



Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología

ISSN: 0034-7434

ISSN: 2463-0225

Federación Colombiana de Obstetricia y Ginecología;
Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología

Gómez-Rojas, Susana; Aristizábal-Duque, Jorge Enrique; Muñoz-Fernández,
Luisa Fernanda; Sarmiento-Ramón, María Paula; Pereira-Gómez, María del Pilar

Nueva variante del gen *STAG3* causante de insuficiencia ovárica prematura

Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología, vol. 73, núm. 1, 2022, pp. 142-148

Federación Colombiana de Obstetricia y Ginecología; Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología

DOI: <https://doi.org/10.18597/rcog.3806>

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=195271139006>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org



Sistema de Información Científica Redalyc

Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso
abierto



REPORTE DE CASO

<https://doi.org/10.18597/rcog.3806>

Nueva variante del gen *STAG3* causante de insuficiencia ovárica prematura

New *STAG3* gene variant as a cause of premature ovarian insufficiency

Susana Gómez-Rojas, MD¹; Jorge Enrique Aristizábal-Duque, MD²; Luisa Fernanda Muñoz-Fernández, MD²; María Paula Sarmiento-Ramón, MD³; María del Pilar Pereira-Gómez, MD¹

Recibido: 02 de febrero de 2022/Aceptado: 21 de marzo de 2022

RESUMEN

Objetivos: describir un caso de falla ovárica secundaria a una variante patogénica homocigota en el gen *STAG3* no reportada previamente.

Materiales y métodos: paciente de 16 años con amenorrea primaria y ausencia de características sexuales secundarias, en quien se documentó hipotiroidismo autoinmune, pobre desarrollo genital y cintilla gonadal, por lo cual se realizó secuenciación de exoma clínico. Se identificó una variante homocigota patogénica previamente no reportada en el gen *STAG3*, el cual ha sido relacionado con insuficiencia ovárica prematura (IOP).

Conclusiones: en este caso, la realización de exoma clínico fue determinante para identificar una alteración del gen *STAG*, probablemente asociada a la IOP y el pronóstico a largo plazo de la paciente. Se establece una nueva variante patogénica c.2773delT; p.Ser925Profs*6 del gen *STAG3* asociada a la IOP.

Palabras claves: hipogonadismo, insuficiencia ovárica primaria, disgenesia gonadal, autoinmunidad, secuenciación del exoma completo.

ABSTRACT

Objectives: To describe a case of ovarian failure secondary to a homozygous pathogenic variant in the *STAG3* gene not previously reported.

Material and methods: A 16-year-old patient with primary amenorrhea and absence of secondary sexual characteristics, with documented autoimmune hypothyroidism, poor genital and gonadal streak development which prompted the performance of clinical exome sequencing. A homozygous pathogenic variant not previously reported in the *STAG3* gene, which has been associated with premature ovarian insufficiency (POI), was identified.

Conclusions: In this case, clinical exome sequencing was key for identifying a *STAG* gene abnormality, probably associated with POI and long term prognosis for the patient. A new pathogenic variant c.2773delT; p.Ser925Profs*6 of the *STAG3* gene associated with POI was established.

Keywords: Hypogonadism, primary ovarian insufficiency, gonadal dysgenesis, autoimmunity, complete exome sequencing.

INTRODUCCIÓN

La insuficiencia ovárica primaria (IOP) se define como la pérdida de función ovárica antes de los 40 años (1). Coulam, citado por Torrealday, informa una

* Correspondencia: Susana Gómez-Rojas, residente de endocrinología pediátrica de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Dirección, Carrera 25 # 3B-60, Medellín, Colombia. Correo electrónico: susig_75@hotmail.com

1. Residente de endocrinología pediátrica, Universidad de Antioquia, Medellín (Colombia).
2. Profesor del Departamento de Obstetricia y Ginecología, Universidad de Antioquia, Medellín (Colombia).
3. Clínica FOSCAL, Bucaramanga (Colombia).

incidencia de “1% a la edad de 40 años y del 0,01% a la edad de 20 años” (2). Las causas de la IOP son múltiples, puede ser secundaria a intervenciones médicas (quimioterapia, radioterapia) o puede ocurrir de forma espontánea como parte de enfermedades autoinmunes, infecciosas, metabólicas, cromosómicas o síndromes genéticos (1). Aproximadamente entre el 10% y 15% de las pacientes se ha determinado una causa genética, siendo más frecuentes las alteraciones cromosómicas (anormalidades en estructura de X o aneuploida X) (3).

La guía de la Sociedad Europea de Reproducción y Embriología indica que el diagnóstico de IOP se realiza por la presencia de alteraciones menstruales junto con confirmación bioquímica. La presentación clínica de IOP es variable con síntomas que incluyen manifestaciones de hipoposterogenismo como oligo/amenorrea e infertilidad. Las irregularidades menstruales son el signo inicial más frecuente y la amenorrea primaria ocurre hasta en el 10% de los casos. Así mismo, establece como criterio bioquímico la elevación de la hormona folículo estimulante (FSH), más de 25 mUI/mL en dos ocasiones con una diferencia de 4 semanas entre las tomas (4).

Si bien la comprensión actual de la base etiológica/genética de IOP está lejos de ser completa, los avances en estudios y el entendimiento molecular de causas monogénicas ha permitido ampliar la posibilidad etiológica. Las enfermedades monogénicas son causadas por variantes patogénicas de un único gen que producen alteraciones de la proteína codificada, modificando su función y provocando un fenotipo patológico. El diagnóstico genético se basa en la localización de dichas variantes en los genes asociados a las enfermedades, para lo cual son de utilidad las pruebas moleculares de secuenciación masiva como el exoma clínico. En este estudio se realiza la secuenciación de regiones codificantes y, posteriormente, se realiza un análisis computacional. Una vez realizado este proceso, se hace un análisis diagnóstico donde solo las variantes de la región codificante con una frecuencia alélica menor a 1.5% son evaluadas. Las variantes son nombradas de acuerdo con guías in-

ternacionales ampliamente aceptadas, como Human Genome Variation Society (HGVS) (5).

Establecer la etiología en cada caso permite plantear un pronóstico de la enfermedad, así como la posibilidad de detección temprana en familiares. Por ejemplo, existen implicaciones clínicas adicionales cuando se relaciona disgenesia gonadal con IOP. Se ha descrito un riesgo de gonadoblastoma hasta del 54% en los casos de disgenesia gonadal 46 XY, pero el riesgo de malignidad de las gónadas disgenéticas 46 XX no se puede determinar por falta de datos; se considera que estas gónadas son hormonalmente inactivas, por lo tanto, no existe un consenso sobre seguimiento ecográfico o gonadectomía en estos casos (6). Además, dado que estas pacientes cursan con infertilidad, se deben abordar opciones sobre reproducción asistida o adopción (2). Por otro lado, en los casos de asociación con X frágil se permite establecer posibles implicaciones para la paciente y su familia, pues puede haber mujeres portadoras de la enfermedad con riesgo de desarrollar IOP y de tener descendencia con síndrome de X frágil (4).

A continuación, se describe una paciente con diagnóstico clínico y bioquímico de IOP con hallazgos de una variante patogénica homocigótica c.2773delT; p.Ser925Profs*6 en el gen *STAG3* de herencia autosómica recesiva, aún no reportada en la literatura.

PRESENTACIÓN DEL CASO

Mujer de 16 años, hija de padres en cuarto grado de consanguinidad, con antecedente de hipotiroidismo primario autoinmune, antecedente que comparte con su madre. Consulta por ausencia de características sexuales secundarias y amenorrea primaria. A la valoración se encuentra a una paciente con peso de 58 kg, talla de 153 cm (percentil 7) con índice de masa corporal de 24,7 kg/m² (percentil 85), según las curvas de crecimiento del Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) (7). Se evaluó desarrollo mamario y genital por escala de Tanner, ambos en estadio 1, con genitales femeninos de aspecto normal. En su seguimiento, la

paciente mostró postura de ansiedad y preocupación con respecto a su estado clínico.

Se solicitaron exámenes de laboratorio que demostraron estradiol bajo con FSH y hormona luteinizante (LH) elevadas compatible con hipogonadismo hipergonadotrópico. Se descartaron causas cromosómicas y metabólicas de IOP. Se solicitaron anticuerpos 21-hidroxilasa y antitiroideos para estudiar etiología autoinmune que resultaron positivos, posteriormente, se documentó función adrenal conservada (tabla 1). La ecografía pélvica describe

útero con marcada reducción del tamaño para la edad de 28x6x12mm, volumen 1,1 cc, ovario izquierdo marcadamente reducido de 12x10x5 mm (0,3 cc) y ovario derecho no visualizado. Ante los hallazgos se solicitó resonancia magnética abdominal que reportó útero en anteversión con relación cuerpo cérvix 1:1, morfología prepuberal, vagina de 4,4 cm, en la topografía esperada de ovario izquierdo se identificó cintilla gonadal de 14x5x7 mm, sin folículos y no se identificó ovario derecho.

Tabla 1.
Resumen de laboratorios del reporte de caso de paciente con insuficiencia ovárica prematura asociada a variante patogénica del gen *STAG3*.

Estudio	Resultado	Niveles de referencia
17 OHP (ng/dl)	67	< 91
Estradiol (pg/ml)	11,7	> 15
LH (mUI/ml)	27	0,4 – 11,7
FSH (mU/ml)	89,8	1 - 9,2
Prolactina (ng/ml)	12,8	3 - 24
TSH (mUI/ml)	3,92	0,51 – 4,93
Anticuerpos antitiroglobulínicos (mUI/ml)	58,9	Negativo <2
Anticuerpos antiperoxidasa (mUI/ml)	> 1000	Negativo <12
Anticuerpos 21-hidroxilasa (U/mL)	1,8	Negativo <1,0
Cortisol 8 am (mcg/dl)	14	8 - 19
ACTH (pg/ml)	10,9	6 - 48
Cariotipo en 100 metafases	46XX	-

17 OHP (17 hidroxiprogesterona), LH (Hormona luteinizante), FSH (Hormona folículo estimulante), TSH (Hormona estimulante de tiroides), ACTH (Hormona adrenocorticotrópica).

Fuente: elaboración propia.

Inicialmente se sospechó como posible causa una ooforitis en el contexto de un síndrome poliglandular autoinmune dada la presencia de anticuerpos 21-hidroxilasa y antitiroideos positivos; sin embargo, ante el hallazgo de cintilla gonadal con ovario contralateral no visualizado, se consideró descartar una etiología monogénica y se indicó la realización de exoma clínico. Este identificó una variante homocigótica c.2773delT; p.Ser925Profs*6 en el gen *STAG3*, de herencia autosómica recesiva causante de IOP. Esta variante no ha sido reportada previamente, pero presenta un veredicto de patogénica por pérdida de función.

Simultáneo al estudio de etiología, se inició inducción puberal con medio parche de estradiol (25 µg) 2 veces por semanas y posteriormente continuó con estrógenos conjugados orales, se logró desarrollo de caracteres sexuales secundarios hasta alcanzar Tanner mamario 4 después de 2 años de suplencia hormonal.

En la actualidad, la paciente se encuentra en seguimiento por endocrinología y ginecología. Continúa suplencia hormonal junto con progestágeno cíclico con adecuada tolerancia, iniciado un año después de los estrógenos para establecer ciclo menstrual regular.

Aspectos éticos. Este reporte de caso contó con el consentimiento de padres de la paciente y se obtuvo autorización del comité de ética médica institucional. Se garantizó la confidencialidad de la información y privacidad de la paciente.

DISCUSIÓN

Se presenta reporte de un caso de IOP en el cual el exoma clínico identificó una variante previamente no reportada, c.2773delT en el gen *STAG3*. La manifestación inicial fue amenorrea primaria y ausencia de caracteres sexuales secundarios. La ecografía pélvica y la resonancia magnética abdominal evidenciaron ausencia de uno de los ovarios y cintilla gonadal contralateral, razón por la que se sospechó una posible causa cromosómica o monogénica, dado que se ha propuesto que la presencia de cintillas gonadales es una característica importante en las pacientes con

IOP que tienen una variante deletérea, con alto impacto en las proteínas (8).

Inicialmente se consideró ooforitis autoinmune como entidad etiológica de la IOP. Esta se encuentra en aproximadamente el 4% de las mujeres que presentan IOP, la presentación clínica puede ser aislada o como parte del síndrome poliglandular autoinmune (9,10). La presencia de autoanticuerpos 21-hidroxilasa es suficiente para hacer el diagnóstico de ooforitis autoinmune en una mujer con IOP, una vez descartadas otras causas (2). Estas pacientes cursan con ovarios grandes y multiquisticos en las etapas iniciales de la enfermedad (10,12).

Los defectos cromosómicos son responsables hasta del 21% de los casos que debutan con amenorrea primaria, de estos, el 94% corresponden a anomalías en el cromosoma X (4). En esta paciente se descartó etiología cromosómica ante la evidencia de cariotipo normal en 100 metafases. Por otro lado, entre un 10% y 15% de los casos de IOP son familiares, lo que sugiere una predisposición genética (10). El número de genes implicados va en aumento y hasta ahora se han identificado mutaciones en más de 50 genes relacionados con IOP (13). La mayoría de las mutaciones identificadas corresponden a genes con funciones importantes para el desarrollo gonadal, la meiosis, foliculogénesis, señalización hormonal, esteroidogénesis, metabolismo, función mitocondria, el daño y la reparación del ADN (3,9). Curiosamente, algunos de los genes implicados se superponen con variantes comunes que se asocian con edad temprana de la menopausia en la población general, tales como *STAG3*, *SY-CE1*, *MCM8*, *MCM9*, *SPIDR*, *MARF1* y *PSMC3IP*, *BRCA2*, *ESR2* (14,15).

Las mutaciones del gen *STAG3* se reconocen como causa de IOP tipo 8 (OMIM # 61572) (16). La nueva variante, identificada mediante el exoma, genera una delección homocigótica de 1 pb que induce un cambio *frameshift* de corrimiento del marco de lectura en la proteína codificada que lleva a un codón de parada prematuro, por lo cual se considera una variante patogénica. Hasta la fecha 14 variantes del gen *STAG3* han sido reportadas en mujeres con IOP y en un hombre con azoospermia no obstructiva (9).

El gen *STAG3* codifica una subunidad de cohesina específica de meiosis del anillo de cohesión, que es responsable de la sinapsis adecuada de las cromátidas hermanas y la segregación cromosómica (17). Desde el 2014 se han estudiado las implicaciones clínicas de las mutaciones en el gen *STAG3*. En un estudio realizado por Caburet y colaboradores, se demostró que los ratones *knockout* para el gen *STAG3* presentan ausencia de desarrollo de ovocitos secundario a falla meiótica por detención en la profase I (18).

Hasta la fecha, las variantes de *STAG3* causantes de POI incluyen una delección homocigótica de 1 pb (19), una duplicación homocigótica de 2 pb (20), una variante homocigótica *non-sense* (21), una variante homocigótica del sitio de empalme (20), dos variantes homocigóticas *in-frame* (17), dos variantes heterocigotas compuestas (*missense* y delección de 1 pb) (6), dos variantes de pérdida de función con *heterocigosidad* compuesta no confirmada (22), una variante homocigótica *missense* (9) y tres variantes de *STAG3* asociadas con POI se informan en la base de datos de ClinVar: una variante *non-sense* y dos variantes canónicas del sitio de empalme sin información completa sobre su estado homocigoto o heterocigoto.

Es prudente destacar que de los casos reportados todos los pacientes portadores de *STAG3* bialélico tenían un fenotipo de IOP de aparición temprana, amenorrea primaria, ausencia de características sexuales secundarias y cintillas gonadales, como en el caso reportado en esta investigación (9,17,18,20,21,22).

Se considera que la identificación de una variante de *novi* en *STAG3* explica el cuadro clínico de la paciente. No se conoce si la ooforitis autoinmune y la disgenesia gonadal causada por variantes en *STAG3* podrían coexistir; no existen casos reportados de simultaneidad de estas dos entidades. Sin embargo, el antecedente de autoinmunidad tiroidea y anticuerpos 21-hidroxilasa positivos obliga a continuar con una búsqueda activa de insuficiencia suprarrenal primaria, la cual se puede presentar de forma asintomática hasta en el 3% de las pacientes con IOP. Se recomienda la realización anual de cortisol sérico, el cual fue normal en este paciente (2).

La fortaleza de este reporte de caso radica en recalcar la importancia del estudio genético molecular en pacientes con IOP. Sin embargo, es de resaltar las limitaciones respecto al diagnóstico de posible patología autoinmune. Si bien, el diagnóstico etiológico se basó en los hallazgos de laboratorio e imágenes, sería el estudio histopatológico del ovario el que nos permitiría establecer una causalidad definitiva.

CONCLUSIONES

En este caso, la realización de exoma clínico fue determinante para el diagnóstico y el pronóstico a largo plazo de la paciente. Los hallazgos descritos probablemente establecen una nueva variante patogénica c.2773delT; p.Ser925Profs*6 del gen *STAG3* asociada a la insuficiencia ovárica prematura.

REFERENCIAS

1. Committee opinion no. 605: primary ovarian insufficiency in adolescents and young women. *Obstet Gynecol.* 2014; 124(1): 193-197. <https://doi.org/10.1097/01.AOG.0000451757.51964.98>
2. Torrealday S, Kodaman P, Pal L. Premature Ovarian Insufficiency - an update on recent advances in understanding and management. *F1000Res.* 2017; 6: 2069. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11948.1>
3. Jaillard S, Bell K, Akloul L, Walton K, McElreavy K, Stocker WA, et al. New insights into the genetic basis of premature ovarian insufficiency: Novel causative variants and candidate genes revealed by genomic sequencing. *Maturitas.* 2020; 141: 9-19. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2020.06.004>
4. European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) Guideline Group on POI, Webber L, Davies M, Anderson R, Bartlett J, Braat D, Cartwright B, et al. ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency. *Hum Reprod.* 2016; 31(5): 926-37 <https://doi.org/10.1093/humrep/dew027>
5. Den Dunnen et al. (2016) HGVS recommendations for the description of sequence variants: 2016 update. *Hum.Mutat.* 25: 37: 564-569. <https://doi.org/10.1002/humu.22981>

6. Heddar A, Dessen P, Flatters D, Misrahi M. Novel STAG3 mutations in a Caucasian family with primary ovarian insufficiency. *Mol Genet Genomics*. 2019; 294(6): 1527-1534. <https://doi.org/10.1007/s00438-019-01594-4>
7. Centro Nacional de Estadísticas de Salud en colaboración con el Centro Nacional para la Prevención de Enfermedades Crónicas y Promoción de Salud. Disponible en: <https://www.cdc.gov/growthcharts/data/spanishpdf97/co06l029.pdf>
8. Jaillard S, McElreavy K, Robevska G, Akloul L, Ghieh F, Sreenivasan R, et al. STAG3 homozygous missense variant causes primary ovarian insufficiency and male non-obstructive azoospermia. *Mol Hum Reprod*. 2020 Sep 1;26(9):665-677. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaaa050>
9. Chaloutsou K, Aggelidis P, Pampanos A, Theochari E, Michala L. Premature Ovarian Insufficiency: An Adolescent Series. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2017; 30(6): 615-619. <https://doi.org/10.1016/j.jpog.2017.04.003>
10. Bakalov VK, Anasti JN, Calis KA, Vanderhoof VH, Premkumar A, Chen S, et al. Autoimmune oophoritis as a mechanism of follicular dysfunction in women with 46,XX spontaneous premature ovarian failure. *Fertil Steril*. 2005; 84(4): 958-65. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.04.060>
11. Nelson LM. Clinical practice. Primary ovarian insufficiency. *N Engl J Med*. 2009; 360(6): 606-14. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp0808697>
12. Kalantaridou SN, Braddock DT, Patronas NJ, Nelson LM. Treatment of autoimmune premature ovarian failure. *Hum Reprod*. 1999 Jul; 14(7): 1777-82. <https://doi.org/10.1093/humrep/14.7.1777>
13. Tucker EJ, Grover SR, Bachelot A, Touraine P, Sinclair AH. Premature Ovarian Insufficiency: New Perspectives on Genetic Cause and Phenotypic Spectrum. *Endocr Rev*. 2016; 37(6): 609-635. <https://doi.org/10.1210/er.2016-1047>
14. Lasiri S, Basit S, Wood-Trageser MA, Yatsenko SA, Jeffries EP, Surti U, et al. Exome sequencing reveals MCM8 mutation underlies ovarian failure and chromosomal instability. *J Clin Invest*. 2015; 125(1): 258-62. <https://doi.org/10.1172/JCI78473>
15. Day FR, Ruth KS, Thompson DJ, Lunetta KL, Pervjakova N, Chasman DI, et al. Large-scale genomic analyses link reproductive aging to hypothalamic signaling, breast cancer susceptibility and BRCA1-mediated DNA repair. *Nat Genet*. 2015; 47(11): 1294-1303. <https://doi.org/10.1038/ng.3412>
16. OMIM Entry - # 615723 - Premature Ovarian Failure 8; POF8 [Internet]. [cited 2022 Mar 14]. Disponible en: <https://omim.org/entry/615723?search=STAG3&highlight=stag3>
17. Xiao WJ, He WB, Zhang YX, Meng LL, Lu GX, Lin G, et al. In-Frame Variants in STAG3 Gene Cause Premature Ovarian Insufficiency. *Front Genet*. 2019; 10: 1016. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01016>
18. Caburet S, Arboleda VA, Llano E, Overbeek PA, Barbero JL, Oka K, et al. Mutant cohesin in premature ovarian failure. *N Engl J Med*. 2014; 370(10): 943-949. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1309635>
19. Le Quesne Stabej P, Williams HJ, James C, Tekman M, Stanescu HC, Kleta R, et al. STAG3 truncating variant as the cause of primary ovarian insufficiency. *Eur J Hum Genet*. 2016 Jan; (1): 135-8. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.107>
20. Colombo R, Pontoglio A, Bini M. A STAG3 missense mutation in two sisters with primary ovarian insufficiency. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2017; 216: 269-271. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2017.08.005>
21. Colombo R, Pontoglio A, Bini M. A STAG3 missense mutation in two sisters with primary ovarian insufficiency. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2017; 216:269-271. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2017.08.005>
22. França MM, Nishi MY, Funari MFA, Lerario AM, Baracat EC, Hayashida SAY, et al. Two rare loss-of-function variants in the STAG3 gene leading to primary ovarian insufficiency. *Eur J Med Genet*. 2019 Mar;62(3):186-189. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2018.07.008>

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Susana Gómez-Rojas: adquisición de los datos e información; planeación del artículo, revisión de contenido intelectual, aprobación final de la versión enviada del artículo.

Jorge Enrique Aristizábal-Duque, MD: adquisición de los datos e información; planeación del artículo, revisión de contenido intelectual, aprobación final de la versión enviada del artículo.

Luisa Fernanda Muñoz-Fernández: adquisición de los datos e información; planeación del artículo, revisión de contenido intelectual, aprobación final de la versión enviada del artículo.

María Paula Sarmiento-Ramón: adquisición de los datos e información; planeación del artículo, revisión de contenido intelectual, aprobación final de la versión enviada del artículo.

María del Pilar Pereira-Gómez: adquisición de los datos e información; planeación del artículo, revisión de contenido intelectual, aprobación final de la versión enviada del artículo.

FINANCIACIÓN

Los autores no recibieron ninguna fuente de financiación.

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.