

## L'EQUAZIONE DI GOMPERTZ E LA MATEMATICA DELLE NEOPLASIE

di Pierandrea Vergallo e Michela Zanatta

In questo articolo si è studiato il modello di Gompertz, già noto in letteratura, per l'analisi della crescita delle neoplasie solide nel tempo. Obiettivo primario degli autori è stato quello di descrivere la connessione tra il modello matematico (prettamente analitico) e l'esperienza medica presente in letteratura.

### COS'È UN TUMORE

Il tumore è una malattia genetica, dove per genetica non si intende ereditaria, bensì causata da un'alterazione dei geni. Infatti, il DNA delle cellule tumorali contiene geni normalmente espressi in tutte le cellule, ma che vengono o attivati impropriamente (*oncogeni*) o disattivati (*oncosoppressori*), causando un aumento incontrollato della proliferazione cellulare.

Gli oncosoppressori normalmente inibiscono la trasformazione neoplastica (cioè tumorale) inducendo nella cellula danneggiata un blocco del ciclo cellulare: se i meccanismi di riparazione del DNA sono in grado di rimediare al danno genico la cellula potrà continuare il suo ciclo, al contrario verrà indotta l'apoptosi (morte cellulare programmata). Nel momento in cui gli oncosoppressori vengono disattivati non avviene più il blocco del ciclo cellulare e la cellula, seppur danneggiata, giunge all'ultima fase del ciclo.

### IL TEMPO DI RADDOPPIO E LA CRESCITA ESPONENZIALE

Nell'ultima fase del ciclo cellulare avviene la divisione mitotica da cui originano due cellule identiche (dunque danneggiate), le quali a loro volta daranno origine a quattro cellule mutate, e così via.

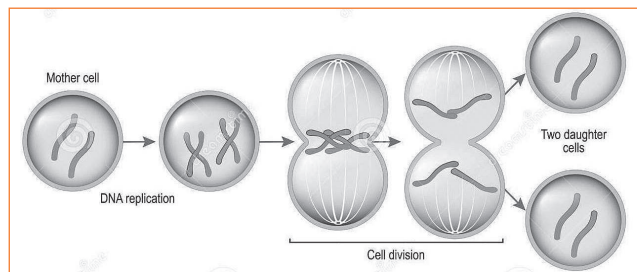


Figura 1 - Processo di mitosi

Questo meccanismo viene identificato come «tempo di raddoppio» (DT) ed è uguale per ogni tumore: affinché dalla singola cellula neoplastica si sviluppi un tumore di dimensioni di 1 cm sono necessari 30 tempi di raddoppio. Il DT esprime un modello di crescita tumorale che tiene conto esclusivamente della duplicazione delle cellule durante il ciclo cellulare: si tratta dunque di un modello di crescita esponenziale.

L'equazione che descrive il modello di crescita tipicamente esponenziale è la seguente:

$$V'(t) = aV(t) \quad (1)$$

dove si è scelto di indicare con  $V(t)$  il volume ( $V$ ) del tumore nel tempo ( $t$ ). La risoluzione dell'equazione precedente tramite il metodo delle variabili separabili conduce ad una soluzione del tipo:

$$V(t) = V_0 e^{at} \quad (2)$$

dove  $V_0$  è il volume che il corpo in analisi possedeva al momento della rilevazione nel tempo  $t = t_0$  che fissiamo come iniziale. Un piccolo appunto dimensionale: è evidente che per il volume  $V(t)$  vale  $[V(t)] = [V_0] = L^3$ , analogamente la variabile  $t$  rappresenta il tempo e pertanto  $[t] = T$ ; meno diretto è che la costante di crescita  $a$  debba soddisfare  $[a] = \frac{1}{T}$ . La formula risulta quindi dimensionalmente coerente nei suoi due membri.

Come è chiaramente visibile dal grafico la soluzione cresce molto velocemente nel tempo, senza alcun limite, infatti per  $t \rightarrow +\infty$  la funzione  $V(t) \rightarrow +\infty$ . Se così fosse i tempi di crescita delle cellule tumorali sarebbero rapidissimi e lo sdoppiamento delle cellule avverrebbe in maniera quasi incontrollabile. Tecnicamente, in effetti, la funzione esponenziale rappresenta (tra quelle elementari) la più rapida nella crescita all'infinito.

### TASSO DI CRESCITA SPECIFICO

Resta da chiarire in questo primo modello di crescita il significato medico del parametro  $a$ . Tale parametro è anche chiamato *SGR* dall'inglese Specific Growth Rate (o tasso di crescita specifico). Esso si differenzia a seconda della tipologia di neoplasia in analisi e influisce direttamente sulla crescita della massa tumorale nel tempo. Verosimilmente, una neoplasia con SGR maggiore crescerà nel tempo più rapidamente di una con SGR minore.

Consideriamo, ora, la soluzione dell'equazione 1 per  $t = t_1$  e  $t = t_2$ :

$$V(t_1) = V_0 e^{at_1} \quad V(t_2) = V_0 e^{at_2}$$

effettuando, quindi, il rapporto fra le due si ottiene la seguente relazione

$$V(t_2) = V(t_1)e^{a(t_2-t_1)} \quad (3)$$

cioè

$$\frac{V(t_2)}{V(t_1)} = e^{a(t_2-t_1)} \Rightarrow a(t_2-t_1) = \log \frac{V(t_2)}{V(t_1)}$$

da cui

$$a = \frac{1}{(t_2-t_1)} \log \left( \frac{V(t_2)}{V(t_1)} \right) \quad (4)$$

Considerando, infine, il fenomeno dello sdoppiamento mitotico  $V(t_2) = 2V(t_1)$  si ottiene la relazione

$$a = \frac{1}{(t_2-t_1)} \log 2 \quad (5)$$

Ma è noto che il tempo di sdoppiamento tipico di una specifica neoplasia è dato da  $DT$  e quindi  $DT = t_2 - t_1$ . Ne segue la relazione fondamentale<sup>[3]</sup>

$$a = \frac{\log 2}{DT}$$

Possiamo concludere direttamente che per tempi di sdoppiamento maggiori si ha un tasso di crescita minore (sono evidentemente inversamente proporzionali). Si noti che, inoltre, dall'equazione 5 consegue che  $a$  ha dimensione  $[a] = 1/[T]$  come affermato in precedenza.

In letteratura sono presenti alcune tabulazioni dei valori che assume  $DT$  in funzione della tipologia di cellule tumorali. Ne presentiamo di seguito una per mera curiosità del lettore (<sup>1</sup>).

**Table 1.** Growth rate of different types of tumors observed in clinical evaluations

Study	Tumor	Measurement time interval (d)	DT range (d)	No. tumors	Reference
1	Pancreatic carcinoma	Not published	18-232	12	Nishida et al. (28)
2	Pancreatic carcinoma	99-751	64-255	9	Furukawa et al. (3)
3	Adenocarcinoma (lung)	159-396	72-131	8	Wang et al. (9)
4	Adenocarcinoma (lung)	25-1,212	(-1,350)-964	15	Winer-Muram et al. (30)
5	Bronchioalveolar (lung)	39-973	36-1,092	9	Winer-Muram et al. (30)
6	Squamous cell lung carcinoma	43-536	(-1,214)-225	16	Winer-Muram et al. (30)
7	Non-small cell lung carcinoma	82-948	48-698	6	Winer-Muram et al. (30)
8	Non-small cell lung cancer	16-99	8-171	18	Sharouni et al. (2)
9	Small cell lung cancer	299-386	54-132	4	Wang et al. (9)
10	Sarcoma (lung metastases)	14-819	7-1,172	21	Blomqvist et al. (21)
11	Hepatocellular carcinoma (W)	43-252	38-274	19	Nakajima et al. (27)
12	Hepatocellular carcinoma (W)	63-763	76-720	15	Saito et al. (29)
13	Hepatocellular carcinoma (M)	13-224	17-91	9	Nakajima et al. (27)
14	Hepatocellular carcinoma (M)	91-210	94-380	6	Saito et al. (29)
15	Hepatocellular carcinoma (P)	20-182	20-78	6	Nakajima et al. (27)

Abbreviations: W, well differentiated; M, moderately differentiated; P, poorly differentiated.

**Figura 2** - Tasso di crescita di differenti tipi di tumori osservati nelle valutazioni cliniche

(<sup>1</sup>) E. MEHRAR, E. FORSELL-ARONSSON, H. AHLMAN, P. BERNHARDT, *Specific growth rate versus Doubling Time for Quantitative Characterization of Tumor Growth rate*, «Cancer Res», 2007, 67: (8), April 15.

## IL MODELLO DI GOMPertz

Nella velocità di crescita di un tumore è però necessario tenere conto anche di altri parametri:

- La quota di cellule attivamente proliferanti (in un dato momento una certa quota di cellule sarà in stato di quiescenza, mentre un'altra parte sarà attiva e in grado di generare nuove cellule);
- La perdita cellulare (decelerazione della crescita).

Il modello di crescita sarà pertanto non esponenziale e può essere presentato un modello più realistico utilizzando la cosiddetta «equazione di Gompertz».

La crescita Gompertziana è descritta dall'equazione differenziale

$$V'(t) = aV(t) - bV(t) \log(kV(t))$$

in cui la variabile  $V(t)$  rappresenta ancora una volta il volume del tumore al tempo  $t > 0$ ,  $a$  e  $b$  <sup>(2)</sup> sono parametri positivi che rappresentano rispettivamente il tasso di crescita intrinseco del tumore, correlato al tasso mitotico cellulare, e il fattore di rallentamento della crescita, riguardante i processi antiangiogenici, mentre  $k$  è un fattore per cui  $[k] = \frac{1}{L^3}$  che rende l'equazione dimensionalmente coerente.

## RALLENTAMENTO DELLA CRESCITA

Nel modello appena introdotto il significato del parametro  $a > 0$  resta invariato rispetto a quanto descritto nei paragrafi precedenti. Il nuovo parametro  $b > 0$  rappresenta, invece, il rallentamento della crescita cellulare, quindi il numero di cellule andate in necrosi a causa della mancata vascolarizzazione.

Un tumore, infatti, come qualsiasi tessuto, ha bisogno dell'irrorazione da parte dei vasi sanguigni per ottenere ossigeno e nutrienti indispensabili per la sua funzionalità. Questa irrorazione, essendo il tumore una neoformazione (quindi non presente originariamente nell'organismo), non può essere assicurata dai vasi che fisiologicamente irrorano tutti i tessuti presenti dalla nascita e ha bisogno dunque di nuovi vasi.

Il processo di crescita di nuovi vasi, parallelo alla crescita tumorale e indispensabile per la sopravvivenza del tumore, si chiama *neoangiogenesi* e consiste nello sviluppo di piccoli vasi sanguigni a partire da una rete vascolare preformata. Senza questo processo ogni tumore, giunto alla grandezza di circa 1 cm, andrebbe inevitabilmente in necrosi a causa della mancanza di ossigeno e nutrienti. Grazie alla nuova rete vascolare, il tumore può crescere di dimensioni.

Una volta raggiunta una certa dimensione, però, l'apporto di ossigeno e nutrienti non sarà più sufficiente per tutta la massa: le cellule nella parte centrale, più dif-

<sup>(2)</sup> Come il coefficiente  $a$ , anche  $b$  ha la stessa «dimensione», infatti  $[b] = 1/[T]$ .

facilmente raggiungibili dai vasi, andranno incontro a necrosi. Si assisterà dunque ad una riduzione delle cellule tumorali.

## RISOLUZIONE DELL'EQUAZIONE DI GOMPERTZ

Riprendiamo, ora, l'equazione del nostro modello di sviluppo di una neoplasia. L'equazione di Gompertz<sup>(3)</sup>

$$V'(t) = aV(t) - bV(t) \log(V(t))$$

si presta alla risoluzione tramite il metodo delle variabili separabili:

$$\frac{V'(t)}{aV(t) - bV(t) \log(V(t))} = 1$$

e integrando tra i tempi  $t_0$  e  $t$

$$\int_{V(t_0)}^{V(t)} \frac{dV}{V(a - b \cdot \log(V))} = \int_{t_0}^t dt$$

da cui si ottiene applicando la sostituzione  $z := \log(V)$  e quindi  $dz = \frac{1}{V}$ :

$$\int_{\log(V(t_0))}^{\log(V(t))} \frac{dz}{(a - bz)} = t - t_0$$

con  $c$  una costante reale. Infine, osservando che:

$$\int_{\log(V(t_0))}^{\log(V(t))} \frac{dz}{(a - bz)} = \frac{-1}{b} \int_{\log(V(t_0))}^{\log(V(t))} \frac{-bdz}{(a - bz)} = -\frac{1}{b} \log(a - bz) \Big|_{\log(V(t_0))}^{\log(V(t))}$$

Ricaviamo che

$$\log \left( \frac{a - b \log(V(t))}{a - b \log(V(t_0))} \right) = -b(t - t_0) \quad (6)$$

da cui

$$\log(V(t)) = \frac{1}{b} \left( a - (a - b \log(V(t_0))) e^{-b(t-t_0)} \right) \quad (7)$$

pertanto

$$V(t) = V(t_0) e^{-b(t-t_0)} e^{\frac{1}{b}(a - a e^{-b(t-t_0)})} \quad (8)$$

<sup>(3)</sup> Per semplicità nei calcoli e al fine di alleggerire la notazione si è scelto  $k = 1$ . Tuttavia lo stesso discorso vale per un valore di  $k$  arbitrario.

e quindi, ponendo  $K(t, t_0) := V(t_0)e^{-b(t-t_0)}$ , si ha la soluzione finale:

$$V(t) = K(t, t_0)e^{\frac{a}{b}(1-e^{-b(t-t_0)})} \quad (9)$$

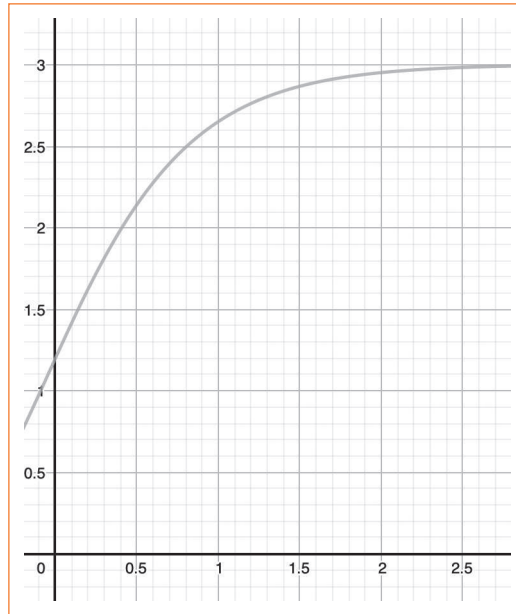


Figura 3 - Rappresentazione grafica di  $V(t)$  per  $a = 2.2$ ,  $b = 2$  e  $V(0) = 1.2$

Dal grafico si evincono due fasi distinte della crescita: una prima fase particolarmente rapida e simile ad un comportamento esponenziale ed una seconda quasi stazionaria.

### CONSIDERAZIONI SUI COEFFICIENTI

Data la soluzione generale 9 è possibile osservare che i parametri  $a$ ,  $b$ , da cui dipende,  $V(t)$  sono relativi alla tipologia di tumore ( $a$  tasso di crescita e  $b$  coefficiente di decrescita), come stimato in precedenza<sup>(4)</sup>.

Tuttavia, ancora più interessante è il «ruolo» svolto nella funzione  $V(t)$  dalla funzione  $K(t, t_0)$ :

$$K(t, t_0) := V(t_0)e^{-b(t-t_0)} \quad (10)$$

dove, ricordiamo,  $V(t_0)$  è proprio il volume iniziale al momento della prima rilevazione nel tempo  $t = t_0$ . Per tempi molto grandi vale il seguente limite:

<sup>(4)</sup> È necessario evidenziare che i grafici in questa sezione sono puramente esemplificativi e non pretendono di rappresentare in maniera fedele la crescita di una specifica neoplasia in un paziente.

$$t \rightarrow +\infty \quad K(t, t_0) \rightarrow 1 \quad (11)$$

e quindi

$$t \rightarrow +\infty \quad V(t) \rightarrow e^{\frac{a}{b}}. \quad (12)$$

In termini biologici questo è essenzialmente un bene. In effetti, un comportamento asintotico di questo tipo garantisce un limite superiore di sviluppo della massa tumorale. Sfortunatamente, anche dall'espressione analitica della funzione  $V(t)$  è chiaro che il limite asintotico può essere più o meno grande a seconda del fattore di crescita e di rallentamento, ma non del volume iniziale  $V(t_0)$ . Coerentemente con il modello descritto e con i principali teoremi sui dati iniziali di una ode (oltre che con l'umana logica), il limite asintotico della funzione  $V(t)$  non dipende da  $t_0$ . In effetti, ha senso che la crescita della massa tumorale nel tempo dipenda da caratteristiche intrinseche della neoplasia e non dalla prima rilevazione dello stesso.

Notiamo, inoltre, che

- 1 A parità di dato iniziale, facendo variare il coefficiente  $a$  di crescita e fissati  $b$  e  $V(t_0)$ , si ottengono soluzioni differenti anche in valore asintotico:

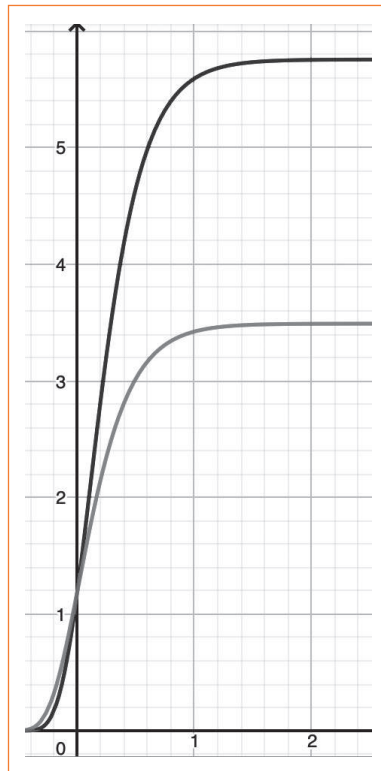


Figura 4 - Rappresentazione grafica delle soluzioni per  $a = 7$  (in nero) e  $a = 5$  (in grigio),  $b = 4$ ,  $V(0) = 1.2$

Si noti che per valori di  $a$  maggiori si ottengono crescite più rapide nella fase iniziale, in maniera coerente con quanto descritto nei paragrafi precedenti;

- 2 A parità di dato iniziale, ancora, facendo variare il coefficiente  $b$  e fissando  $a$  si ottengono soluzioni di questo tipo:

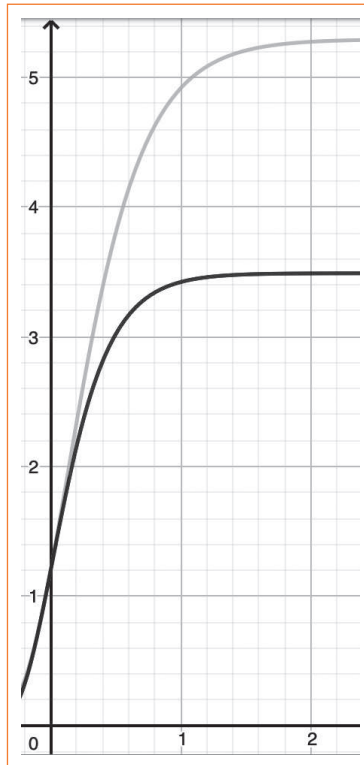


Figura 5 - Rappresentazione grafica delle soluzioni per  $a = 5$ ,  $V(0) = 1.2$ ,  $b = 3$  (grigio chiaro) e  $b = 4$  (nero)

Dunque per valori più piccoli di  $b$  si ottengono soluzioni che crescono maggiormente.

## LA CHEMIOTERAPIA

La chemioterapia consiste nell'impiego di farmaci – detti anche «citotossici» in quanto provocano la morte cellulare – capaci di raggiungere, attraverso il circolo sanguigno, le cellule tumorali in ogni parte dell'organismo. Sono farmaci diretti esclusivamente contro le cellule in attiva proliferazione: la neoplasia però, come detto precedentemente, sarà composta in parte da cellule attivamente proliferanti, ma in parte anche da cellule quiescenti e da cellule *necrotiche* (morte), su cui i farmaci non hanno alcun potere.



Il motivo per cui questi farmaci agiscono soltanto sulle cellule in attiva proliferazione è che il loro meccanismo d'azione è diretto contro le fasi attive del ciclo cellulare (fase G2/M).

La riuscita del trattamento chemioterapico sarà dunque migliore nei tumori con una frazione di crescita cellulare maggiore, costituiti cioè da una quota maggiore di cellule in fase proliferativa, quindi più aggressivi. Essenzialmente possiamo affermare che, agendo direttamente su cellule proliferanti, il modello matematico sul quale attecchirebbero maggiormente è sicuramente quello esponenziale descritto nel primo paragrafo. Paradossalmente, in questo caso, la crescita incondizionata della neoplasia si presenterebbe come un vantaggio nell'utilizzo di farmaci chemioterapici.

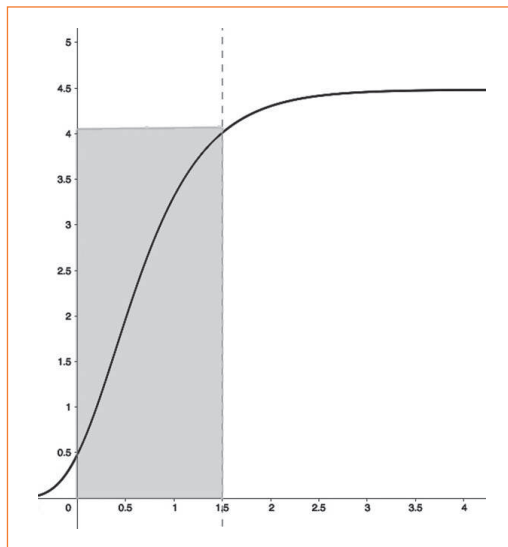


Figura 6 - In grigio è evidenziata la fase esponenziale del modello di Gompertz. In tale fase i farmaci chemioterapici risultano più efficaci

I farmaci citotossici agiscono secondo un modello definito «log kill» (distruzione cellulare su scala logaritmica): indipendentemente dal volume iniziale, ad ogni ciclo di farmaco viene eliminata una percentuale costante di cellule. Questo è il motivo per il quale non è sufficiente un singolo ciclo di chemioterapia per eradicare completamente il tumore, ma la terapia sarà costituita da diversi cicli (Figura 7).

Inoltre, è stato dimostrato che per molti farmaci i log kill crescono all'aumentare della dose: saranno quindi necessarie dosi maggiori di farmaco per eradicare neoplasie di grandi dimensioni. Bisogna però considerare che ogni farmaco citotossico agisce contro specifici geni: si è visto che all'interno della stessa massa neoplastica esistono cellule che esprimono alcuni geni e cellule che esprimono geni totalmente diversi, pertanto è necessaria la combinazione di diversi farmaci al fine di ottenere una maggiore probabilità di successo. La combinazione di due o più

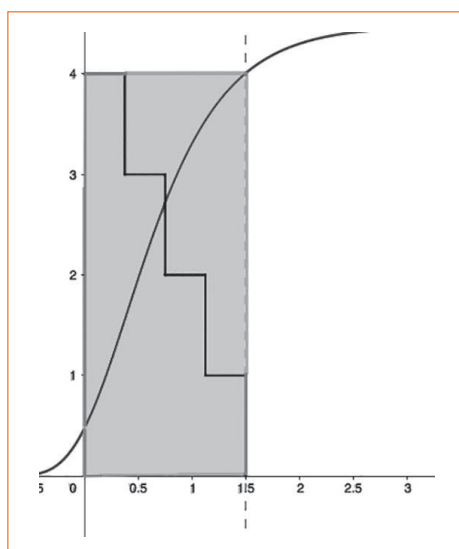


Figura 7 - In nero sono rappresentate le quantità costanti (in percentuale) di cellule responsive al farmaco (cioè distrutte dallo stesso)

farmaci determinerà, in aggiunta, la somma dei loro singoli «log kill» (chemioterapia combinata).

Purtroppo, questi farmaci non agiscono selettivamente sulle cellule tumorali, bensì sono diretti contro tutte le cellule attivamente proliferanti: in particolar modo ne risentiranno i globuli bianchi determinando una immunosoppressione, quindi minor capacità dell'organismo di rispondere agli insulti esterni. Per questo motivo non è possibile effettuare un unico lungo ciclo di chemioterapia, ma si devono fare più cicli a distanza di tempo in modo da permettere alle cellule del sangue di rigenerarsi.

## IPOTESI DI NORTON E SIMON

*«La terapia si traduce in un tasso di regressione volumetrica del tumore che è proporzionale al tasso di crescita che sarebbe previsto per un tumore imperturbato di quelle dimensioni»<sup>(5)</sup>*

I tumori più piccoli, crescendo in maniera più rapida rispetto ai tumori di dimensioni maggiori con la stessa cinetica cellulare, avranno maggior beneficio dalla chemioterapia («log kill» maggiore). Tuttavia, anche la rigenerazione delle cellule neoplastiche negli intervalli tra i cicli di chemioterapia sarà maggiore nei tumori di

(5) LARRY NORTON, *Conceptual and Practical Implications of Breast Tissue Geometry: Toward a More Effective, Less Toxic Therapy*, The Oncologist, 2005.

dimensioni minori, perciò l'*outcome* (risultato) finale sarà lo stesso rispetto ai tumori più grandi ma con un tasso di proliferazione cellulare minore.

Sulla base di questo principio, Larry Norton e Richard Simon formulano la loro ipotesi, rivoluzionando il concetto di chemioterapia basata sul modello «log kill», prendendo invece in considerazione il modello matematico di crescita di Gompertz. Secondo questa ipotesi, la chemioterapia può essere resa più efficace incrementando l'intensità di dose (cioè la quantità di farmaco somministrata per m<sup>2</sup> di superficie corporea nell'unità di tempo) in due modi: o somministrando dosi più elevate o minimizzando l'intervallo tra i cicli terapeutici e quindi la ricrescita tumorale.

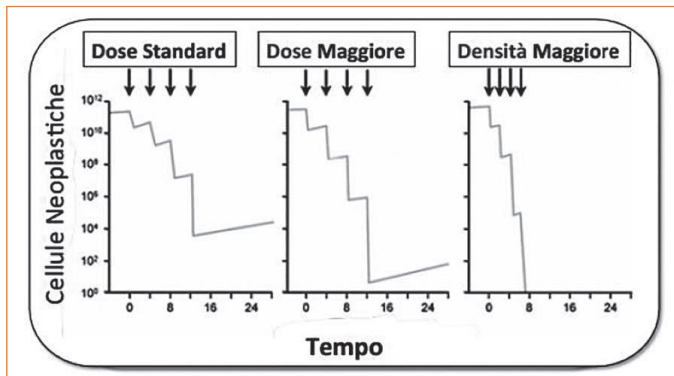


Figura 8 - Grafici della risposta cellulare alla somministrazione dei farmaci chemioterapici

Nei grafici di cui sopra (puramente esemplificativi e non relativi ad alcun dato specifico) sono rappresentati: nelle ascisse il tempo di somministrazione del farmaco e nelle ordinate le cellule neoplastiche espresse in termini esponenziali.

Possiamo notare che nel primo grafico (somministrazione della dose standard di chemioterapico) abbiamo una riduzione delle cellule neoplastiche esponenziale ad ogni dose, fino ad arrivare alla ripresa della malattia a causa della mancata eradicazione di tutte le cellule (talvolta dovuta all'instaurarsi di meccanismi di resistenza).

Nel secondo grafico (somministrazione di dose maggiore), si ha una riduzione cellulare più rapida fino ad arrivare alla quasi scomparsa della malattia, che però tenderà a ripresentarsi; la mortalità rimane invariata rispetto al primo.

Nel terzo grafico è analizzato il caso della somministrazione a densità maggiore, come proposto da Norton e Simon. In questo caso si assiste alla completa remissione della malattia in tempo breve.

È stato studiato<sup>[4]</sup> che, se aumentiamo la quantità di farmaco, la sopravvivenza dei pazienti non cambia rispetto allo schema classico, aumenta solo la tossicità. Se invece aumentiamo la densità di dose, cioè la frequenza di somministrazione, associando la contemporanea somministrazione di fattori di crescita (che diminuiscono

la tossicità determinando una più rapida ripresa delle cellule del sangue – globuli bianchi, rossi e piastrine), la sopravvivenza a 4 anni è superiore di circa il 10%.

## CONCLUSIONI

Come risulta chiaro da quanto evidenziato nell'articolo, il modello di Gompertz si presenta come un modello di crescita particolarmente descrittivo del fenomeno biologico di sviluppo neoplastico. Attualmente tramite metodi e tecniche differenti da quelle descritte dagli autori, la ricerca continua a dedicarsi a questo delicato argomento. Tuttavia, pur superando nel dettaglio il modello di Gompertz, esso è ancora ritenuto un utile strumento nella ricerca farmacologica al fine di arrestare la progressione di questo male, un tempo ritenuto incurabile.

### Pierandrea Vergallo

PhD student in Matematica e Informatica  
pierandrea.vergallo@libero.it

### Michela Zanatta

Medico chirurgo, MD  
michela.zanatt25@gmail.com

### Ringraziamenti

Un ringraziamento doveroso va al Prof. P. Vigneri dell'Università degli Studi di Catania per averci fornito il grafico relativo alla somministrazione dei farmaci chemioterapici (**Figura 8**) e al collega e amico Marco Menale dell'Università degli Studi della Campania «Luigi Vanvitelli» per i preziosi consigli e la attenta revisione.

Dedichiamo questo lavoro a Nadia, Ennio, Gina, Lucia e a Marco, grande guerriero.

### Bibliografia

- [1] BRAUN, M., *Differential equations and Their Applications: An Introduction to Applied Mathematics*, IV Edizione, Springer, 1992.
- [2] KUANG, Y. – NAGY, J. D. – EIKENBERRY, S. E., *Introduction to Mathematical Oncology*, Chapman and Hall/CRC, February 18, 2016.
- [3] MEHRARA, E. – FORSELL-ARONSSON, E. – AHLMAN, H. – BERNHARDT, P., *Specific Growth Rate versus Doubling Time for Quantitative Characterization of Tumor Growth Rate*, Cancer Research 2007.
- [4] NORTON, L., *Conceptual and Practical Implications of Breast Tissue Geometry: Toward a More Effective, Less Toxic Therapy*, «The Oncologist» 2005.
- [5] LABIANCA, R. – CASCINU, S., *La Medicina Oncologica*, Edra, 2013.