências em médio e longo prazo de tal prática.

A ação dos hormônios esteroides sobre o tecido mamário está bem estabelecida. Sabe-se que o estrogênio e a progesterona atuam na promoção do crescimento e desenvolvimento mamário assim como o androgênio endógeno tem efeito inibitório.

Mulheres transexuais castradas submetidas à terapia estrogênica exibem histologia mamária feminina, ou seja, desenvolvimento lobular e acinar completo<sup>10</sup>.

Além disso, há uma grande quantidade de estudos que mostram que a terapia hormonal com estrogênio e progesterona tem papel importante na iniciação, promoção e progressão do câncer de mama<sup>11-13</sup>.

Já os androgênios têm importantes efeitos fisiológicos nas mulheres não só por serem precursores na produção de estrogênios, mas também porque agem diretamente por meio dos receptores de andrógenos em diferentes tecidos<sup>14</sup>. No tecido mamário a testosterona exógena pode exercer tanto efeito direto, pela ação mediada pelos receptores de androgênios, como indireto, ao ser convertida em estrógenos, podendo, com isso, aumentar o risco de câncer de mama<sup>15</sup>.

A ação desses hormônios sabidamente se dá pela ligação aos receptores hormonais, os quais podem ser dosados pela imuno-histoquímica. Os receptores de estrogênio  $\alpha$  e  $\beta$ , progesterona e androgênios estão presentes tanto no tecido mamário normal como em linhagens de células do câncer de mama, exercendo papel importante na evolução dessa neoplasia<sup>16,17</sup>.

Os ensaios de imuno-histoquímica também se aplicam na dosagem do Ki-67, que consiste em um anticorpo utilizado na avaliação da proliferação celular. O Ki-67 reage com uma proteína (antígeno) localizada no núcleo, presente em todas as fases ativas do ciclo celular, ou seja, G1, S, G2 e M, mas ausente na fase G0. Além disso, ele tem meia-vida muito curta, de uma hora ou até menos após a mitose<sup>18</sup>, o que garante que células que já saíram do ciclo não apresentem o antígeno, e sua marcação resulta numa avaliação bastante aproximada da fração de crescimento de uma população celular<sup>19</sup>. Tem aplicabilidade clínica como fator prognóstico na proliferação celular do carcinoma de mama<sup>20</sup>.

Apesar da riqueza de conhecimento sobre o tecido mamário feminino, são escassos os dados da literatura sobre o tecido mamário de indivíduos transexuais feminino para masculino, ou seja, homens transexuais (TX), submetidos à terapia hormonal. Considerando esse aspecto, conduziu-se o presente estudo com o objetivo de quantificar a expressão de receptores de estrogênio e progesterona, bem como a taxa de proliferação celular

pela expressão do Ki-67 nos pacientes transexuais masculinos em uso de terapia hormonal com androgênios, comparando-os com os dados do tecido mamário de homens com ginecomastia e mulheres submetidas à mamoplastia redutora.

## Pacientes e Métodos

Trata-se de um estudo de série de casos conduzido no Departamento de Ginecologia e Obstetrícia e no Departamento Patologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (HC-UFG), Goiânia, Brasil, para o qual coletou-se material histológico oriundo de espécime cirúrgico de tecido mamário de 17 pacientes.

Analisou-se tecido mamário de cinco TX submetidos à adenomastectomia. No programa TX-HC-UFG seis pacientes foram submetidos à cirurgia para redesignação sexual; no entanto, um foi excluído pois a adenomastectomia realizada foi por lipoaspiração, não havendo tecido para estudo. Todos esses pacientes fizeram uso de androgênios por um período mínimo de um ano antes de serem submetidos à adenomastectomia. O androgênio prescrito foi Durateston® na dose de uma ampola intramuscular de 21 em 21 dias. Cada ampola de Durateston® contém: Propionato de testosterona 30 mg, Fenilpropionato de testosterona 60 mg, Isocaproato de testosterona 60 mg e Decanoato de testosterona 100 mg.

De forma aleatória foi selecionado material oriundo de mamoplastia de quatro mulheres que realizaram mamoplastia redutora e de oito homens submetidos à cirurgia para correção de ginecomastia.

Os espécimes cirúrgicos foram submetidos à avaliação imuno-histoquímica no que diz respeito a receptores de estrogênio, progesterona e Ki-67. Foram utilizados anticorpos primários monoclonais de camundongo antirreceptores de estrogênio da marca Novocastra®, clone 6F11, na diluição de 1:500. Para análise dos receptores para progesterona, foi empregado o kit de detecção à base de polímeros Mach1 HRP-Polímero Kit® (Biocare Medical, EUA), utilizando-se para imunodeteção anticorpo primário dirigido ao receptor de progesterona (RP), marca Novocastra®, clone 16, na diluição de 1:500. Na avaliação do Ki-67 foi utilizado anticorpo primário monoclonal de camundongo da marca Novocastra®, clone MM1, na diluição de 1:400. A recuperação antigênica das reações do estrógeno e do Ki-67 deu-se por calor por meio de *Electric Pressure Cooker*, segundo o kit *MACH 1 Universal HRP-Polymer Detection*, da marca Biocare Medical® e da progesterona; os cortes foram submetidos à incubação com o reagente pós-primário e com os anticorpos secundários polimerizados, respectivamente, *Mach1 Probe®* e *Mach1 Polímero-HRP Universal®* (Biocare Medical, EUA). A revelação da reação foi feita com o cromógeno tetra-hidroclorato de 3-3' diaminobenzidina (DAB).

No estudo das lâminas foram contadas 200 células em cada, identificadas as células positivas e calculada a porcentagem de positividade dos receptores de estrogênio e de Ki-67. Para avaliação dos receptores de progesterona, em cada caso, contou-se 40 núcleos em cada 10 campos de grande aumento (objetiva de 40x), totalizando 400 núcleos. Obtinha-se então a porcentagem de núcleos positivos nas amostras e a reatividade para progesterona classificada como negativa ou positiva.

A positividade dos receptores de estrogênio e progesterona foi graduada em forte, moderada e fraca de acordo com a intensidade de coloração.

## Resultados

A média de idade entre TX, mulheres biológicas e homens com ginecomastia foi, respectivamente, de 29,6, 37,1 e 32,6 anos.

A intensidade da expressão dos receptores para estrogênio variou de 13,2 a 44%, 11 a 36% e <1 a 72,4%, respectivamente, nos pacientes transexuais, mulheres biológicas e homens com ginecomastia (Tabela 1).

A reatividade dos receptores de estrogênio foi fraca, moderada e forte, respectivamente, em 25, 12,5 e 62,5% dos casos de homens com ginecomastia. Nas mulheres biológicas a reatividade foi forte em todos os casos; nos transexuais a reatividade foi fraca em 60%, moderada em 20% e forte em 20% dos casos (Gráfico 1).

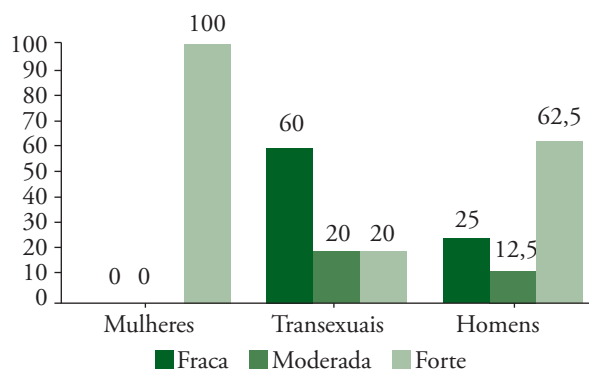
Em relação aos receptores de progesterona, a intensidade da expressão variou de 17,5 a 36%, 11 a 36,25% e 26,25 a 46,25%, respectivamente, em TX, mulheres e homens com ginecomastia (Tabela 2).

Na avaliação dos receptores de progesterona nos pacientes transexuais a reatividade foi fraca em 40%, moderada em 40% e forte em 20% dos casos. Nas mulheres a reatividade foi fraca,

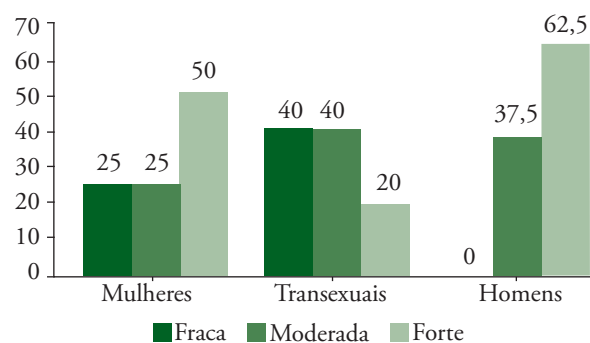
**Tabela 1.** Intensidade da expressão dos receptores de estrogênio por grupo

Intensidade da expressão RE (%)	Grupo T	Grupo M	Grupo G
0–10	0	0	1 (12,5%)
10,1–20	2 (50%)	1 (25%)	0
20,1–30	1 (25%)	0	1 (12,5%)
30,1–40	0	3 (75%)	2 (25%)
40,1–50	1 (25%)	0	0
50,1–60	0	0	1 (12,5%)
60,1–70	0	0	2 (25%)
70,1–80	0	0	1 (12,5%)
Total	4 (100%)	4 (100%)	8 (100%)

T: transexuais masculinos; M: mulheres; G: homens com ginecomastia; RE: receptor estrogênio.



**Gráfico 1.** Reatividade dos receptores de estrogênio de acordo com o grupo

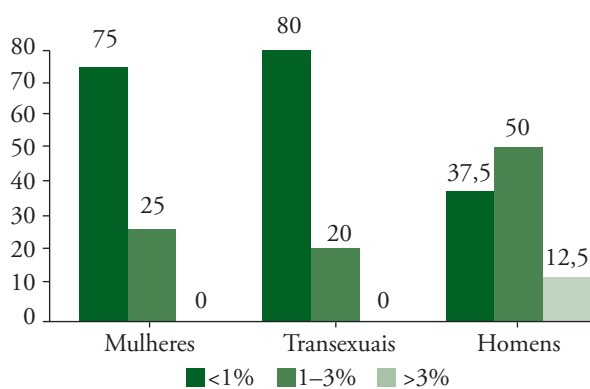


**Gráfico 2.** Reatividade dos receptores de progesterona de acordo com o grupo

**Tabela 2.** Intensidade da expressão dos receptores de progesterona por grupo

Intensidade da expressão RP (%)	Grupo T	Grupo M	Grupo G
0–10	0	0	0
10,1–20	2	2	0
20,1–30	1	1	2
30,1–40	1	1	2
40,1–50	0	0	2
50,1–60	0	0	2
Total	4 (100%)	4 (100%)	8 (100%)

T: transexuais masculinos; M: mulheres; G: homens com ginecomastia; RP: receptor progesterona.



**Gráfico 3.** Expressão do Ki-67 de acordo com o grupo

moderada e forte em 25, 25 e 50% dos casos, respectivamente. Já nos homens biológicos os índices foram de reatividade moderada em 37,5% e forte em 62,5% dos casos (Gráfico 2).

Ao avaliar os índices do Ki-67 foram verificados índices de proliferação de <1 a 2% nas mulheres, de <1 a 4,18% nos homens com ginecomastia e nos transexuais o maior índice foi de 1% (Gráfico 3).

## Discussão

Poucos são os dados disponíveis na literatura avaliando os efeitos do uso dos androgênicos no tecido mamário; com esta pesquisa foi possível obter informações sobre os achados imuno-histoquímicos dos espécimes cirúrgicos de adenomastectomia de TX em uso de terapia androgênica.

No presente estudo evidenciou-se menor reatividade dos receptores de estrogênio e progesterona em TX que fizeram uso de terapia com androgênicos, quando comparados às mulheres biológicas e aos homens com ginecomastia. Esses dados são condizentes com estudo de Burgess e Shousha<sup>21</sup> que comparou a taxa de receptores de estrogênio e progesterona em TX, mulheres biológicas e homens com ginecomastia e evidenciou

maior expressão dos receptores de estrogênio e progesterona nos pacientes com ginecomastia, mas não foi significativa a diferença da expressão dos receptores no tecido mamário dos TX e das mulheres. Devido à pequena amostragem de pacientes disponível para análise e também pelo curto período de observação não foi possível concluir se essa redução da reatividade dos receptores hormonais implicará na redução ou no aumento da incidência do câncer de mama nesses pacientes. Na literatura existe relato de câncer de mama em um homem transexual com adenectomia bilateral após 10 anos de tratamento com testosterona<sup>22</sup>.

Na mama normal o Ki-67 é pobremente expressado, sendo relatadas expressões abaixo de 3% em mamas não patológicas e no tecido mamário circunjacente a um fibroadenoma<sup>23</sup>, o que condiz com os dados encontrados no estudo, em que a expressão do Ki-67 variou de <1 a 4,18%, sendo o maior valor de proliferação encontrado em paciente com ginecomastia, e embora os valores de expressão do Ki-67 tenham sido menores nos TX, eles são bem próximos dos valores encontrados nas mamas não patológicas das mulheres submetidas à mastoplastia redutora.

No presente estudo não foi possível estabelecer se o uso de androgênicos altera de forma significativa a expressão dos receptores hormonais e a proliferação celular na mama nos pacientes

transexuais, devido ao pequeno número de pacientes disponíveis para análise. Contudo, o trabalho mostrou modificações no tecido mamário dos pacientes transexuais, despertando a atenção para linhas de pesquisas que possam compreender as modificações imuno-histoquímicas e as implicações clínicas que a terapia hormonal em longo prazo com andrógenos podem acarretar no tecido mamário de indivíduos transexuais. Este trabalho também suportou, em parte, os achados de que mesmo a utilização dos esteroides sexuais não parece aumentar o risco para câncer de mama em longo prazo em transexuais<sup>24</sup>.

## Conclusão

A terapia hormonal com uso de androgênios levou à redução da reatividade dos receptores hormonais para estrogênio e progesterona, bem como da taxa de proliferação celular avaliada por meio do Ki-67 no tecido mamário dos pacientes transexuais, quando comparados com mulheres biológicas e homens com ginecomastia.

## Referências

- Hembree WC1, Cohen-Kettenis P, Delemarre-van de Waal HA, Gooren LJ, Meyer WJ 3rd, Spack NP, Tangpricha V, Montori VM; Endocrine Society. Endocrine treatment of transsexual persons: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(9):3132-54.
- Gooren LJ, Giltay EJ, Bunck MC. Long-term treatment of transsexuals with cross-sex hormones: extensive personal experience. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:19-25.
- Mueller A, Gooren L. Review: Hormone-related tumors in transsexuals receiving treatment with cross-sex hormones. *Eur J Endocrinol.* 2008;159(3):197-202.
- Zhou J-N, Hofman MA, Gooren LJG, Swaab DF. A sex difference in the human brain and its relation to transsexuality. *Nature.* 1995;378:68-70.
- Kruijver FPM, Zhou J-N, Pool CW, Hofman MA, Gooren LJG, Swaab DF. Male-to-female transsexuals have female neuron numbers in a limbic nucleus. *J Clin Endocrinol Metabol.* 2000;85(5):2034-41.
- Gooren L. The biology of human psychosexual differentiation. *Horm Behav.* 2006;50(4):589-601.
- Athayde AVL. Transexualismo Masculino. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2001;45(4):407-14.
- Bakker A, Van Kesteren PJ, Gooren LJ, Bezember PD. The prevalence of transsexualism in the Netherlands. *Acta Psychiatr Scand.* 2002;87:237-8.
- Arán M, Murta D. Transexualidade e saúde: condições de acesso e cuidado integral. Instituto de Medicina Social da UERJ. Edital MCT – CNPq/MS-SCTIE – Nº 26/2006 [Internet]. [cited 2011 Oct 21]. Available from: [http://pdfc.pgr.mpf.gov.br/atuacao-e-conteudos-deapoio/publicacoes/direitos-sexuais-rereprodutivos/direitoslgbt/Relatorio\\_Preliminar\\_set\\_20092.pdf](http://pdfc.pgr.mpf.gov.br/atuacao-e-conteudos-deapoio/publicacoes/direitos-sexuais-rereprodutivos/direitoslgbt/Relatorio_Preliminar_set_20092.pdf)
- Kanhai RC, Hage JJ, Van Diest PJ, Bloemena E, Mulder, JW. Short-term and long-term histologic effects of castration and estrogen treatment on breast tissue of 14 male-to-female transsexuals in comparison with two chemically castrated men. *Am J Surg Pathol.* 2000;24(1):74-80.
- Anothaisintawee T, Wiratkapun C, Lerdsitthichai P, Kasamesup V, Wongwaisayawan S, Srinakarin J, et al. Risk factors of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Asia Pac J Public Health.* 2013;25(5):368-87.
- Thorbjarnardottir T, Olafsdottir EJ, Valdimarsdottir UA, Olafsson O, Tryggvadottir L. Oral contraceptives, hormone replacement therapy and breast cancer risk: a cohort study of 16 928 women 48 years and older. *Acta Oncol.* 2014;53(6):752-8.
- Chlebowski RT, Hendrix SL, Langer RD, Stefanick ML, Gass M, Lane D, Rodabough RJ, Gilligan MA, Cyr MG, Thomson CA, Khandekar J, Petrovitch H, McTiernan A; WHI Investigators.. Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative randomized trial. *JAMA.* 2003;289(24):3243-53.
- Simpson E, Rubin G, Clyne C, Robertson K, O'Donnell L, Jones M, et al. The role of local estrogen biosynthesis in males and females. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11:184-8.
- Somboonporn W, Davis SR. Testosterone Effects on the Breast: Implications for Testosterone Therapy for Women. *Endocr Rev.* 2004;25(3):374-88.
- Zhou J, NG S, Adesanya-Famuiya O, Anderson K, Bondy CA. Testosterone inhibits estrogen-induced mammary epithelial proliferation and suppresses estrogen receptor expression. *FASEB J.* 2000;14:1725-30.
- Dimitrakakis C, Zhou J, Bondy CA. Androgens and mammary growth and neoplasia. *Fertil Steril.* 2002;77:S26-33.
- Bruno S, Darzynkiewicz Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif.* 1992;25:31-40.
- Marinheiro LPF, Graudenz M, Recktenvald M, Meirelles RMR, Caleffi M. Expressão dos fatores de proliferação celular PCNA e Ki-67 e receptores de estrogênio e progesterona em tecido mamário normal de mulheres na pós-menopausa submetidas a dois esquemas de terapia de reposição hormonal. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2003;47(1):37-48.
- Goodson WH 3rd, Moore DH, Ljung BM, Chew K, Florendo C, Mayall B, et al. The functional relationship between in vivo bromodeoxyuridine labeling index and Ki-67 proliferation index in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1998;49:155-64.
- Burgess HE, Shousha S. An immunohistochemical study of the long-term effects of androgen administration on female-to-male transsexual breast: a comparison with normal female breast and male breast showing gynaecomastia. *J Pathol.* 1993;170(1):37-43.
- Burcombe RJ, Makris A, Pittam M, Finer N. Breast cancer after bilateral subcutaneous mastectomy in a female-to-male transsexual. *Breast.* 2003;12:290-3.
- Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation Marker Ki-67 in Early Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23(28):7212-20.
- Gooren LJ. Management of female-to-male transgender persons: medical and surgical management, life expectancy. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2014;21(3):233-8.