

INTERVENCIÓN NUTRICIONAL CON OMEGA 3 EN UN GRUPO DE PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA (TEA).

Serrato Sánchez Karla Alejandra¹, Bazaldúa Ledesma Verónica², Garza Sepúlveda Gerardo², Cuellar Robles Sofía², Márquez Zamora Leticia², Sánchez Peña María Alejandra².

1. Universidad Autónoma de Nuevo León, Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”
2. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Salud Pública y Nutrición.

Citation: Serrato Sánchez K.A., Bazaldúa Ledesma V., Garza Sepúlveda G., Cuellar Robles S., Márquez Zamora L., Sánchez Peña M. A. (2018) Intervención Nutricional con Omega 3 en un grupo de pacientes con diagnóstico de Trastorno del Espectro Autista (TEA). Revista de Salud Pública y Nutrición, 17 (4), 27-33.

Editor: Esteban G. Ramos Peña, Dr. CS., Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Salud Pública y Nutrición, Monterrey Nuevo León, México.

Copyright: ©2018 Serrato Sánchez K.A., et al. This is an open-access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution License [CC BY-ND 4.0], which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Recibido: 10 de septiembre 2018; **Aceptado:** 29 de noviembre 2018

Email: maria.sanchezp@uanl.mx

INTERVENCIÓN NUTRICIONAL CON OMEGA 3 EN UN GRUPO DE PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA (TEA).

Serrato Sánchez Karla Alejandra¹, Bazaldúa Ledesma Verónica², Garza Sepúlveda Gerardo², Cuellar Robles Sofía², Márquez Zamora Leticia², Sánchez Peña María Alejandra².

1. Universidad Autónoma de Nuevo León, Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González"

2. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Salud Pública y Nutrición.

RESUMEN

Introducción: El trastorno del espectro autista afecta la interacción social, y la conducta. Diversos estudios describen una variedad de terapias entre ellas la dieta sin gluten y caseína y la suplementación con ácidos grasos omega-3. **Objetivo:** Evaluar el efecto de una dieta sin gluten y caseína, suplementada con ácidos grasos omega-3 en el Trastorno del Espectro Autista. **Material y Métodos:** Estudio experimental controlado no aleatorio realizado durante ocho semanas valorando 15 sujetos en un rango de edad de 3-12 años se realizó evaluación nutricional y la escala de CARS al inicio y final del estudio, se dividieron en tres grupos, grupo A: dieta sin gluten y caseína, grupo B: dieta sin gluten y caseína más suplementación con omega-3 en una dosis de 1.2 g/d y grupo C: control sin dieta y sin suplementación. Realizando análisis estadístico con el programa estadístico MEDCALC®. **Resultados:** Del total de 15 sujetos el 20 % pertenecía al género femenino mientras que el 80 % al sexo masculino con una media de edad de 7 años. Al comparar el comportamiento se observó una diferencia significativa ($p=0.0006$) en el grupo B. **Conclusiones:** La dieta sin gluten y caseína y los con ácidos grasos omega-3 puede ser una terapia nutricional efectiva para mejorar el comportamiento.

Palabras Clave: Trastorno del Espectro Autista, Gluten, Caseína, Omega-3.

ABSTRACT

Introduction: autism spectrum disorders affects social interaction, and behavior. Several studies describe a variety of therapies including gluten-free diet and casein and supplementation with omega-3 fatty acids. **Objective:** To evaluate the effect of a diet without gluten and casein, supplemented with omega-3 fatty acids in Autistic Spectrum Disorder. **Methods:** non randomized controlled experimental study conducted during eight weeks in fifteen children diagnosed with ASD in an age range of 3-12 years, with nutritional evaluation and the CARS scale at the beginning and end of the study, were divided into three groups, group A: diet without gluten and casein, group B: diet without gluten and casein plus omega-3 in a dose of 1.2 g / d and group C: control without diet and without supplementation. Performing statistical analysis with the statistical program MEDCALC®. **Results:** Of 15 subjects, 20% belonged to the female gender while 80% to the male sex with an average age of 7 years. When comparing the behavior, a significant difference was observed ($p = 0.0006$) in group B. **Conclusions:** The diet without gluten and casein and those with omega-3 fatty acids can be an effective nutritional therapy to improve behavior. **Key words:** autism spectrum disorders, gluten, casein, omega-3.

Introducción

El Trastorno del Espectro Autista (TEA), es un desorden que, aunque las estimaciones de prevalencia varían, se sugiere que a nivel internacional uno de cada 1,000 niños lo presenta. (Álvarez., Camacho-Arroyo., 2010: 22). En Estados Unidos su prevalencia es 1 de cada 68 niños (Mankad., Dupuis., Smile., 2015: 1) y para México la prevalencia es de 1 por cada 300 niños (Oviedo., De la Chesnaye., Guerra-Araiza., 2015: 7).

Su etiología es desconocida, afectando el desarrollo neurológico, presentando una deficiencia en la interacción social y comunicación, mostrando conductas rígidas y repetitivas acentuadas con diferente grado de severidad que alteran la situación nutricional, la evolución de la enfermedad o su respuesta a las terapias. (Mankad et al., 2015: 1).

Hasta la fecha, no existe medicamento que pueda curar el autismo, debido a esto muchos padres han optado por el uso de tratamientos alternativos. Incluyendo dietas de eliminación, en especial sin gluten y sin caseína; excluyendo de la dieta el trigo, cebada, avena, centeno y alimentos que lo contengan tales como panes, pastas, pasteles u otros productos de panadería hechos con harinas de estos cereales; mientras que la eliminación de caseína consiste en descartar la ingesta de productos lácteos incluyendo la leche materna, yogurt, queso, mantequilla, crema o nieve entre otros. (Marí-Bauset., Zazpe., Mari-Sanchis., Llopis-González., Suárez-Varela., 2014: 673).

Ya que se ha identificado que los péptidos bioactivos (gluteomorfinas y caseomorfinas) del gluten y la caseína respectivamente tienen un rol importante en el origen de deficiencias alimentarias y en algunos síntomas conductuales en el autismo, debido a la actividad excesiva de opioides producidos por estos, lo que genera una mucosa intestinal más permeable, reportándose en algunos estudios; niveles anormales en orina y en el fluido cerebroespinal de estas sustancias peptídicas (Millward., Ferriter., Calver., Connell-Jones., 2008: 2-3).

Este tipo de tratamiento se basa en la teoría de la liberación de péptidos con actividad opioide en el intestino, donde después de la digestión, ciertos tipos de proteínas pueden cruzar la mucosa intestinal donde estos péptidos, transportados por la corriente

sanguínea, atraviesan la barrera hematoencefálica y llegan al sistema nervioso central en grandes cantidades logrando afectar el funcionamiento del cerebro. (Marí-Bauset et al., 2014: 674).

Por otro lado, los ácidos grasos omega-3 como constituyente de la dieta, están presentes en las membranas celulares, siendo sugerido que es un factor importante en la respuesta de los neurotransmisores o estimulación neurohormonal (Belmaker., Meiri., 2014: 2427). Los numerosos efectos de los ácidos grasos omega-3 sobre los mecanismos neuronales explican que la deficiencia de estos conduce a un deterioro de las diversas funciones cerebrales.

La suplementación con ácidos grasos omega-3 en autismo se ha utilizado con frecuencia como una terapia complementaria, que brinda beneficio en los síntomas propios de este trastorno, así como mejoría en las habilidades de lenguaje y aprendizaje (Bent., Bertoglio., Ashwood., Bostrom., Hendren., 2011: 545).

Diversos estudios en niños con autismo han observado que presentan niveles bajos de ácidos grasos omega-3 en sangre, en comparación con niños que no padecen esta patología, generando la idea de que los suplementos de ácidos grasos omega-3 pueden conducir a una mejora en el comportamiento. (Politi., Cena., Emanuele., 2011: 1788).

Por lo que nuestro objetivo en el presente estudio fue el proporcionar una intervención nutricional con dieta sin gluten y sin caseína, suplementada con ácidos grasos omega-3 en pacientes con TEA para asociarla con el comportamiento y de esa forma, beneficiar a este grupo vulnerable de una mejor manera para desarrollar habilidades conductuales y sociales que les permita adaptarse y tener independencia en las actividades básicas de la vida diaria.

Material y Métodos

Estudio experimental controlado no aleatorio con un tamaño de muestra a conveniencia, en un grupo de pacientes con Trastorno del Espectro Autista que acudían a una Instancia de Atención Integral para TEA en la Ciudad de Monterrey, N.L., México.

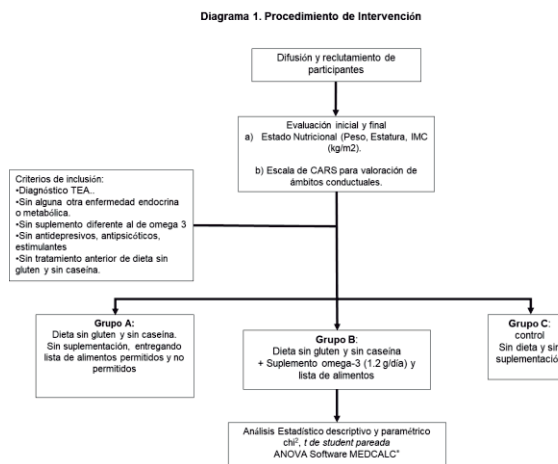
Bajo previo consentimiento informado por el padre o tutor se realizó historia clínica nutricional (anexo 1) a cada paciente donde se englobó el Proceso del Cuidado Nutricio (PCN) realizando evaluación clínica, antropométrica (peso, estatura e IMC/Edad), y dietética, haciendo uso del formato validado recordatorio de 24 horas y frecuencia de alimentos al inicio y al final del estudio.

Para valorar el TEA y los rasgos de conducta de todos los grupos se utilizó la escala CARS (Childhood Autism Rating Scale) (anexo 2), la cual consta de 15 ítems referentes a cada uno de los ámbitos conductuales propios de la patología, tales como trastornos en las relaciones interpersonales, imitación, afecto inapropiado, resistencia al cambio, entre otros. Este instrumento permite clasificar al encuestado en diversos grados de severidad de la patología (medio, moderado y severo). Cada elemento contribuye igualmente a la puntuación total, el cual puede variar de 15 a 60, al inicio y final de la intervención.

Posterior a la evaluación inicial se dividieron en tres grupos, al grupo A, se implementó intervención nutricional con dieta sin gluten y sin caseína de acuerdo con su requerimiento para la edad y lista de alimentos permitidos y no permitidos y sin suplementación. Al grupo B se le brindó Intervención nutricional con dieta sin gluten y caseína de acuerdo con su requerimiento para la edad, lista de alimentos permitidos y no permitidos y suplementación con omega-3 con dosis de 1.2 g/día. Grupo C: (control), sin dieta y sin suplementación (Diagrama 1).

Se realizaron 8 sesiones (1 por semana) para dar seguimiento dietético, entregar suplemento y brindar orientación alimentaria.

Se realizó análisis estadístico con pruebas descriptivas, y paramétricas de asociación con prueba de Chi² y análisis de varianza por t de student pareada y ANOVA para comparación entre grupos, utilizando el programa estadístico MEDCALC®.



Resultados

La población de estudio fue de 15 sujetos en un rango de edad de 3 a 12 años con un promedio de 7 ± 3 años de edad, divididos en 3 grupos: 5 sujetos a una dieta sin gluten y sin caseína (grupo A), 5 con dieta sin gluten y sin caseína suplementado con omega-3 (grupo B) y 5 sin dieta ni suplementación (grupo C) (Tabla 1). Del total de la población un 80 % (n=12) fue de género masculino y un 20 % (n=3) del género femenino como se muestra en el Gráfico 1.

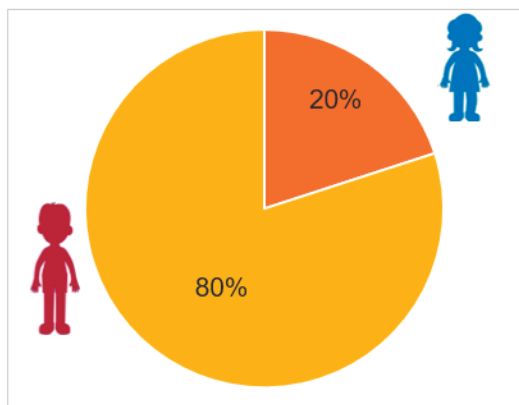
Tabla 1. Descripción de la población de estudio

	Grupo A	Grupo B	Grupo C
	Media + DE	Media + DE	Media + DE
	n=5	n=5	n=5
Edad (años)	7 ± 3.7	7 ± 2.3	7 ± 3.5
Min.	3	5	3
Máx.	12	11	12

Fuente directa.

Los datos se expresaron como media + desviación estándar, años.

Gráfico 1. Porcentaje de sujetos del estudio con Diagnóstico de TEA por género.



Fuente directa

Al comparar el comportamiento por la escala CARS para evaluar el grado de severidad de Autismo por grupos de estudio en relación con la puntuación obtenida basal y final en base al análisis estadístico de varianzas por t de student pareada se observó una diferencia significativa ($p=0.0006$) entre el grupo con dieta y el grupo de dieta más suplemento. Al comparar el comportamiento entre grupos por ANOVA se observó una diferencia significativa ($p=0.41$) como se observa en la Tabla 2.

Tabla 2. Comparación del grado de severidad del Autismo por la escala CARS en la población de estudio

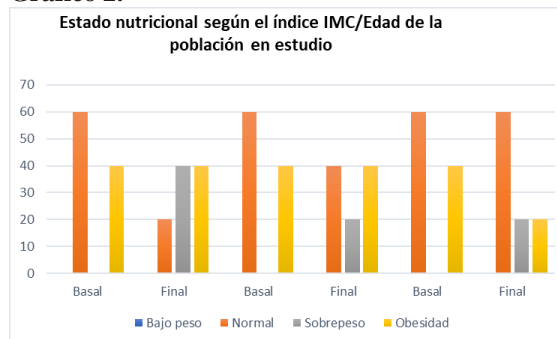
	Basal	Final	p-valor*1	p-valor*2
	Media + DE	Media + DE		
Grupo A (n=5)	31.8 ±6.3	27.9 ±6.0	0.3589	
Grupo B (n=5)	30.2 ±2.8	20.3 ±1.2	0.0006*	0.041*
Grupo C (n=5)	35.7 ±8.1	30.7 ±8.0	0.3809	

* $p<0.005$ 1.Determinada por varianza por t de student pareada 2.ANOVA

Fuente directa. Los datos se expresaron como media + desviación estándar.

La evaluación del estado nutricional del total de sujetos ($n=15$) por IMC de acuerdo con la edad en los tres grupos al inicio y final de la intervención, se observa en el Gráfico 2.

Gráfico 2.



Fuente directa.

Los cambios del estado nutricional se pueden atribuir a la restricción de alimentos en la dieta sin gluten y sin caseína implementada en el grupo A y B, la cual limita la variedad de alimentos para su ingesta dejando como opción alimentos con alto valor calórico.

También se comparó el consumo de gluten y caseína por la prueba Chi² en la población de estudio por medio de la herramienta dietética frecuencia de consumo de alimentos, obtenida al inicio y final en los tres grupos.

Se observó una disminución de la frecuencia en el promedio de consumo de alimentos con gluten y caseína, sin embargo, no existe una diferencia estadísticamente significativa como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Frecuencia del consumo de alimentos con gluten y caseína en la población de estudio

	Gluten			Caseína			Gluten y Caseína		
	Basal (%)	Final (%)	p-valor*1	Basal (%)	Final (%)	p-valor*1	Basal (%)	Final (%)	p-valor*1
Grupo A	4.6	0.2	0.1718	2.2	0	0.1797	6.8	0.2	0.1718
Grupo B	2.4	0	0.8964	3.6	0.2	0.2873	6	0.2	0.1718
Grupo C	9.2	7.8	0.2414	4.8	2.8	0.259	14	10.6	0.2414

* $p<0.005$ 1 Determinado por prueba Chi2

Sobre la ingesta de macronutrientes, así como de algunas vitaminas, minerales y otros nutrientes involucrados en el desarrollo neurológico. La ingesta de energía promedio en el Grupo A al inicio fue de 2824 kcal comparada con 2041 kcal al final, en el Grupo B el promedio de ingesta al inicio y final de la intervención fue de 1194 y 770 kcal respectivamente; mientras que en el Grupo C hubo una ingesta de 1865 kcal basal y 1218 kcal finales. El consumo dietético de omega-3 disminuyó en todos los grupos, en el

Grupo B disminuyó de 0.67 g al inicio a 0.17 g al final (Tabla 4), es importante mencionar que este grupo fue suplementado 1.2 g/día de este nutriente, lo que apoyó en cumplir su requerimiento de ingesta diaria.

Tabla 4. Ingesta diaria Inicial y Final de nutrientes en sujetos valorados con TEA

	Grupo A		Grupo B		Grupo C	
	Basal	Final	Basal	Final	Basal	Final
Energía						
(Kcal)	2824.8	2041.16	1194.79	770.47	1865.27	1218.67
Pt (g)	87.26	63.61	43.28	39.99	74.01	50.24
HC (g)	298.18	265.14	174.1	105.11	217.88	166.2
Lp (g)	149.55	94.92	40.34	23.09	78.78	42.87
Vit B1 (mg)	0.77	0.8	0.48	0.24	0.43	0.48
Vit B6 (mg)	1.19	0.92	0.41	0.3	0.6	0.51
Vit B9 (µg)	2.36	1.13	0.8	1.07	2.59	1.5
Vit B12 (µg)	253.16	170.32	122.81	67.24	144.74	139.37
Magnesio (m)	276.76	204.26	86.22	42.1	72.57	74.74
Selenio (µg)	60.52	40.91	16.65	14.78	58.49	31.36
Zinc (mg)	8.5	5.48	2.6	2.07	5.14	3.33
Omega-3 (g)	1.61	0.5	0.67	0.17	0.82	0.56
Omega-6 (g)	14.48	4.83	4.46	1.19	5.96	3.31

Fuente directa

Discusión

El presente estudio es el primero en niños con trastorno del Espectro Autista en el Estado de Nuevo León presentando evidencia de que la suplementación con ácidos grasos omega-3 en conjunto con una dieta sin gluten y sin caseína tiene una influencia positiva en el grado de severidad de síntomas conductuales, en comparación con el grupo que solo recibió una dieta sin gluten y sin caseína, lo contrario a lo encontrado por Harrison (2006) quienes no observaron una diferencia significativa en el comportamiento.

Estudios como el de Bent y cols (2011) utilizaron la suplementación de omega-3 en una dosis de 1.3 g/día, no mostrando resultados estadísticamente significativos, pero sí una disminución en la hiperactividad en el grupo con la suplementación en comparación con el grupo placebo.

En un estudio de revisión donde evaluaron la eficacia de la suplementación con ácidos grasos omega-3 en autismo se encontró una mejora significativa en los síntomas conductuales. Amminger y cols (2007) reportó que el efecto de la suplementación con omega 3 era superior al placebo reduciendo la hiperactividad y mejorando el lenguaje. Lo cual tanto en el estudio de Bent como el de Amminger con nuestro estudio tiene una similitud.

Hajar y cols (2017) en un metanálisis observaron un beneficio pequeño pero significativo en relación con la suplementación con omega-3 y la interacción social evaluando estos parámetros dentro de la escala CARS, observando en nuestro estudio resultados significativos similares.

En una revisión realizada por James et al (2011) donde se evaluó la eficacia de los ácidos grasos omega-3 en la mejora de las características del comportamiento en Autismo, en dos estudios aleatorizados doble ciego no se observó una diferencia significativa en la hiperactividad entre el grupo experimental (suplementado) y el grupo control (placebo). Lo cual no se observó en nuestro estudio ya que sí mostró significancia.

Harris y cols (2012) estudiaron el efecto de la dieta sin gluten y caseína en relación en la mejora del comportamiento en niños con Autismo utilizando la escala de CARS, donde los resultados muestran que el 100 % de los padres de los niños con la dieta reportaron una mejora en el comportamiento a pesar de que la escala no respalda una correlación significativa entre el consumo de alimentos con gluten-caseína y el comportamiento, lo cual no se observó en nuestro estudio ya que el implementar solo la dieta restrictiva no mostró significancia.

En una prueba controlada aleatorizada llevada a cabo por Seung (2007) no observaron una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos donde se evaluó la severidad de los síntomas o del lenguaje, a pesar de que los padres de familia de 7 de los 15 niños reportaron una mejora en el lenguaje, observando una situación semejante en nuestro estudio, aunque no se observó una correlación estadística entre la escala de CARS con la dieta sin gluten y sin caseína.

Una de las ventajas de nuestro estudio es la intervención nutricional con dieta sin gluten y sin caseína en conjunto con la suplementación con ácidos grasos omega-3, demostrando cambios de comportamiento después de 8 semanas de intervención, en contraste con otros estudios revisados que no muestran una mejora significativa en el comportamiento al llevar solamente una de las dos terapias y no en conjunto como en nuestro estudio.

Conclusiones

En base a los resultados obtenidos se puede concluir que en nuestro estudio no hay evidencia estadísticamente significativa de mejoría en el comportamiento de niños con Trastorno del Espectro Autista al llevar una dieta sin gluten y sin caseína, sin embargo, cuando se utiliza la suplementación con ácidos grasos omega-3 se observa un impacto positivo en su comportamiento.

Por lo que la suplementación con ácidos grasos omega 3 puede considerarse como una terapia nutricional efectiva para mejorar el comportamiento característico de los niños con TEA.

Es necesaria la realización de investigaciones donde la población de estudio sea mayor para seguir evaluando esta relación de la suplementación de ácidos grasos omega-3 en niños con autismo y la conducta, así como la evaluación de un grupo con suplementación de ácidos grasos omega-3 en niños que lleven una dieta sin restricción.

Se requiere seguir estudiando el Trastorno del Espectro Autista y su interacción con la alimentación y suplementación con el fin de comprender mejor la patología y llevar a cabo tratamientos nutricionales más específicos.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. Erik Ramírez López y Dr. José Luis Jasso Medrano el apoyo brindado para el análisis estadístico.

Bibliografía

Amminger, P. G., Berger, G. E., Schäfer, M. R., Klier, C., Friedrich, M. H., & Feucht, M. (2007). Omega-3 Fatty Acids Supplementation in Children with Autism: A Double-blind Randomized, Placebo-controlled Pilot Study. *En Biol Psychiatry*, 61, 551-553. doi: 10.1016/j.biopsych.2006.05.007.

Alvarez, I., Camacho Arroyo, I. (2010). Bases Genéticas del Autismo. *En Acta Pediatr Mex*, 31, 22-28. doi: 10.18233/APM31No1pp22-28.

Belmaker, R. H., & Meiri, G. (2014). *Comprehensive Guide to Autism*. doi: 10.1007/978-1-4614-4788-7.

Bent, S., Bertoglio, K., Ashwood, P., Bostrom, A., & Hendren, R. L. (2011). A Pilot Randomized Controlled Trial of Omega-3 Fatty Acids for Autism Spectrum

Disorder. *En Journal of Autism and Developmental Disorders*, 41, 545-554. doi: 10.1007/s10803-010-1078-8.

Harrison Elder, J., Shankar, M., Shuster, J., Theriaque, D., Burns, S., & Sherril, L. (2006). The Gluten-Free, Casein-Free Diet In Autism: Results of A Preliminary Double Blind Clinical Trial. *En Journal of Autisms and Developmental Disorders*, 36, 413-420. doi: 10.1007/s10803-006-0079-0.

Harris, C., Card, B. (2012). A pilot study to evaluate nutritional influences on gastrointestinal symptoms and behavior patterns in children with Autism Spectrum Disorder. *En Complementary Therapies in Medicine*, 20, 437-440. doi: 10.1016/j.ctim.2012.08.004.

James, S., Montgomery, P., Williams, K. (2011). Omega-3 fatty acids supplementation for autism spectrum disorders (ASD). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 11, 1-24. Recuperado de: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD007992.pub2/full>.

Mankad, D., Dupuis, A., Smile, S., Roberts, W., Brian, J., Lui, T., y otros. (2015). A randomized, placebo controlled trial of omega-3 fatty acids in the treatment of young children with autism. *En Molecular Autism*, 6, 1-11. doi: 10.1186/s13229-015-0010-7.

Marí-Bauset, S., Zazpe, I., Mari-Sanchis, A., Llopis-González, A., & Suárez-Varela, M. (2014). Evidence of the gluten free and casein free diet in autism spectrum disorders (ADS): a systematic review. *En Journal of child neurology*, 29, 1718-1727. doi: 10.1177/0883073814531330

Mazahery, H., Stonehouse, W., Delshad, M. (2017). Relationship between Long Chain n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Autism Spectrum Disorder: Systematic Review and Meta-Analysis of Case-Control and Randomised Controlled Trials. *Nutrients*, 9, 1-32. doi: 10.3390/nu9020155.

Millward, C., Ferriter, M., Calver, S. J., & Connell-Jones, G. G. (2014). Gluten- and casein-free diets for autistic spectrum disorder. *En Cochrane Database Syst Rev*, 2-29. doi: 10.1002/14651858.

Oviedo, N., Manuel, L., de la Chesnaye, E., Guerra, C. (2015). Aspectos genéticos y neuroendocrinos en el trastorno del espectro autista. *En Bol Med Hosp Infant Mex*, 72, 5-14. doi: 10.1016/j.bmhmx.2015.01.010.

Politi, P., Cena, H., & Emanuele, E. (2011). Handbook of Behavior, Food and Nutrition. doi: 10.1007/978-0-387-92271-3_116.

Seung, H., Rogalski, Y., Shankar, M. (2007). Journal of medical speech-language pathology. Recuperado de: <https://www.researchgate.net/publication/268277130>.

Schopler, E., Reichler, R. J., DeVellis, R. F., & Daly, K. (1980). Toward Objective Classification of Childhood Autism: Childhood Autism Rating Scale (CARS). *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 10, 92-103. doi: 10.1007/BF02408436.