

Efecto del aceite de Krill sobre las convulsiones inducidas por hipertermia experimental en ratas neonatas

Dr. en C Leopoldo Eduardo Flores-Mancilla^{1*}, Dra en C. Laura Medina-Ceja²
Dr. en C. Alejandro Canales-Aguirre³, Dr en C. Alberto Morales Villagrán⁴

Resumen—Las convulsiones por fiebre ocurren en niños y pudieran provocar epilepsia, se han reportado beneficios del aceite de Krill, producto marino abundante en grasas omega-3, pero se desconoce el efecto sobre la hiperexcitabilidad neuronal temprana. **Objetivo**, evaluar el efecto del aceite de Krill (AK) sobre convulsiones inducidas por hipertermia experimental en ratas de 5 días de edad. El grupo Krill de crías cuyas madres consumieron dieta base (DB) más AK, se comparó con el grupo Palma crías cuyas madres consumieron DB más aceite de palma, y el grupo CTRL, crías cuyas madres consumieron DB más agua bidestilada. El grupo Krill mostró mayor resistencia a alta temperatura corporal, menos crisis mioclónicas, menores eventos y mayor latencia para la pérdida del control de la postura al comparar con los grupos Palma y CTRL ($p < 0.05$). **Conclusión**.-se sigue que el AK puede atenuar un proceso de hiperexcitabilidad temprana en el sistema nervioso central.

Palabras clave.-Convulsiones, fiebre, epilepsia, omega-3, krill, grasas

INTRODUCCIÓN

Se ha reportado que el trastorno epiléptico más común observado en los niños son las *Convulsiones febriles* o *Convulsiones por Fiebre* (CF) [1,2,3], la Liga Internacional Contra la Epilepsia las define como “una convulsión que ocurre entre el primer mes de vida y los cinco años de edad, no asociada a un estado de fiebre provocado por infección en el sistema nervioso central (SNC), sin convulsiones neonatales previas y sin diagnóstico previo de otras convulsiones sintomáticas” [4]. Se ha propuesto que esta alteración durante la infancia pudiera estar asociada en la vida adulta a la generación de esclerosis mesial y por lo tanto, estar ligada a la aparición de epilepsia del lóbulo temporal [5,6]. A la fecha no se ha determinado la etiología de las CF, por razones de ética no es posible investigar en los niños las posibles causas de esta alteración, por lo tanto se han desarrollado diversos modelos de experimentación en animales en los que se utiliza generalmente una fuente de calor externa, es decir, se genera una condición de hipertermia experimental en la que las convulsiones generadas se denominan “convulsiones por hipertermia” (CPH) [7,8]. En diversos estudios y mediante este método se han determinado factores que pudieran asociarse a las CPH, como por ejemplo; la hiperexcitabilidad de algunas regiones cerebrales activadas por citocinas endógenas como la interleucina-1 β (IL-1 β) [9], la alteración del pH en el tejido neuronal [10], alteraciones genéticas [11] específicamente de genes que codifican para la subunidad γ del receptor GABAérgico-B [12], no obstante y dada la importancia de un órgano vital como es el cerebro y bajo crecimiento y desarrollo acelerado, la alta temperatura en el sistema nervioso a edad temprana, altera múltiples mecanismos, por ejemplo, se ha observado alta termolabilidad de la enzima glutamato-decarboxilasa (GAD) la cual decarboxila el neurotransmisor excitatorio glutamato y lo transforma en el neurotransmisor inhibitorio ácido gama-aminobutírico, la inactivación de la GAD ocurre a temperaturas superiores a los 39°C en los primeros cinco días de vida en la rata [13]. En este contexto se ha reportado mayor resistencia a la inducción de fiebre por la inoculación de toxinas bacterianas a sujetos a los que previamente se les administró por vía i.v. aceite de pescado, producto marino con alto contenido de grasas poliinsaturadas omega-3 (0-3) [14].

¹ Dr. en C. Leopoldo Eduardo Flores-Mancilla es Docente-Investigador. Lab. de Neurofisiología y Conducta, U. Académica de Medicina Humana y CS. Universidad Autónoma de Zacatecas, México. (Autor correspondiente) *mansieduas@hotmail.com

² Dra en C Laura Medina Ceja es Docente-Investigador., Departamento de Biología Celular y Molecular, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara. lmolina@cucba.udg.mx

³ Dr. en C. Alejandro Arturo Canales Aguirre es Investigador. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), Av. Normalistas 800, Guadalajara, Jalisco, México. CP 44270. alexcanalex@gmail.com

⁴ Dr. en C. Alberto Morales Villagrán es Docente-Investigador., Departamento de Biología Celular y Molecular, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara. amorales@cucba.udg.mx

.Los aceites de origen marino como el aceite de pescado contienen altas cantidades de ácido docosaexanoico (DHA) y eicosapentanoico (EPA) grasas polinsaturadas de cadena larga denominadas omega-3 de las cuales se ha reportado que tienen actividad benéfica sobre el SNC [15]., en preparaciones *in vitro* se ha observado que la aplicación de DHA y EPA bloqueó la activación de los canales de Na⁺ inducida por la Batracotoxina al unirse directamente a las proteínas del canal [16]., Asimismo, en ratas, el DHA y EPA aplicados en forma sistémica incrementaron el umbral de disparo en neuronas cerebrales sobre estimuladas eléctricamente [17]. Por otro lado, en pacientes epilépticos, se ha observado reducción de los periodos de crisis convulsivas después de recibir un suplemento alimenticio abundante en θ -3 por seis meses [18]. En este contexto el aceite de Krill (AK) es otro producto alimenticio con alto contenido de θ -3 el cual se obtiene de crustáceos que habitan en el fondo de los océanos, su composición es en 40% por fosfolípidos (con mayor contenido de fosfatidilcolina), en un 30% por EPA y DHA, astaxantina, vitamina A, vitamina E, y un flavonide similar a 6,8-di-C-glucosil luteolina [19]. Estudios clínicos y experimentales en animales han mostrado que la forma estructural en la que se encuentran las moléculas de θ -3 (triglicéridos, etil-esteres, fosfolípidos) en los aceites de pescado o AK, tiene una relación significativa con la absorción de tales moléculas por el organismo, al respecto se ha reportado en ratas genéticamente obesas (cepa Zucker) que la suplementación con dosis equimolares de DHA y EPA en tratamientos con AK o con aceite de pescado, al tratamiento con AK se relacionó en mayor grado a mejoras de las alteraciones producidas por el Síndrome Metabólico, los resultados fueron asociados a mejor absorción [20]. En humanos se ha determinado una mayor proporción de los fosfolípidos con θ -3 en plasma con suplementación de AK que con suplementación de aceite de pescado, un hallazgo notorio en tal estudio es que el AK se suplementó a menor dosis (EPA 1050, DHA 630 mg) en comparación con el aceite de pescado (EPA 1080mg, DHA 672 mg) y las mayores concentraciones en el plasma se alcanzaron entre las 8-24 hrs después de 3 días de tratamiento [21], lo anterior muestra que se requeriría menor cantidad de AK que de aceite de pescado para alcanzar mayores concentraciones de θ -3 en el plasma. Por otro lado, existen evidencias que proponen un mejor efecto del AK que del aceite de pescado, por ejemplo, se ha reportado en ratones la probabilidad de mantener activo el perfil transcripcional de genes relacionados con mejoría sobre el metabolismo de glucosa, niveles de colesterol e incremento de la respiración mitocondrial (procesos opuestos a la disregulación metabólica observada en los pacientes obesos y con diabetes tipo 2), efectos asociados a la suplementación de una dieta con AK que adicionada con aceite de pescado [22]. Por lo que se refiere al efecto del AK sobre el SNC, a la fecha y en nuestro conocimiento, no hay suficientes estudios sobre la funcionalidad neuronal o trastornos de la misma y el efecto de la suplementación con AK, por ejemplo; se ha observado que 1 g de AK administrado por un periodo de doce semanas mejoró el desempeño cognitivo en sujetos adultos mayores, además de una mayor concentración de oxihemoglobina, factores asociados a una menor latencia para la detección de la onda P300 en el registro de potenciales cerebrales relacionados a eventos, el estudio concluye que bajo la suplementación de AK, pudiera existir mayor activación de los circuitos neuronales implicados en la memoria. A la fecha se desconoce el efecto que pudiera tener la suplementación temprana de AK sobre un proceso de hiperexcitabilidad neuronal como las convulsiones por hipertermia en un modelo de ratas recién nacidas. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del AK sobre el patrón de convulsiones inducidas por hipertermia experimental en ratas neonatas de 5 días de edad, cuyas madres recibieron el suplemento AK más la dieta comercial durante la gestación y parte de la lactancia,.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Enfoque experimental, prospectivo, factorial, en el estudio la variable independiente fue el tratamiento y las variables dependientes fueron la evaluación de la temperatura corporal bajo el periodo de hipertermia, y los parámetros conductuales: **1.**-Número total de mioclonos **2.**-Número total de eventos de marcha **3.**-Número total de eventos de descanso.- **4.**- Número total de movimientos de la cola. **5.**- Número total de eventos de pérdida de la postura **6.**- Latencia de aparición de la pérdida en el control de la postura.

Los resultados fueron evaluados estadísticamente mediante un análisis de varianza de uno y dos factores, las diferencias entre grupos se analizaron mediante la prueba de Tukey, se consideró una $p < 0.05$. El cuidado de los animales así como todos los procedimientos en los que participaron, fueron sometidos a la aprobación por el Comité Local de Ética del Área de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Zacatecas, institución que sigue los lineamientos descritos en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Animales y dietas

Veinticuatro ratas hembras de la cepa Wistar con peso entre 45-50 g ó 45 días de edad, fueron divididas en tres grupos: El grupo (KRILL) constituido por 6 hembras, que fueron alimentadas *ad libitum* con una dieta comercial (Rodent Chow-5001 Ralton-Purina Co., USA), y adicionalmente se les administró diariamente, por vía intragástrica,

un suplemento de aceite de krill (Neptune Krill Oil ®Canada) a dosis de 300 mg/kg de peso. El grupo (PALMA) constituido por 6 hembras, que fueron alimentadas *ad libitum* con una dieta comercial (Chow-5001 Ralton-Purina Co., USA), y diariamente se les suplemento por vía intragástrica aceite de palma (*Spectrum Chem. MFG Corp,®USA*) a una dosis de 300 mg/kg de peso. El grupo control (CTRL) constituido por 6 hembras, las cuales fueron alimentadas *ad libitum* con una dieta comercial (Chow-5001 Ralton-Purina Co., USA), y diariamente se les suplemento por vía intragástrica, 300 µl de agua bidestilada. Las hembras de los tres grupos iniciaron sus respectivos tratamientos a partir de los 45 días de edad y se conservaron en este tratamiento durante el apareamiento, gestación y etapa de lactancia. Cuando las hembras de los tres grupos alcanzaron los 135 días de edad, se colocaron en apareamiento programado con machos de la misma cepa con un peso entre 350-400 g. Al día siguiente se confirmó la presencia de espermatozoides y la formación de tapón vaginal, ese día se consideró como el día 1° de gestación. El primer día después del nacimiento, cada camada se ajustó a un número de 10 crías, conservando el mayor número de machos posible. A los 5 días de edad, 15 crías macho fueron seleccionadas aleatoriamente de cada uno de los diferentes grupos (cuyas madres recibieron desde antes de la gestación el tratamiento con aceite de Krill, de palma o agua bidestilada) las crías fueron expuestas durante 30 minutos bajo un método experimental de hipertermia Baram et al. [26].

RESULTADOS

No se encontraron diferencias significativas al comparar los pesos registrados en las madres de los sujetos experimentales de los diferentes grupos, desde el día que iniciaron el tratamiento (45 días de edad) hasta los días previos al apareamiento. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos en cuanto al consumo promedio diario de alimento.

Temperatura corporal durante la Hipertermia

Los datos de la temperatura rectal registrada en cada uno de los sujetos de los diferentes grupos durante los 30 minutos que duró el proceso de hipertermia, no mostraron diferencias significativas durante los cuatro minutos iniciales del experimento [(2,45) $f= 0.74$] $p=0.51487$, sin embargo, a partir del minuto cuatro, el grupo CTRL mostró valores de temperatura corporal significativamente menores [(2,45) $f= 6.85$] $p<0.01$ en comparación con los grupos PALMA y KRILL; esta diferencia estadísticamente significativa se mantuvo hasta el minuto 20 [F (14,44) = 5,95] $p<0.01$, sin embargo a partir del minuto 26 Los sujetos del grupo KRILL registraron significativamente menor temperatura corporal al comparar con los grupos PALMA y CONTROL que registraron temperaturas superiores a los 40 ° C (Figura 1).

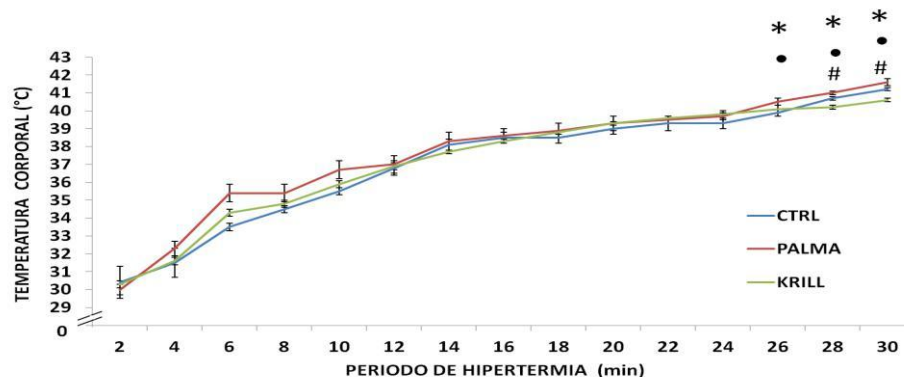


Figura 1. media \pm ES de los valores de temperatura en los diferentes grupos durante la exposición a hipertermia.

* $p<0.05$, Palma, Krill vs CTRL, • $p<0.05$, Palma vs Krill, CTRL, # $P<0.05$, Krill vs CTRL, Palma.

Resultados conductuales

Al realizar el conteo total de mioclonos presentadas por cada sujeto en cada uno de los diferentes grupos, se encontró que las crías del grupo KRILL experimentaron significativamente menor número de mioclonos al ser comparadas con el grupo CTRL (F(14,2)=1.30), $p<0.05$) (figura 2).

En cuanto a los eventos de marcha, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos [F(14,2) =1.45, $p= 0,1965$]. Respecto a los eventos de descanso durante la hipertermia, se observó que el grupo KRILL y el grupo CONTROL registraron menor número de descansos que el grupo SAPA, sin embargo estadísticamente no hubo diferencias entre los tres grupos [F(2,45) = 2.15, $p <0.05$] (figura 3).

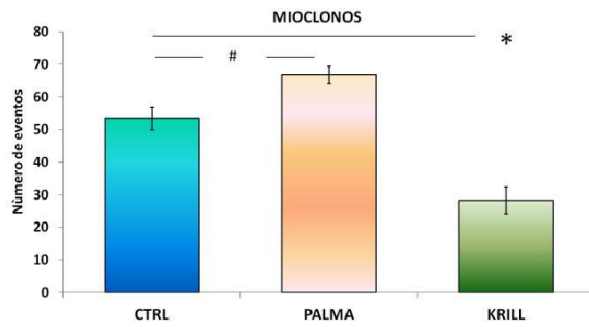


Fig. 2 Media ± ES de la cantidad de mioclonos registrados en los tres grupos durante el proceso de hipertermia .
* P<0.05 KRILL vs PALMA, CTRL, # P<0.05 CTRL vs PALMA (n=15 x grupo)

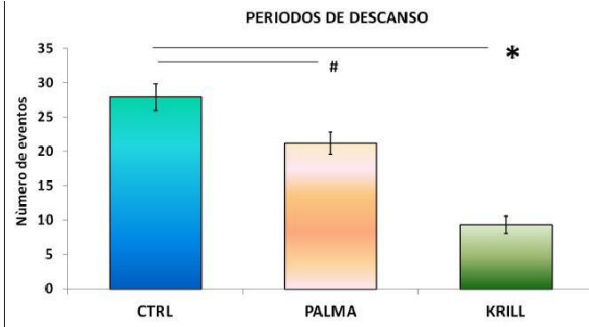


Fig. 3 Media ± ES del número de periodos de descanso registrados en los tres grupos durante el proceso de hipertermia .
* P<0.05 KRILL vs PALMA, CTRL, # P<0.05 CTRL vs PALMA (n=15 x grupo)

En cuanto al movimiento intermitente o de latiguelo de la cola, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (figura.4). Con respecto al parámetro de pérdida de postura se encontró que el grupo Krill mostró significativamente un menor número de pérdidas de postura. [F (14,2)= 0.86, p< 0.01] (figura.5).

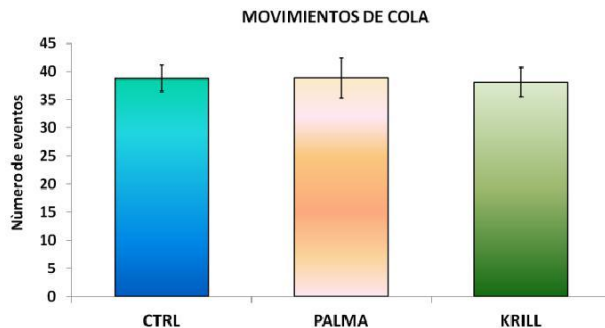


Fig. 4 Media ± ES del número de movimientos de cola registrados en los tres grupos durante el proceso de hipertermia . (n=15xgrupo)

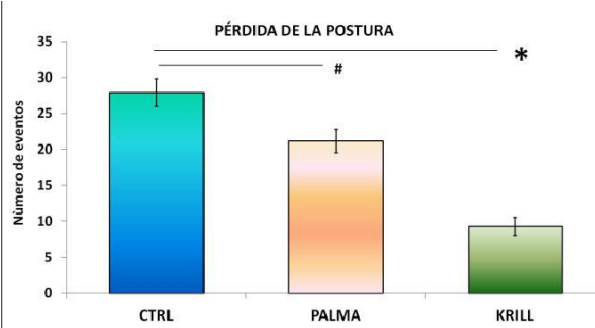


Fig. 5 Media ± ES del número de pérdidas de la postura registrados en los tres grupos durante el proceso de hipertermia .
* P<0.05 KRILL vs PALMA, CTRL, # P<0.05 CTRL vs PALMA (n=15 x grupo)

Con

respecto a la latencia para la presentación de la pérdida de postura se encontraron diferencias significativas entre los grupos, las pruebas a posteriori indicaron que el grupo palma presentó significativamente menor latencia en comparación con el grupo Palma y el grupo Krill [F(14,2)=0.40, p<0.05]. (figura.6).

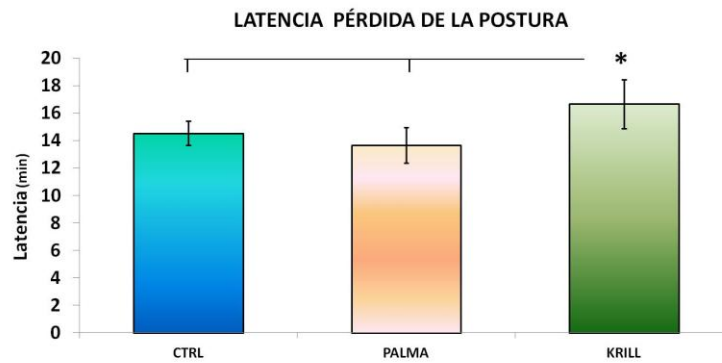


Fig. 6 Media ± ES del tiempo que tardaron cada uno de los tres grupos en perder el control de la postura .
* P<0.05 KRILL vs PALMA, CTRL (n=15 x grupo)

COMENTARIOS FINALES

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del aceite de krill (AK) sobre un modelo de convulsiones por hipertermia experimental. Los resultados muestran que la suplementación de AK desde la etapa fetal a través de la madre, indujo en las crías mayor resistencia al incremento de la temperatura corporal (incremento superior a los 39°), menor severidad a un proceso convulsivo manifestado por menor número de mioclonos, pérdidas del control de la postura y mayor latencia para presentar dicha condición. El efecto benéfico del AK se ha asociado a un efecto neuroprotector de lo omega-3 y de estas moléculas grasas se ha explorado su acción sobre receptores y canales de la membrana neuronal [16], por otro lado se ha determinado mayor expresión de genes activadores de la síntesis de neurotrofinas como el Bdnf (Brain derived neurotrophic factor) bajo un tratamiento diario de 200mg de AK durante 7 semanas en ratas, tal efecto al parecer mejoró el proceso de aprendizaje y correlacionó con disminución de un estado depresivo [24]. En nuestro conocimiento el presente estudio es el primero en evaluar el efecto del AK sobre convulsiones inducidas por elevada temperatura corporal, lo observado en los animales de los tres grupos sugiere que el proceso de hipertermia en estas ratas neonatas, indujo cambios drásticos en su tejido cerebral, por un lado es posible que los omega 3 contenidos en el AK atenuaron el proceso de excitabilidad neuronal disminuyendo las descargas provocadas por exceso de despolarización (al inhibirse la glutamatodescarboxilasa por el efecto de la temperatura se impidió la descarboxilación del neurotransmisor excitatorio glutamato para que se convirtiera en el neurotransmisor inhibitorio ácido gama.aminobutírico (GABA)) [13] y en consecuencia se presentaron las manifestaciones de convulsión, sin embargo los animales suplementados con AK mostraron atenuación en los parámetros evaluados, una posible explicación pudiera ser que la astaxantina contenida en el AK, indujera efectos antioxidantes y antiinflamatorios, al respecto se ha mostrado en células gliales que la molécula astaxantina mostró efectos inhibitorios en la sobre-regulación de IL-6, la excesiva producción de IL-6 por la microglía se ha asociado a trastornos neurológicos [25] por lo tanto en el presente estudio se concluye que es probable que la combinación de omega-3 –astaxantina contenida en el AK, pudo estar asociada a la menor severidad de las manifestaciones de convulsión pero también a la resistencia a elevación de la temperatura corporal superior a los 39 °C observada solamente en los animales del grupo K, por lo tanto se sugiere un efecto atenuador del AK sobre la hiperexcitabilidad neuronal. Es necesario realizar estudios adicionales en animales de laboratorio para determinar con parámetros electrofisiológicos, bioquímicos e histológicos cuales son los mecanismos por los cuales el AK atenúa un proceso convulsivo inducido por elevación de la temperatura corporal y de esta forma con mayor sustento científico proponer un posible tratamiento para los niños afectados por convulsiones febriles.

REFERENCIAS

1. Jones T., Jacobsen S. J. (2007). Childhood Febrile Seizures: Overview and Implications. *I. J. Med. Sci.* 4 (2): 110-114.
2. Patterson J. L., Carapetian S. A., Hageman J. R., & Kelley K. R. (2013). Febrile seizures. *Pediatr Ann*, 42(12), 249-254.
3. Veisani Y., Delpisheh A., & Sayehmiri K. (2013). Familial History and Recurrence of Febrile Seizures; a Systematic Review and Meta-Analysis. *Iran J Pediatr*, 23(4), 389-395.
4. SCQIMSFS (2008). Steering Committee on Quality Improvement and Management, Subcommittee on Febrile Seizures. *Pediatrics*, 121:1281-1286.
5. Mohebbi MR, Navipour R, SevedKazemi M, Zamanian H, Khamseh F. (2004). Adult-onset epilepsy and history of childhood febrile seizures: a retrospective study. *Neurol Ind* 52(4), 463-465.
6. Moreno de Flagege, N. (2013). [Simple febrile seizure, complex seizure, generalized epilepsy with febrile seizure plus, FIRES and new syndromes]. *Medicina (B Aires)*, 73 Suppl 1, 63-70.
7. Zhou JP, Wang F, Li RL, Yuan BL, Guo YL. (2004). Effects of febrile seizures on motor, behavior, spatial learning and memory in rats. *Zhonghua Er Ke Za Zhi. Epilepsy and Behavior*; 42(1):49-53.
8. Dube C., Chen K., Ahmadi E. M., Brunson Ch., Soltesz I., Baram T. Z. (2000). Prolonged febrile seizures in the immature rat model enhance hippocampal excitability long-term. *Ann. Neurol.* 47: 336-344
9. Heida JG, Boiss'e L, and Pittman QJ. (2004). "Lipopolysaccharide-induced Febrile Convulsions in the rat: short-term sequelae," *Epilepsia*, vol. 45, no. 11, pp. 1317-1329.
10. Schuchmann S., Tolner E.A., Marshall P, Vanhatalo S, Kaila K. (2008) Pronounced increase in breathing rate in the "hair dryer model" of experimental febrile seizures. *Epilepsia*, 49(5):926-928.
11. Kasperaviciute D., Catarino C. B., Matarin M., Leu C., Novy J., Tostevin A., Sisodiya S.M. (2013). Epilepsy, hippocampal sclerosis and febrile seizures linked by common genetic variation around SCN1A. *Brain*, 136(Pt 10), 3140-3150.
12. Han Y., Qin J., Chang X., Yang Z., Bu D., Du J. (2005) Modulating effect of hydrogen sulfide on gamma-aminobutyric acid B receptor in recurrent febrile seizures in rats. *Neurosci Res* 53 216-219
13. Arias C., Tapia R. (1992). Inhibition of Glutamate Decarboxylase Activity is related to Febrile Seizures in Rat Pups. *J. Neurochem.* 45: 369-373.
14. Pluess T. T., Hayoz D., Berger M. M., Tappy L., Revelly P. Y., Michale B., Carpentier I., Chioléro R. (2007). Intravenous fish oil blunts the physiological response to endotoxin in healthy subjects. *Intensive Care Med.* 33: 789-797.
15. Lauritzen I., Blondeau N., Heurteaux C., Widmann C., Romey G., Lazdunski M. (2000). Polyunsaturated Fatty Acids are potent neuroprotectors. *J. EMBO*17(19B): 1784-1793.

16. Kang X. J., Leaf A. (1996). Evidence that free polyunsaturated fatty acids modifies Na⁺ channels by directly binding to the channel protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 3542-3546.
17. Voskuyl R. A., Vreugdenhil M., Kang J. X., Leaf A. (1998). Anticonvulsant effect of polyunsaturated fatty acids in rats, using cortical stimulation model. *E. J Pharmacol.* **341**: 145-152.
18. Schlanger S., Shinitzky M., Yam D., (2002) Diet enriched with Omega-3 acids alleviates convulsion symptoms in epilepsy patients. *Epilepsia*,**43**: 103-104
19. Tou JC, Jaczynski J, Chen YC. Krill for human consumption: nutritional value and potential health benefits. *Nutr Rev* 2007;65(2):63-7.
20. Batetta B, Griinari M, Carta G, Murru E, Ligresti A, *et al* Endocannabinoids may mediate the ability of (n-3) fatty acids to reduce ectopic fat and inflammatory mediators in obese Zucker rats. *J Nutr* 2009;139(8):1495-501.
21. Schuchardt JP, Schneider I, Meyer H, Neubronner J, von Schacky C, Hahn A. Incorporation of EPA and DHA into plasma phospholipids in response to different omega-3 fatty acid formulations--a comparative bioavailability study of fish oil vs. krill oil. *Lipids Health Dis* 2011;10:145.
22. Burri L, Berge K, Wibrand K, Berge RK, Barger JL. Differential effects of krill oil and fish oil on the hepatic transcriptome in mice. *Front Genet* 2011;2:45.
23. Konagai C, Yanagimoto K, Hayamizu K, Han L, Tsuji T, Koga Y. Effects of krill oil containing n-3 polyunsaturated fatty acids in phospholipid form on human brain function: a randomized controlled trial in healthy elderly volunteers. *Clin Interv Aging* 2013;8:1247-57.
24. Wibrand K, Berge K, Messaoudi M, Duffaud A, Panja D, *et al*. Enhanced cognitive function and antidepressant-like effects after krill oil supplementation in rats. *Lipids Health Dis* 2013;12:6.
25. Kim YH, Hyung-Kon Kohb, Doo-Sik Kim. Down-regulation of IL-6 production by astaxanthin via ERK-, MSK-, and NF-κB-mediated signals in activated microglia. *International Immunopharmacol* 2010;10:1560-1572.
26. Baram T. Z., Gorth T. A., Schultz L. (1997). Febrile seizures: an appropriate-aged model suitable for long-term studies. *Dev. Brain. Res.* **98**: 265-270.

