

Utilização de plasma rico em plaquetas de coelhos com poucos leucócitos e hemácias para a consolidação de ossos

[Use of plasma rich in platelets of rabbits with few leukocytes and erythrocytes to consolidate bones]

M.G.M.G. Andrade¹, G.M. Rodrigues², D.P. Lima³, L.M. Faria⁴, L.V.P. Silva¹,
R.R. Souza⁴, D. Eurides⁵

¹Aluno de pós-graduação – Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia, MG

²Aluno de graduação – Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia, MG

³Médico Veterinário Autônomo

⁴Residente – Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia, MG

⁵Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia, MG

RESUMO

Objetivou-se utilizar o plasma rico em plaquetas, obtido por técnica capaz de produzir um produto autólogo, com reduzido número de leucócitos e hemácias, e avaliar, por meio de radiografias, a capacidade de cicatrização de uma falha óssea induzida no rádio de coelhos. Foram coletados 10,5mL de sangue por via intracardiaca, o qual foi distribuído em três tubos de hemossedimentação contendo citrato de sódio. Os tubos contendo as amostras foram submetidos a uma centrifugação a 2.000rpm (670,8G) por 20 minutos, e da coluna de sedimentação foram aspirados de cada tubo 1.000µL de plasma para a redução do volume sobrenadante. Aspirou-se o plasma acima do anel de leucócitos e transferiu-se para outro tubo para centrifugação a 2.000rpm por 10 minutos. O conteúdo plaquetário no fundo do tubo foi ressuspenso e homogeneizado a 1.000µL do plasma sobrenadante para formar o PRP líquido. Uma falha de 1,0cm foi realizada no rádio esquerdo de cada coelho. O tempo de consolidação foi observado por meio de exame radiográfico aos 45 e 90 dias de pós-operatório (PO). As imagens foram comparadas entre o grupo controle (G1) e o grupo que recebeu o implante de PRP por via transdérmica (G2). A evolução da cicatrização foi verificada com auxílio do programa Adobe Photoshop CC e em uma escala de cinza que representa o contraste. No G2 foi verificada média de 63% de contraste aos 45 dias de PO e de 65% aos 90 dias de PO. No G1, aos 45 dias de PO, a média encontrada foi de 42,7%, e aos 90 dias de PO, 31,25%, indicando que houve evolução do processo de reparação óssea em comparação ao grupo que não recebeu o implante de PRP. O método de obtenção de plasma rico em plaqueta autólogo de coelhos reduziu o número de leucócitos e hemácias e recuperou o número de plaquetas, sendo este maior ou igual aos valores fisiológicos para a espécie. O PRP obtido foi capaz de acelerar o processo de consolidação óssea em coelhos.

Palavras-chave: biomateriais, osso, *Oryctolagus cuniculus*

ABSTRACT

The aim of this study was to use the platelet-rich plasma obtained by a technique capable of producing an autologous product, with a reduced number of white blood cells and red blood cells and assessed by radiographs, the healing ability of a bone defect induced in the radio rabbits. 10.5mL of blood was collected via intracardiac blood sedimentation and distributed into three tubes containing sodium citrate. The tubes containing the samples were subjected to centrifugation at 2,000 rpm (670.8G) for 20 minutes and the sediment column were aspirated from each plasma tube 1,000µL to reduce the supernatant volume. The plasma was aspirated from above the leukocytes ring and transferred to another tube for centrifugation at 2,000 rpm for 10 minutes. The platelet content in the tube bottom was resuspended and

Recebido em 24 de março de 2015

Aceito em 15 de novembro de 2015

E-mail: vetmarina@yahoo.com.br

homogenized to 1,000 μ L plasma supernatant PRP to form the liquid. A1.0 cm failure was performed on the left radio of each rabbit. The healing time was observed by means of radiographic examination at 45 and 90 days after surgery. The images were compared between the control group (G1) and the group receiving PRP implant transdermally (G2). The healing progress was assessed with the help of Adobe Photoshop program and a gray scale that represents the contrast. G2 had an average of 63% contrast at 45 days PO and 65% at 90 days PO. In G2, at 45 days PO the average was 42.7% and at 90 days PO 31.25% indicating that there was an increase in bone repair process compared to the group that did not receive the PRP implant. The method of obtaining an autologous platelet rich plasma of rabbits reduced the number of leukocytes and erythrocytes and platelets recovered which is greater than or equal to the physiological range for the species. The obtained PRP was able to accelerate the process of bone healing in rabbits.

Keywords: biomaterials, bone, *Oryctolagus cuniculus*

INTRODUÇÃO

O plasma rico em plaquetas (PRP) é uma alternativa de biomaterial, rico em plaquetas e consequentemente em fatores de crescimento plaquetário (FCP), que, quando aplicado diretamente sobre o foco da fratura, além de acelerar o processo de cicatrização, promove a orientação e a adesão de células-tronco mesenquimais responsáveis pelo processo de consolidação e reparação tecidual (Maia *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*, 2009; Carmona *et al.*, 2007; Yamada *et al.*, 2012).

Além das organelas, as plaquetas possuem os α -grânulos, que possuem os fatores de coagulação, os fatores de crescimento plaquetário (FCP) e outras proteínas que participam do processo de reparação tecidual (Matthews e Martin, 1974; Everts *et al.*, 2006a; Everts *et al.*, 2006b). Os FCP promovem o recrutamento de células mielóides, linfocitárias, leucócitos, novas plaquetas, ativam a cascata inflamatória por meio do tromboxano A₂ e aumentam a concentração de plaquetas no local do trauma. (Matthews e Martin, 1974; Everts *et al.*, 2006a; Flad e Brandt, 2010; Boswell *et al.*, 2012).

Conforme a técnica de obtenção do PRP utilizada, as preparações podem apresentar maior ou menor concentração de plaquetas, mas também concentrações variadas de leucócitos, hemácias e FCP, o que interfere diretamente sobre o processo de reparação tecidual (Malhotra *et al.*, 2013). As pesquisas são ainda contraditórias e indicam que as concentrações de plaquetas podem influenciar no processo de consolidação de fraturas assim como na interferência de outros fatores e componentes do PRP (Weibrich *et al.*, 2004).

Objetivou-se utilizar o plasma rico em plaquetas, obtido por técnica capaz de produzir um produto autólogo, com reduzido número de leucócitos e hemácias, e avaliar, por meio de radiografias, a capacidade de cicatrização de uma falha óssea induzida no rádio de coelhos.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia, em análise final nº 004/13, registro CEUA/UFU nº 77/12. Foram utilizados 18 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) adultos, machos e fêmeas, da raça Nova Zelândia branca, com peso entre 3,0 e 4,5kg.

Os animais foram submetidos à associação anestésica de cloridrato de cetamina (Quetamina, Vetnil, Louveira, São Paulo, Brasil) (35mg/kg, IM) e xilazina (Calmium, Agener União, Guaçu, São Paulo, Brasil) (10mg/kg, IM) para a coleta de sangue necessário à preparação do PRP e a realização de procedimento cirúrgico para ressecção de uma falha óssea no rádio esquerdo dos animais. Para a coleta de sangue, foi realizada a punção intracardiaca entre o quinto e o sexto espaço intercostal esquerdo para a obtenção de 10,5mL de sangue de cada animal. Utilizou-se uma agulha 21G (0,8 x 25 mm) (Agulha S-Monovette, Sarstedt Brasil, Santana do Parnaíba, São Paulo, Brasil) e três tubos para hemossedimentação de polipropileno (130 x 8,0mm) (Tubo ESR S-Sedivette Sarstedt Brasil, Santana do Parnaíba, São Paulo, Brasil) contendo 0,7mL de citrato de sódio 0,106 molar (Fig. 1A). O volume total de sangue (10,5mL) foi distribuído em igual volume entre os três tubos de hemossedimentação com capacidade de 3,5mL. Após a coleta, foram realizadas

contagens do número total de hemácias, leucócitos e plaquetas em analisador hematológico automático veterinário (Aparelho automático de hematologia veterinária pocH-100 iV Diff®, Roche, São Paulo, SP, Brasil).

Os tubos foram submetidos à primeira centrifugação (Centrífuga Excelsa Baby, modelo 208N, raio (r) = 15cm, Fanem, Guarulhos, São Paulo, Brasil) a 2.000rpm (670,8G), por 20 minutos. Foram aspirados de cada tubo 1.000µL da camada de plasma para a redução do volume sobrenadante. Em seguida, foi aspirado, com pipeta de Pasteur, todo o plasma acima do anel

de leucócitos formado, o qual foi transferido para um tubo simples de polipropileno sem anticoagulante. Após outra centrifugação a 2.000rpm (670,8G) por 10 minutos, o sobrenadante de plasma foi aspirado e reduzido até uma marca de 1.000µL no tubo. O conteúdo plaquetário formado no fundo do tubo deu origem ao PRP (Fig. 1C). A contagem do número total de plaquetas, leucócitos e hemácias no PRP obtido foi realizada em seguida, no mesmo analisador hematológico automático veterinário (Aparelho automático de hematologia veterinária pocH-100 iV Diff®, Roche, São Paulo, SP, Brasil).

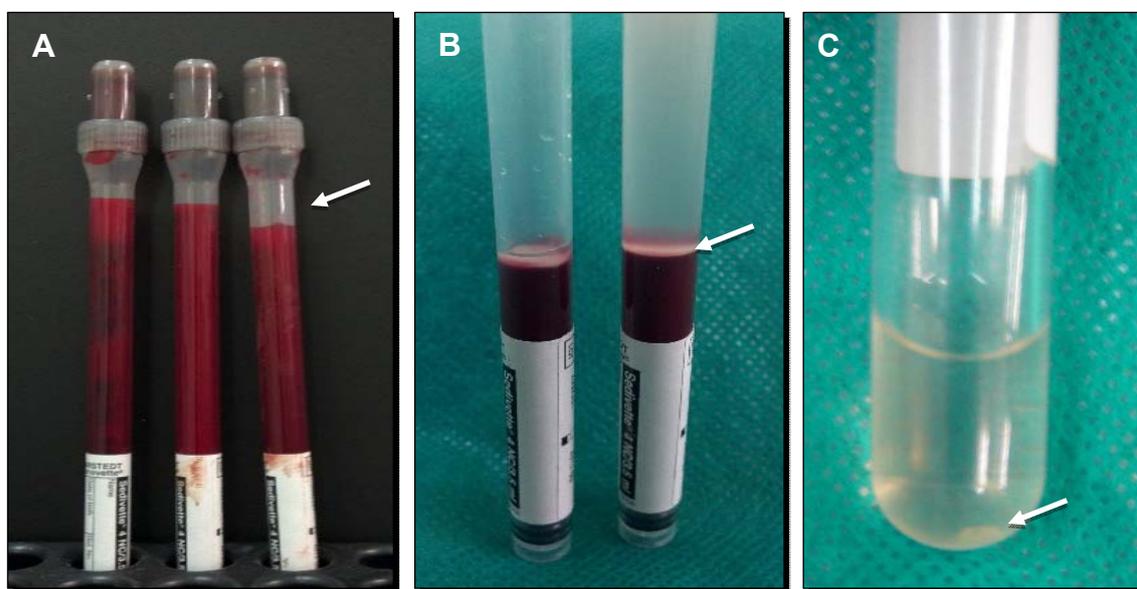


Figura 1. Três tubos com amostras de sangue de coelho da raça Nova Zelândia e o local da remoção de uma alíquota de sangue (A - seta) para hemograma. Observar, após a primeira centrifugação a 2.000rpm durante 20 minutos, a formação de uma coluna alta de sedimentação de células formada pelo plasma sobrenadante, anel leucocitário (B - seta) e hemácias sedimentadas. Conteúdo plaquetário depois da segunda centrifugação a 2.000rpm durante 10 minutos (C - seta).

Ainda sob efeito do protocolo anestésico, após uma equipe encerrar a coleta de sangue para a preparação do PRP, outra equipe se encarregou de realizar o procedimento cirúrgico para a ressecção de um segmento de 1,0cm de comprimento, deixando aberta uma falha óssea no rádio esquerdo de cada animal, onde, em seguida, foi inoculado o PRP obtido.

Os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos. No grupo I, controle (G1, n=6), a falha óssea foi deixada sem preenchimento e, no grupo II (G2, n=20), após a sutura da pele, o PRP

foi administrado por via transdérmica sobre a falha óssea, com seringa de 1,0mL. Foram realizadas radiografias com zero, 45 e 90 dias de pós-operatório (PO). As alterações radiográficas foram avaliadas de acordo com as seguintes observações: “-”: ausência completa de cicatrização (ausência de preenchimento da falha óssea); “+/-”: neoformação óssea irregular e sinais indefinidos de cicatrização (preenchimento parcial da falha óssea); e “+”: cicatrização completa/remodelação (preenchimento total da falha óssea).

O programa de imagem Adobe Photoshop CC foi utilizado para converter as imagens radiográficas em preto e branco. Uma escala de cinza foi adotada para a comparação da radiopacidade das falhas óssea aos 45 e 90 dias de PO e dividida de 0% a 100% conforme a máxima radiolucência (0%) ou máxima radiopacidade (100%) óssea.

Utilizou-se o teste t pareado para variáveis com normalidade ou o teste de Wilcoxon pareado quando não observada a distribuição normal. O teste de normalidade aplicado foi o de Anderson-Darling (AD) com significância de 5% (Triola, 1999; Ayres *et al.*, 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização dos tubos de hemossedimentação possibilitou, após a centrifugação, a formação de uma coluna alta de sedimentação adequada à individualização das camadas de células formadas. Conforme Oliveira Filho *et al.* (2008), a concentração máxima de plaquetas se encontra entre 6,0 e 8,0mm abaixo da linha que divide as fases de plasma e hemácias sedimentadas. A formação da coluna alta de sedimentação permitiu a visualização e aspiração do plasma

contendo plaquetas acima do anel leucocitário formado, bem como a exclusão dos leucócitos do processo de obtenção do PRP.

No hemograma realizado, foram encontrados valores médios de 228.162,80 ($\pm 81.601,2168$) plaquetas/ μL . A técnica foi capaz de recuperar uma média de 370.483,9 ($\pm 154.894,9$) plaquetas/ μL no PRP (Tab. 1), que significa uma taxa de enriquecimento plaquetário de 61,58%, ou seja, um aumento de 1,62 vez a concentração total de plaquetas no PRP em relação ao sangue total. Esse valor de plaquetas encontrado é semelhante aos alcançados por Anitua *et al.* (2007) em humanos e Maia *et al.* (2009), Vendruscolo *et al.* (2012), Yamada *et al.* (2012) e Zandim *et al.* (2012) em equinos, apesar de haver relatos na literatura que estabelecem o mínimo de 1.000.000 plaquetas/ μL (Arreguy Silva *et al.*, 2009; Marx *et al.*, 1998; Marx, 2000) para que sejam obtidos resultados favoráveis na cicatrização óssea (Monteiro *et al.*, 2010; Vanat *et al.*, 2012). É necessário lembrar que o importante não é concentrar altos números delas, mas sim obter plaquetas íntegra e funcionalmente viáveis.

Tabela 1. Valores médios, mediana e desvio-padrão para os valores de plaquetas/ μL , leucócitos/ μL e hemácias $\times 10^6/\mu\text{L}$ de coelhos antes do processo de centrifugação e após a obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP)

	Média	Mediana	Desvio-padrão	P valor
Plaquetas sangue total	228.162,80	220.000,00	81.601,21a	0,000*
Plaquetas PRP	370.483,90	350.000,00	154.894,99b	
Leucócitos sangue total	6.083,95	6.100,00	2.092,27a	0,000*
Leucócitos PRP	658,60	200,00	1.233,64b	
Hemácias sangue total	4,76	4,83	0,51a	0,000*
Hemácias PRP	1,40	0,00	6,75b	

*Teste não paramétrico de Wilcoxon para dados pareados, $P < 0,05$.

Letras diferentes demonstram diferenças estatísticas entre as variáveis analisadas, dentro de um mesmo grupo.

A técnica foi adequada para produção de PRP com poucos leucócitos e hemácias (Tab. 1.), uma vez que foi capaz de eliminar 71% dos leucócitos e 89% de hemácias em relação à quantidade presente no sangue total. Identificar a composição do PRP é importante, pois outros elementos, como leucócitos e proteínas plasmáticas, podem interferir no processo de cicatrização tecidual (Boswell *et al.*, 2012; Wasterlain *et al.*, 2012). Os neutrófilos, por exemplo, expressam enzimas que degradam a matriz extracelular, aumentam a oxidação tecidual (Zandim *et al.*, 2012) e liberam citocinas

pró-inflamatórias responsáveis por aumentar o catabolismo e diminuir a síntese de matriz celular (Mccarrel e Fortier, 2009; Wasterlain *et al.*, 2012).

Aos 45 dias de PO, 11 (55%) coelhos apresentaram completo preenchimento da falha óssea e receberam escore "+". Esses animais, aos 90 dias de PO, apresentaram evolução no processo de consolidação, e foi observado o mesmo padrão de preenchimento, porém com aumento da radiopacidade na cortical do osso e evidência de formação do canal medular (Fig. 2C

e 2D). Resultados favoráveis se devem tanto à atividade das plaquetas, que são as primeiras células a chegarem ao sítio da lesão e liberam mediadores pró-inflamatórios responsáveis pelos processos de coagulação e hemostasia (Everts *et al.*, 2006a; Everts *et al.*, 2006b; Boswell *et al.*,

2012; Wasterlain *et al.*, 2012), quanto aos FCP, que promovem a proliferação e diferenciação celular, além do aumento da produção de tecido conjuntivo, do estímulo à angiogênese (Everts *et al.*, 2006a; Bosch *et al.*, 2010) e da organização tecidual em menor tempo (Sánchez *et al.*, 2009).



Figura 2. Ressecção de um fragmento ósseo de 1,0cm no terço médio do rádio esquerdo de coelhos. Imagem radiográfica de um dos animais do grupo controle. Notar ausência de preenchimento ósseo aos 45 (A) e 90 dias de pós-operatório (B). No grupo de animais que recebeu o implante de PRP, nota-se, aos 45 (C) e 90 (D) dias de PO, completo preenchimento da falha óssea. Aos 90 dias de PO (D), houve aumento da radiopacidade na cortical do osso e evidência de formação do canal medular.

Entre os animais avaliados, três (15%) receberam escore “+/-”, pois apresentaram preenchimento incompleto da falha óssea e mantiveram esse mesmo padrão aos 90 dias de PO. Cinco (25%) animais apresentaram ausência total de preenchimento da falha óssea e, também aos 90 dias, não apresentaram evolução no processo de consolidação. Nestes animais, de modo semelhante ao observado nos animais do grupo controle (G1) aos 45 e 90 dias de PO (Fig. 2A e 2B), notou-se a presença de material radiopaco e irregular somente nas extremidades dos cotos ósseos do rádio, indicando que o processo de cicatrização é iniciado nas extremidades em direção ao centro da falha óssea. Cabe aqui ressaltar que, nesses animais do G2, no momento da administração do PRP, houve extravasamento do conteúdo pela linha de sutura, uma vez que esse material encontra-se na sua forma líquida.

Dessa forma, sugere-se que o resultado negativo observado nestes animais se deveu não à composição do PRP, mas sim à perda significativa de material durante o procedimento.

A escala de cinza foi utilizada para comparação entre as imagens radiográficas de G1 e G2, a fim de se estabelecer o padrão e a velocidade de consolidação com e sem a utilização de um implante de PRP aos 45 e 90 dias de PO do G2 com o grupo controle. No G1, no centro da falha óssea, foi verificada média de 63% de contraste aos 45 dias de PO e de 65% aos 90 dias de PO. Nos animais do G2 aos 45 dias de PO, a média encontrada foi de 42,7%, e de 31,25% aos 90 dias de PO, indicando que houve evolução do processo de reparação óssea quando foi utilizado o PRP em comparação ao grupo controle.

CONCLUSÕES

O método de obtenção de plasma rico em plaqueta autólogo de coelhos reduziu o número de leucócitos e hemácias e recuperou o número de plaquetas, sendo este maior ou igual aos valores fisiológicos para a espécie. O PRP obtido foi capaz de acelerar o processo de consolidação óssea.

REFERÊNCIAS

- ANITUA, E.; ANDÍA, I.; SANCHEZ, M. *et al.* Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *Rev. Ciênc. Méd. Biol.*, v.6, p.204-213, 2007.
- ARREGUY SILVA, P.S.; DEL CARLO, R.J.; SERAKIDES, R. *et al.* Plasma rico em plaquetas associado ou não ao osso esponjoso autógeno no reparo de falhas ósseas experimentais. *Ciênc. Rural*, v.39, p.129-134, 2009.
- AYRES, M.; AYRES JR, M.; AYRES, D. L. *et al.* *BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília: CNPq, 2007. 364 p.
- BOSWELL, S.G.; COLE, B.J.; SUNDMAN, E.A. *et al.* Current concepts with video illustrations platelet-rich plasma: a milieu of bioactive factors. *Arthroscopy*, v.28, p.429-439, 2012.
- BOSCH, G.; VAN SCHIE, H.T.M.; GROOT, M.W. *et al.* Effects of platelet-rich plasma on the quality of repair of mechanically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendons: a placebo-controlled experimental study. *J. Orthop. Res.*, v.28, p.211-217, 2010.
- CARMONA, J.U.; ARGÜELLES D.; CLIMENT, F. *et al.* M. Autologous platelet concentrates as a treatment of horses with osteoarthritis: a preliminary pilot clinical study. *J.U. J. Equine Vet. Sci.*, v.27, p.167-170, 2007.
- EVERTS, P.A.M.; KNAPE, J.T.A.; WEIBRICH, G. *et al.* Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *J. Am. Soc. Extra Corpor. Technol.*, v.38, p.174-187, 2006a.
- EVERTS, P.A.M.; MAHONEY, C.B.; HOFFMANN, J.J.M.L. *et al.* Platelet-rich plasma preparation using three devices: implications for platelet activation and platelet growth factor release. *Growth Factors*, v.24, p.165 - 171, 2006b.
- FLAD, H.D.; BRANDT, E. Platelet-derived chemokines: pathophysiology and therapeutic aspects. *Cel. Mol. Life Sci.*, v.67, p.2363-2386, 2010.
- MAIA, L.; SOUZA, M.V.; RIBEIRO JÚNIOR, J.I. *et al.* Platelet-Rich plasma in the treatment of induced tendinopathy in horses: histologic evaluation. *J. Equine Vet. Sci.*, v.29, p.618-126, 2009.
- MALHOTRA, A.; PELLETIER, M.H.; YU, Y. *et al.* Can platelet-rich plasma (PRP) improve bone healing? A comparison between the theory and experimental outcomes. *Arch. Orthop. Trauma Surg.*, v.133, p.153-165, 2013.
- MARX, R.E., CARLSON, E.R., EICHSTAEDT, R.M. *et al.* Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.85, p.638-646, 1998.
- MARX, R. E. Quantification of growth factor levels using simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.58, p.300-301, 2000.
- MATTHEWS, J.L.; MARTIN, J.H. *Atlas de histologia y ultra estructura humanas*. Barcelona: Salvat, 1974.
- MCCARREL, T.; FORTIER, L. Temporal growth factor release from platelet-rich plasma, trehalose lyophilized platelets, and bone marrow aspirate and their effect on tendon and ligament gene expression. *J. Orthop. Res.*, v.27, p.1033-1042, 2009.
- MONTEIRO, B.S.; DEL CARLO, R.J.; NETO, N.M.A.L. *et al.* Contribuição do plasma rico em plaquetas na reparação óssea de defeitos críticos criados em crânios de camundongos. *Ciênc. Rural*, v.40, p.1590-1596, 2010.
- OLIVEIRA-FILHO, M.A., ALMEIDA, L.E.; PEREIRA, J.A.; *et al.* Plasma rico em plaquetas de coelhos: introdução a um modelo animal experimental. *Arq. Bras. Cir. Dig.*, v.21, p.175-179, 2008.

- SÁNCHEZ, M.; ANITUA, E.; ORIVE, G. *et al.* I. Platelet-rich therapies in the treatment of orthopaedic sport injuries. *Sports Med.*, v.39, p.345-354, 2009.
- TRIOLA, M.F. *Introdução à estatística*. 7.ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1999. 410p.
- VANAT, N.; MEDEIROS, T.N.S.; BALARIN, M.R.S. *et al.* Modificação de técnica de preparo do plasma rico em plaquetas em cães. *Semina: Ciênc. Agr.*, v.33, p.313-322, 2012.
- VENDRUSCOLO, C.P.; CARVALHO, A.M.; MORAES, L.F. *et al.* Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de preparo do plasma rico em plaquetas para uso em medicina equina. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.32, p.106-110, 2012.
- WASTERLAIN, A.S.; BRAUN, H.J.; DRAGOO, J.L. Contents and formulations of platelet-rich plasma. *Oper. Techn. Orthop.*, v.22, p.33-42, 2012.
- WEIBRICH, G.; HANSEN, T.; KLEIS, W. *et al.* Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone*, v.34, p.665-671, 2004.
- YAMADA, A.L.M.; CARVALHO, A.M.; OLIVEIRA, P.G.G. *et al.* Plasma rico em plaquetas no tratamento de lesões condrais articulares induzidas experimentalmente em equinos: avaliação clínica, macroscópica, histológica e histoquímica. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.64, p.323-332, 2012.
- ZANDIM, B.M.; SOUZA, M.V.; MAGALHÃES, P.C. *et al.* Platelet activation: ultrastructure and morphometry in platelet-rich plasma of horses. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.32, p.83-92, 2012.