



**SUPERFICIES ANTIBACTERIANAS PARA
CATÉTERES.
POLÍMEROS RAMIFICADOS E HIDROGELES.**

CLARA ESCRIBANO GARCÍA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA
TRABAJO DE FIN DE GRADO



SUPERFICIES ANTIBACTERIANAS PARA CATÉTERES. POLÍMEROS RAMIFICADOS E HIDROGELES.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA Y FARMACÉUTICA

GRADO EN FARMACIA

Alumna: Clara Escribano García

Sevilla, Septiembre de 2021

Facultad de Farmacia

RESUMEN

La capacidad de las bacterias para adherirse a los biomateriales y promover la formación de biopelículas sobre su superficie es un reto continuo en el uso de implantes médicos permanentes, al provocar la degradación del dispositivo y/o infecciones sistémicas, convirtiéndose en una de las primeras causas de mortalidad en el mundo. Entre los dispositivos médicos, los catéteres son los más ampliamente utilizados en los hospitales, siendo responsables de más del 75% de las infecciones adquiridas en el hospital.

Las biopelículas son comunidades microbianas, incrustadas en una matriz protectora extracelular de naturaleza patógena y que causan infecciones nosocomiales. Los microorganismos que se encuentran en las biopelículas son difíciles de controlar con antibióticos convencionales o con las respuestas inmunitarias del huésped como consecuencia de los mecanismos de resistencia intrínsecos y adquiridos. Como resultado, la extracción quirúrgica de los dispositivos implantados es a menudo el único tratamiento para erradicar la infección. Por tanto, es muy importante dotar a las superficies de propiedades antibacterianas.

El recubrimiento del dispositivo biomédico con agentes antimicrobianos tradicionales se utiliza como estrategia alternativa para prevenir la adhesión y acumulación de bacterias en la superficie de las biopelículas. Sin embargo, estas superficies de función única no pueden lograr una eficacia a largo plazo contra las bacterias. Al ser insuficiente, se ha propuesto una táctica prometedora con una doble función, conferir a las superficies propiedades tanto de resistencia como de destrucción de bacterias, con el objetivo de reducir el número y la viabilidad de los microorganismos adheridos, al mismo tiempo. Este trabajo se centra en una de ellas, el empleo de polímeros ramificados e hidrogeles como sistemas de liberación en catéteres vasculares y urinarios. A diferencia de las técnicas anteriores, ésta es una estrategia más estable, eficaz que garantiza una liberación del fármaco prolongado en el tiempo.

Palabras clave: catéter, biopelícula o biofilm, revestimiento de polímero, revestimiento de hidrogel, superficie antibacteriana.

INDICE

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN	5
2. OBJETIVOS	8
2.1. Objetivo general	8
2.2. Objetivos específicos	8
3. METODOLOGÍA	9
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
4.1. ESTRATEGIAS ANTIBACTERIANAS	11
4.1.1. Recubrimiento antimicrobiano	13
4.1.2. Modificación química de la superficie	14
4.1.2.1. Polímeros ramificados	14
4.1.2.2. Hidrogeles	15
4.2. RECUBRIMIENTO EN CEPILLO DE POLÍMERO	16
4.3. RECUBRIMIENTO DE HIDROGEL	25
5. CONCLUSIÓN	28
6. BIBLIOGRAFÍA	30
7. ABREVIATURAS	35

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones nosocomiales son aquellas que el paciente adquiere como consecuencia de un ingreso hospitalario o debidas a la atención médica en cualquier centro de salud (IRAS), aunque también se consideran aquellas infecciones que se manifiestan una vez recibida el alta hospitalaria (Ducel et al., 2008). Generalmente las infecciones nosocomiales son originadas por patógenos resistentes a múltiples fármacos adquiridos mediante procedimientos invasivos, el uso excesivo o inadecuado de antibióticos o por no seguir los procedimientos de control y prevención de infecciones.

En la actualidad, la cirugía y los procedimientos invasivos, los dispositivos médicos permanentes, así como los protésicos, están asociados con estas infecciones. Según la Red Nacional de Seguridad Sanitaria junto con el Centro para el Control de Enfermedades (CDC), existen trece tipos de infecciones nosocomiales y cincuenta áreas de infección diferentes, según el criterio biológico y clínico (Khan et al., 2015). De acuerdo con el Estudio de Prevalencia de las Infecciones Nosocomiales en España (EPINE) realizado en 2019, las infecciones relacionadas con la asistencia médica más comunes son las quirúrgicas, las respiratorias, las urinarias y las bacteriemias entre otras cómo podemos ver en la gráfica 1.



Gráfica 1. Porcentaje de prevalencia de las infecciones relacionada con la asistencia médica (IRAS).

En este trabajo nos vamos a centrar en las infecciones nosocomiales relacionadas con catéteres (IRC), en concreto en infecciones del catéter asociado al torrente sanguíneo (CRBSI) y al catéter del tracto urinario (CAUTI) (Liu et al., 2020) ya que son las complicaciones clínicas más frecuentes. Un catéter es uno de los dispositivos médico

que se implementa con más frecuencia; se introduce dentro de un tejido o vena y permite la administración de fármacos, el drenaje de líquidos o facilita el paso de otros instrumentos médico, optimizando la calidad de la atención sanitaria en la prevención, el tratamiento y el alivio de enfermedades. Sin embargo su uso predispone a la infección y proporciona las condiciones ideales para la formación de biopelículas bacterianas.

Las CRBSI se producen por una infección en los catéteres intravasculares (figura 1), los cuales tienen varias aplicaciones: control hemodinámico, terapia de reemplazo renal, apoyo nutricional o administración de medicamentos. El principal agente causal es *Staphylococcus aureus* (Liu et al., 2019).

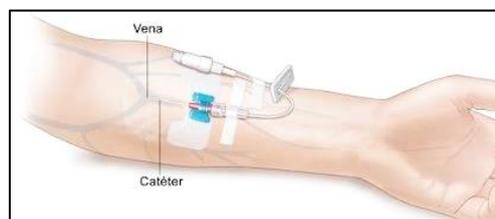


Figura 1. Tipo de catéter intravenoso.

Las CAUTIS se producen por una infección en los catéteres urinario (figura 2). Estos dispositivos se insertan en la uretra (Cortese et al., 2018) del paciente para tratar la incontinencia y la retención urinaria o para después de algún proceso quirúrgico relacionado con la próstata o los genitales. Las bacterias responsables suelen ser ureasa positiva como *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* o *Proteus vulgaris* (Singha et al., 2017).

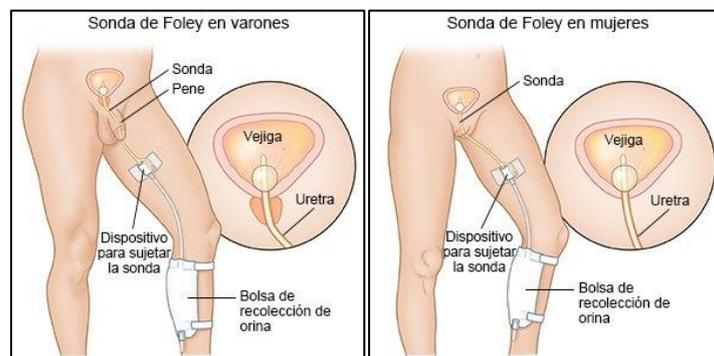


Figura 2. Tipo de catéter urinario masculino y femenino.

Estas infecciones hospitalarias asociadas a superficies médicas tienen su origen, generalmente, por la formación de una biopelícula o biofilm (figura 3). Las bacterias

localizan una superficie inerte y se adhieren a ella de forma reversible empleando interacciones débiles como fuerzas de Van der Waals, fuerzas electrostáticas, enlaces de hidrógeno, dipolo-dipolo e interacciones hidrofóbicas (Singh, Dubey, 2018). La adhesión bacteriana al principio es reversible, pero a medida que las células se van multiplicando y van formando agregados, secretan sustancias poliméricas extracelulares (EPS) y es en éste momento cuando el proceso se vuelve irreversible (Neoh et al., 2017). Posteriormente la biopelícula se vuelve espesa (hasta 50 μm) y madura. En la última etapa se produce la disolución focal, liberándose células bacterianas, que luego pueden extenderse a otros lugares donde se pueden formar nuevas biopelículas.



Figura 3. Etapas de desarrollo involucradas en la formación de biopelículas bacterianas.

La creación de biopelículas en los dispositivos médicos es un efecto indeseable, debido a los inconvenientes que produce en su uso y aplicación (Adlington et al., 2016). Las biopelículas pueden estar formada por varias especies microbianas o por una sola especie. Clásicamente, la infección en relación a los catéteres, es una infección monomicrobiana y son objetivo de numerosos estudios (Srinivasan et al., 2021).

Los patógenos nosocomiales son muy variados. Las bacterias son responsables del 95% de estas infecciones, pero también las pueden causar hongos, protozoos, virus o micobacterias (Khan et al., 2015). Las bacterias más comunes son las multirresistentes

tipo Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* resistente a la meticilina y *Enterococcus* resistentes a la vancomicina, pero también bacterias Gram negativas como *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* o *Salmonella paratyphi*.

El aumento de las infecciones de este tipo tiene unas consecuencias socioeconómicas importantes a destacar como, el prolongar el tiempo de estancia en el hospital hasta 20 días, discapacidad a largo plazo, aumentar el coste económico tanto para el sistema sanitario como para el propio paciente, la morbilidad y mortalidad (Liu et al., 2019), así como un aumento de las resistencias bacterianas (Jiménez-Alcaide et al., 2015). La Sociedad Española de Medicina Preventiva Salud Pública e Higiene (SEMPSPH) en el año 2018, llevó a cabo en España un estudio epidemiológico transversal de prevalencia de las infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria (EPINE) en donde puso de manifiesto, como al menos, un 8% de los pacientes que estaban ingresados en un hospital presentaban al menos una IRAS.

Para intentar frenar éstas infecciones tan comunes e importantes y que suponen un riesgo para las personas que llevan un dispositivo médico de este tipo, se ha investigado y desarrollado diferentes estrategias antibacterianas, entre las que cabe destacar la modificación química superficial, y que se va a desglosar a lo largo de este trabajo. Estas estrategias se basan en utilizar polímeros ramificados o hidrogeles biocompatibles como soporte de los principios antimicrobianos garantizando una liberación prolongada del fármaco y una eficacia a largo plazo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Compendiar las estrategias que se utilizan para prevenir el crecimiento de microorganismos sobre las superficies de los dispositivos médicos como catéteres y así disminuir el riesgo a sufrir una infección bacteriana.

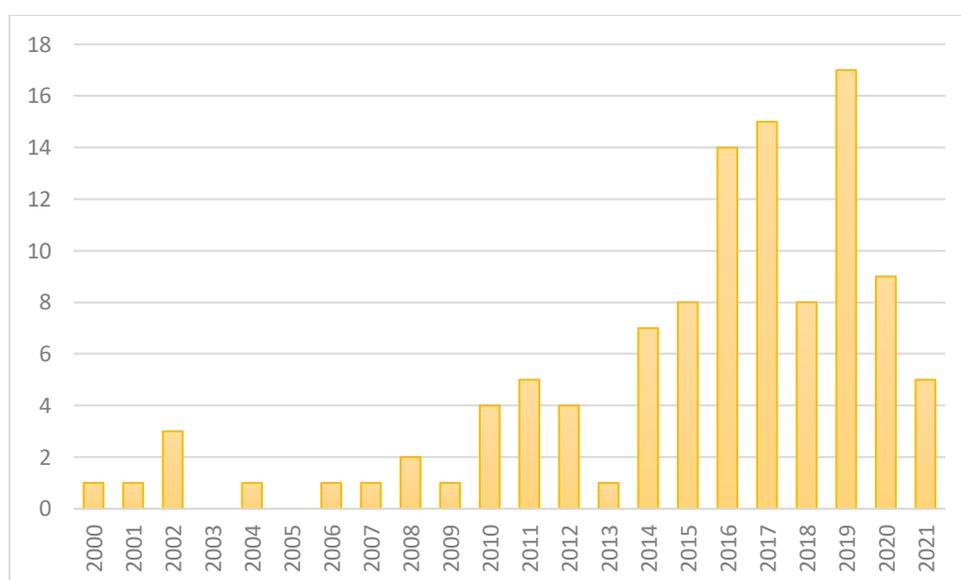
2.2. Objetivos específicos

- Clasificar las estrategias según su mecanismo de acción.

- Revisar el empleo de los polímeros ramificados e hidrogeles.

3. METODOLOGIA

Para elaborar esta memoria se han utilizado fuentes bibliográficas primarias, tanto artículos científicos originales como revisiones, publicadas principalmente en los últimos 10 años (gráfica 2); como fuentes bibliográficas secundarias, la mayoría de ellos en inglés. También se han visitado artículos web de páginas oficiales como la OMS, entre otras, como documentos de apoyo.



Gráfica 2. Evolución del tema de investigación a lo largo del tiempo.

Para realizar la gráfica anterior y ver la evolución del tema a tratar en los últimos 20 años se ha utilizado como base de datos “Web of Science” con la combinación de tres palabras claves en éste trabajo: “catheter”, “biofilm” y “polymer coatings”.

Cómo podemos observar, el número de artículos sobre este tema en concreto desde el año 2000 hasta el año 2010 se encuentra entre 0 y 4 artículos máximo al año. A partir del año 2010 ha ido aumentando gradualmente hasta publicar 17 artículos en el año 2019. Esto lo podemos traducir en que el interés sobre la formación de biopelículas en las superficies de catéteres y la búsqueda de distintas alternativas para encontrar una solución adecuada va teniendo más repercusión social y por ello es objetivo de numerosos estudios, de ahí su importancia actual a nivel farmacéutico. Los descriptores y combinaciones de ellos que se han utilizado son: “catheter”, “biofilm”, “antibacterial”,

“polymer coatings”, “hydrogel coatings”, “antimicrobial catheter coating”, “polymer”, “hydrogel”, “nosocomial infections”.

Las bases de datos que se han consultado para buscar los artículos más relacionados con el tema a tratar ha sido PubMed, Web of Science, MEDES, Google Scholar y ScienceDirect entre otros (tabla 1).

Bases de datos	Nº de artículos originales	Nº de artículos de revisión	Nº Total artículos
PubMed	1	8	9
MEDES	1	-	1
Web of Science	1	4	5
Google Académico	1	8	9
Science Direct	1	-	1
Scopus	2	1	3
Artículos Web	4	-	4
Total	11	21	32

Tabla 1. Tipos de artículos empleados en la elaboración de este TFG.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Debido a la creciente incidencia de enfermedades cardiovasculares y urológicas, informes recientes (Maximize Market Research, 2019) indican una demanda creciente de procedimientos quirúrgicos mínimamente invasivos que utilizan catéteres. Sin embargo los dispositivos médicos insertados en el cuerpo proporcionan una ruta para la migración bacteriana, así como superficies propicias para su fijación y proliferación. La búsqueda de nuevas estrategias antimicrobianas eficaces para evitar o disminuir las infecciones nosocomiales asociadas a estos dispositivos médicos es por tanto un desafío creciente en los últimos años. Estas infecciones suponen un riesgo para los pacientes ya que introducen riesgos de infecciones locales y sistémicas, además de originar

complicaciones en el uso normal del catéter. Por otro lado, suponen un incremento del gasto público en sanidad, más tiempo de ingreso hospitalario y un aumento de la morbilidad y mortalidad (Sharma et al., 2019). Las principales infecciones asociadas a catéteres son las infecciones del catéter asociado al torrente sanguíneo (CRBSI) y las infecciones del tracto urinario asociadas al catéter (CAUTI).

Una complicación importante añadida en los catéteres uretrales permanentes, es el bloqueo funcional de éstos debido a que las bacterias provocan la formación de incrustaciones microcristalinas. Los organismos que colonizan el catéter generan amoniaco a partir de urea, elevando así el pH de la orina. A medida que aumenta el pH, se precipitan cristales de fosfato de calcio y magnesio (Stickler, 2014). Mediante el empleo de la microscopía electrónica de barrido, se puede saber si son bacilos o cocos los responsables de la formación de estos cristales (Figura 4). Estos depósitos cristalinos pueden desarrollar enfermedades graves como pielonefritis o septicemias (Liu et al., 2020)

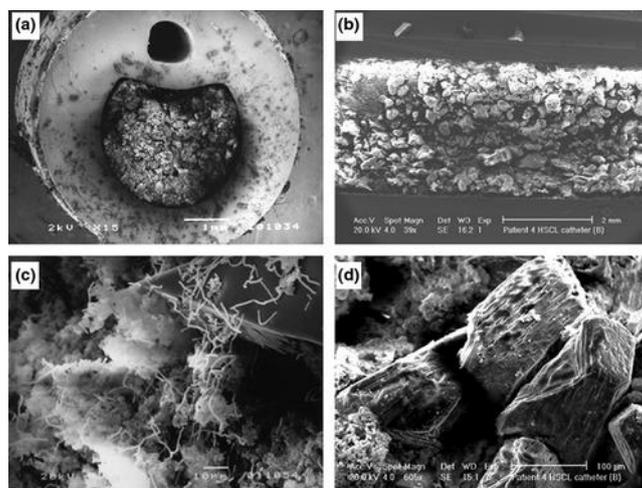


Figura 4. Micrografías electrónicas de barrido. Imagen a: muestra de un catéter de silicona extraído 8 días después. Imagen b: muestra de un catéter de látex retirado 11 días después. Imagen c y d: presencia de cristales y bacilos en un catéter.

4.1. ESTRATEGIAS ANTIBACTERIANAS

Para evitar infecciones recurrentes y complicaciones relacionada con los catéteres, lo más sencillo sería reemplazarlo, sin embargo esto supondría un malestar en el paciente y además de un fracaso. A día de hoy, ninguna terapia con antibióticos garantiza la

destrucción rápida y completa del biofilm o prevenir la recurrencia de la infección. Por este motivo se dedica tanto tiempo a estudiar y desarrollar alternativas para que estas infecciones no se produzcan y así mejorar la calidad de vida del paciente. La prevención de la formación de biopelículas es la mejor estrategia de impedir tanto la propagación de patógenos como el deterioro del implante. Una forma eficaz de reducir la aparición de infecciones es impidiendo la unión y colonización bacteriana mediante la modificación de la superficie de los dispositivos implantados. Es un método relativamente sencillo que permite modificar las propiedades interfaciales de los dispositivos médicos sin alterar las propiedades generales de los materiales.

Los tratamientos superficiales se dividen en dos categorías: recubrimiento antimicrobiano y modificación química superficial.

Los antiincrustantes no matan directamente a los microorganismos, sino que evitan la adhesión y la formación de biopelículas (figura 6) (Singha et al., 2017). Por otro lado, los materiales biocidas para catéteres están diseñados para matar los microbios en lugar de minimizar su deposición. Tanto los materiales antimicrobianos como los antiincrustantes son el punto focal de la investigación en materiales para estos dispositivos médicos.

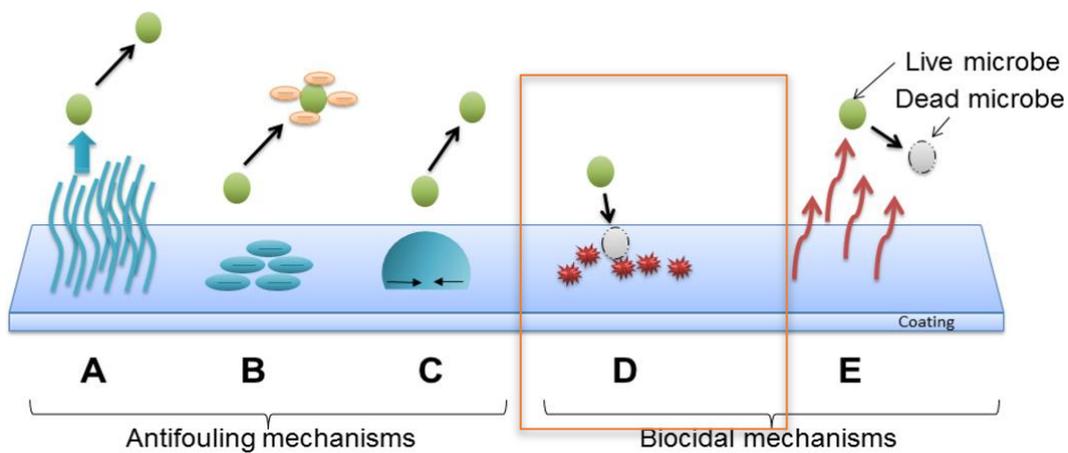


Figura 6. Mecanismos antimicrobianos. (A) exclusión por repulsión estérica. (B) repulsión electrostática. (C) energía superficial baja. (D) liberación de biocidas. (E) activo por contacto.

4.1.1. Recubrimiento antimicrobiano.

La técnica más sencilla es recubrir la superficie del catéter con agentes antimicrobianos mediante impregnación directa y / o deposición de agentes antibacterianos sobre los catéteres (figura 5) formándose así una capa adicional en la superficie, que permite eliminar las bacterias por contacto directo (Adlington et al., 2016). De los agentes antimicrobianos utilizados se puede destacar la cefazolina, minociclina, rifampicina, clorhexidina, sulfadiazina de plata (Liu et al., 2019), nitrofurazona, tensioactivos activos de amonio cuaternario o péptidos (Hook et al., 2012). Normalmente los catéteres se hinchan cuando se sumergen en la solución del fármaco. A continuación, los catéteres se retiran de la solución y se dejan secar. Durante la evaporación del solvente, los dispositivos vuelven a su tamaño original, quedando los antimicrobianos distribuidos uniformemente por todo el catéter.

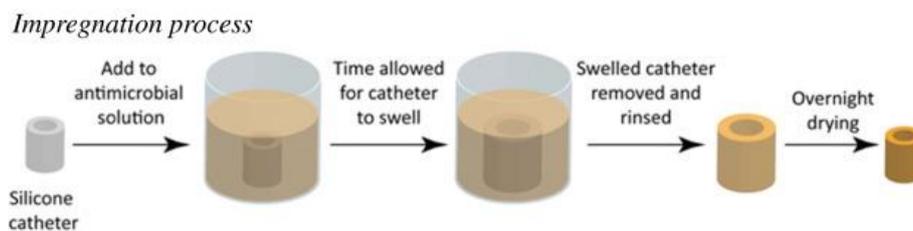


Figura 5. Impregnación y elución de antimicrobianos del catéter (Fisher et al., 2015).

A pesar de ser un método fácil de implementar tiene ciertas limitaciones que requieren la búsqueda de otros más efectivos. El recubrimiento con antibacteriano exige un coste elevado, con una cierta toxicidad a causa de los aditivos, la vida útil está limitada y además presenta la incapacidad de mantener la dosis terapéutica (Adlington et al., 2016) debido a la liberación rápida de la carga útil (Liu et al., 2019) ya que los agentes antibacterianos se depositan en la superficie de los catéteres a través de interacción electrostática e hidrófoba.

Los mecanismos más comunes asociados a los biocidas son:

- a. la inhibición de la síntesis de la pared celular (el mecanismo más común)
- b. la inhibición de la síntesis de proteínas (traducción)
- c. la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos
- d. efectos sobre los esteroides de la membrana celular
- e. la inhibición de etapas metabólicas únicas.

4.1.2. Modificación química de la superficie.

Las numerosas limitaciones del recubrimiento antimicrobiano para evitar las infecciones en catéteres, han provocado la necesidad de encontrar nuevas estrategias basadas en uniones covalentes, que aportan una mayor estabilidad en ambientes con alta tensión de cizallamiento (Liu et al., 2020). Estas nuevas estrategias pueden proporcionar una liberación controlada del fármaco y una mayor eficacia a largo plazo (Liu et al., 2019) frente a bacterias multirresistentes (MDR), que se han originado como consecuencia de un abuso incontrolado de los antibióticos y que además presentan una patogenicidad mucho más elevada (Kim et al., 2021), o evitando la alergia del paciente.

En la elaboración de catéteres se utilizan materiales poliméricos como la silicona, el poliuretano o el látex. Son materiales a los que la modificación de las propiedades superficiales mediante el uso de recubrimientos funcionales ha experimentado un desarrollo muy pronunciado en los últimos años en el campo de la química. Las bacterias tienden a adherirse a este tipo de material por lo que es interesante modificar la superficie para que sea antiadherente y bactericida (Neoh et al., 2017).

Para abordar este tipo de infección desde otro punto de vista y prevenir la colonización de patógenos en la superficie de los catéteres, la investigación en los últimos años, ha ido dirigida a una modificación química superficial utilizando cepillos poliméricos o bien un hidrogel.

4.1.2.1. Polímeros ramificados

Los polímeros son macromoléculas que se caracterizan por tener una unidad que se repite a lo largo de la molécula. Esta unidad repetitiva se denomina monómero y se combina entre sí mediante una reacción de polimerización. Según su morfología pueden ser lineales, ramificados o entrecruzados (figura 7). Los polímeros ramificados de obtienen por procesos de polimerización por etapas o en cadenas. Las ramificaciones influyen en muchas propiedades físicas de los polímeros cómo por ejemplo disminuye la capacidad de formar una red cristalina y son menos solubles que los polímeros lineales (López-Carrasquero, 2014).

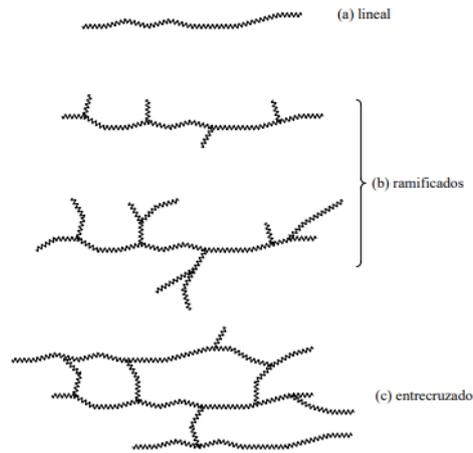


Figura 7. Estructura esquemática según el tipo de polímero.

4.1.2.2. Hidrogeles

Un hidrogel es una red tridimensional formada por cadenas flexibles de polímeros no tóxicos que absorben agua. En medicina se utilizan como vehículos de fármacos gracias a la buena interacción que presenta con los tejidos vivos y a su capacidad de liberación controlada. También suponen un entorno óptimo e inerte para proteínas, células o demás biomoléculas (Kim et al., 2021). Las principales características de los hidrogeles responsables de sus funciones más importantes, quedan recogidas en la figura 8.



Figura 8. Principales características de los hidrogeles.

De las características expuestas, cabe destacar en primer lugar que los hidrogeles son hidrófilos (absorben con facilidad el agua) debido a la presencia de grupos funcionales

hidrófilos: -OH, -COOH o -CONH₂ entre otros. Por otro lado, tienen la capacidad de hincharse cuando se ponen en contacto con agua aumentando su volumen y manteniendo la forma. Por eso se dice que son insolubles en agua. Según la estrategia sintética empleada en la obtención de un hidrogel, éste presenta diferentes características y aplicabilidad.

La estructura del hidrogel y la forma de la superficie, son dos factores importantes que influyen en la liberación prolongada del fármaco, punto en el cual también es importante ciertas características del principio activo, como es la solubilidad, el peso molecular, la constante de disociación ácida (pka) o el coeficiente de partición aparente que intervienen en la liberación controlada (Arredondo, Londoño, 2009).

4.2. RECUBRIMIENTO EN CEPILLO DE POLÍMERO.

Un cepillo polimérico o “polymer brushes” es una lámina con cadenas de polímeros unidas de manera irreversible por uno de sus extremos a una determinada superficie (figura 9) (Azzaroni, 2012). Son cadenas adyacentes tan próximas unas con otras que se solapan entre sí, por lo cual se ven obligadas a elongarse al máximo con el objeto de evitar interacciones desfavorables entre sus fragmentos. Cada cepillo polimérico presenta unas propiedades distintas gracias a la variedad de tecnologías de injerto y monómeros, siendo su principal función disminuir las infecciones en la superficies de catéteres impidiendo la unión de células y proteínas (Liu et al., 2020) mediante la modificación química de la superficie formando una capa de hidratación como barrera física y energética (Neoh et al., 2017).

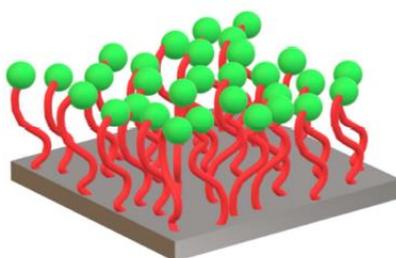


Figura 9. Ilustración de una superficie funcionalizada con cepillos poliméricos en 3D.

Con capacidad antiincrustante, se pueden utilizar revestimientos poliméricos hidrófilos y polímeros zwitteriónicos.

- **Polímeros hidrófilos.**

Los polímeros hidrófilos se unen a moléculas de agua mediante enlaces de hidrogeno a través de grupos hidroxilo, carboxilo y carbonilo (Liu et al., 2020). Los más utilizados como recubrimiento antiincrustantes son los polímeros no iónicos, es decir, en su estructura abundan los grupos polares: éter, hidroxilo o amida (figura 10 a) los cuales permiten la formación de puentes de hidrógenos con el medio acuoso y como hemos comentado anteriormente, forman una capa de agua que actúa como barrera física y termodinámica (Mitra et al., 2021).

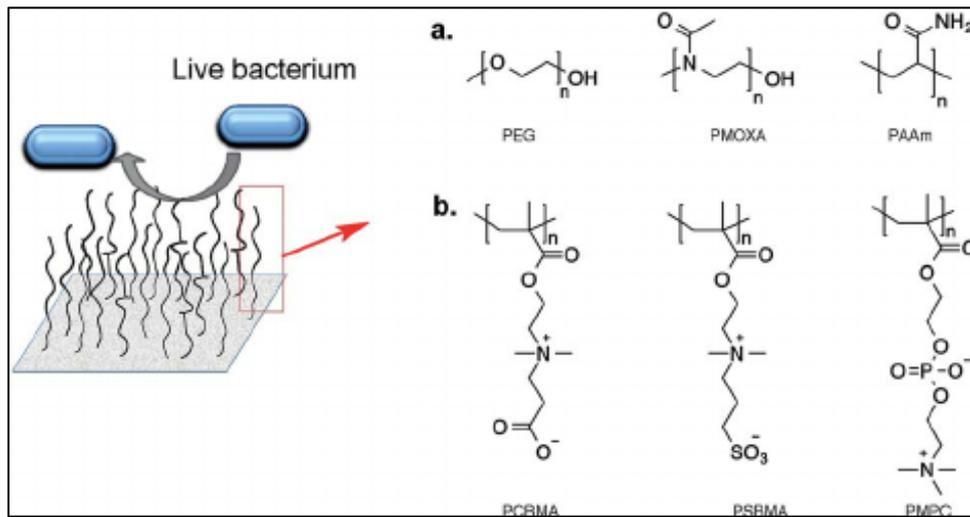


Figura 10. Cepillo de polímeros hidrófilo como revestimiento antiadhesivo: (a) polímeros neutros y (b) polímeros ion híbrido (Hadjesfandiari et al., 2014).

Uno de los más representativos es el polietilenglicol (PEG) (figura 10 a), el cual presenta una interacción débil en solución acuosa además de que en "in vivo", el grupo hidroxilo terminal del PEG es susceptible de ser oxidado a aldehído. Esto implica que el PEG no es un polímero útil como superficie anti-adhesiva a largo plazo (Neoh et al., 2017). Los estudios llevados a cabo han puesto de manifiesto que las propiedades antiincrustante de éste polímero dependen de la longitud de la cadena del polímero y su densidad de empaquetamiento: mientras más larga sea la cadena y mayor la densidad de los cepillos PEG lineales, mayor será su capacidad anti-adhesiva. Por otro lado, los recubrimientos con PEG son propensos a hincharse comprometiendo así su resistencia mecánica.

Otros polímeros hidrófilos no iónicos analizados son el poli (metacrilato de 2-hidroxietilo) (PHEMA); o el poli (metacrilato de 3-hidroxipropilo) (PHPMA) (figura 11).

En el caso de PHEMA y PHPMA, la actividad antiincrustante aumenta mientras más ancho es el cepillo polimérico, hasta un máximo. Si se supera el valor umbral, la capacidad de hidratación disminuye y por lo tanto la actividad antiincrustante también; al igual que ocurría con el PEG (Mitra et al., 2021).

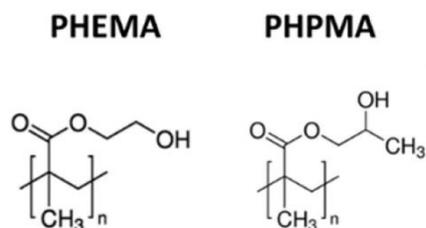


Figura 11. Estructura fórmula PHEMA y PHPMA.

También se han analizado cepillos poliméricos preparados a partir del poli(N-(2-hidroxiopropil) metacrilamida) (PHPMAA) o poli (acrilamida) (PAAm) (figura 12). Al tener en su estructura un grupo amida, el enlace de hidrógeno, es mucho más fuerte y por lo tanto su actividad antiincrustante es muy buena. Sin embargo, los estudios realizados han puesto de manifiesto, que presenta un pequeño inconveniente la formación de monómeros cancerígenos durante la degradación del polímero, mostrando un uso no seguro. Otros polímeros con grupos amida, empleados en la preparación de cepillos, han sido el poli (vinilpirrolidona) (PVP), cuyo estudios han puesto de manifiesto que presenta una mayor biocompatibilidad que PAAm; mientras que cepillos poliméricos de poli(2-metil-2-oxazolina) (PMOXA), han presentado una mayor resistencia a la oxidación.

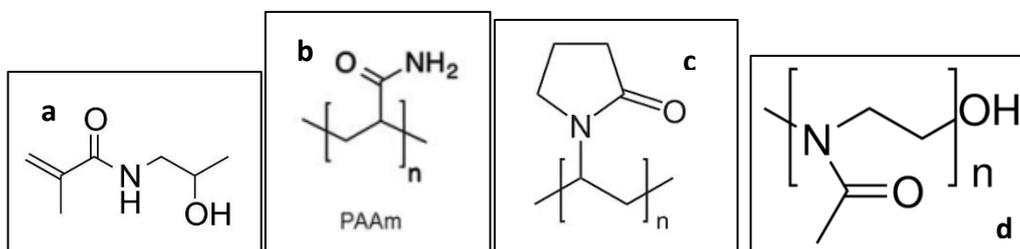


Figura 12. Estructura fórmula (a) PHPMAA, (b) PAAm, (c) PVP y (d) PVP.

○ **Polizwitteriones.**

Los polímeros de ion híbrido o polizwitteriones (figura 13) se unen a moléculas de agua por interacción electrostática, a través del grupo aniónico o el grupo catiónico de sus cadenas poliméricas y lo hacen con una mayor fuerza (Neoh et al., 2017). Un zwitterion o ion híbrido es un compuesto neutro, con una carga negativa y otra positiva sobre átomos distintos. Son moléculas polares y con una elevada solubilidad en agua.

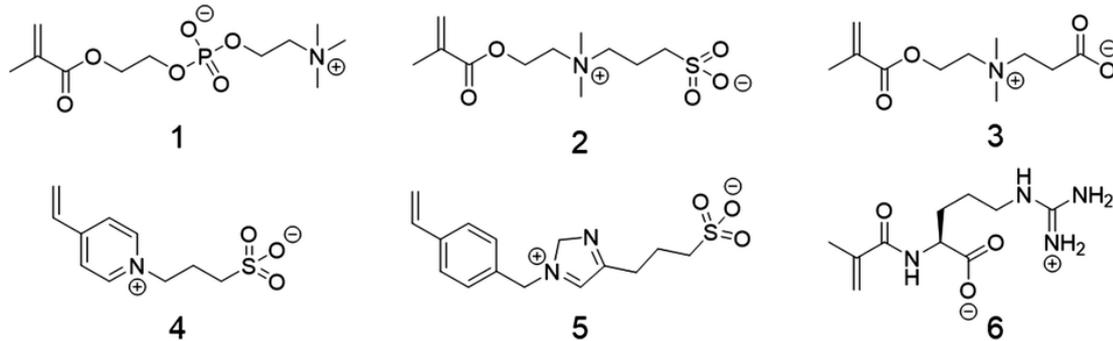


Figura 13: Ejemplos de estructuras químicas de monómeros zwitteriónicos.

La actividad antiincrustante de estos polímeros se debe a dos fenómenos distintos (figura 14): la repulsión electrostática y la repulsión estérica (Singha et al., 2017).

- **Repulsión electrostática:** permite la formación de una capa de hidratación mediante enlaces de hidrógeno entre los iones y las moléculas de agua que hay en el recubrimiento (Singha et al., 2017). La capa actúa como barrera evitando que las proteínas se unan a la superficie del dispositivo y con ello evitar la adhesión bacteriana. Estudios realizados por el grupo de Peng, han puesto de manifiesto que la interacción electrostática de los polímeros zwitteriónicos es más fuerte que la de los materiales basados en PEG (Peng et al., 2020).
- **Repulsión estérica:** cuando las bacterias se acumulan y se ponen en contacto con el polímero de la superficie del catéter, disminuye la motilidad del microorganismo a la vez que las moléculas de agua se liberan de la superficie y el polímero se comprime. Esto conduce a un aumento de la entalpía debido a la deshidratación del polímero y a una disminución de la entropía debido a la compresión de la cadena. De acuerdo con la termodinámica, ambos eventos son desfavorables y, por lo tanto, estas superficies tienden a repeler a las bacterias. El polímero tiende

a recuperar su estado normal evitando la unión entre las incrustaciones y la superficie del catéter (Singha et al., 2017).

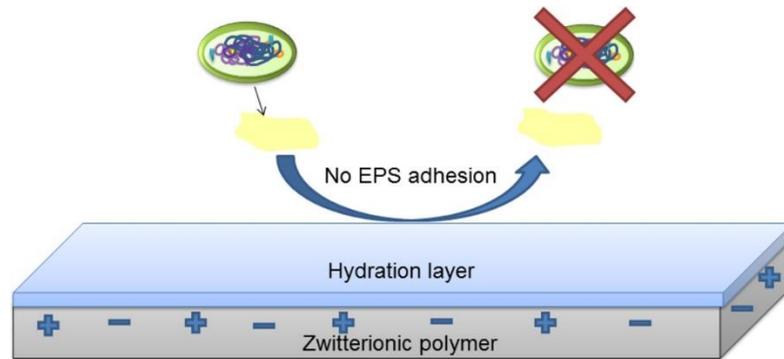


Figura 14. Actividad antiincrustante de los polyzwitterions (Singha et al., 2017).

Los recubrimientos zwitteriónicos tienen una gran ventaja y es la versatilidad estructural que presentan pues se pueden unir a cualquier grupo funcional (Singha et al., 2017). Su acción anti-adhesiva evita que las bacterias formen una biopelícula en la superficie del catéter. En los catéteres urinarios, el recubrimiento con un ion híbrido llega a reducir la aparición de biopelículas un 80% en 18 horas (Peng et al., 2020).

Los cepillos poliméricos que acabamos de comentar, inhiben la adsorción de proteínas y células, pero no presentan actividad bactericida, por lo tanto las biopelículas se pueden seguir formando. Las limitaciones de los polímeros hidrófilos y los polizwitteriones, crean la necesidad de buscar otras alternativas basadas en la misma estrategia del empleo de cepillos poliméricos.

La funcionalización de los catéteres con cepillos poliméricos es un tema en continuo desarrollo que está llevando a la obtención de materiales con interesantes propiedades como el permitir un control de la adsorción de células, proteínas e incluso moléculas.

Un ejemplo puede ser la formación de cepillos poliméricos empleando péptidos antimicrobiano (AMP), como alternativa a los antibióticos. Los AMP tienen un espectro de acción más amplio y son menos tóxicos, además evitamos la aparición de resistencias. Los péptidos antimicrobianos se inmovilizan en la superficie proporcionando un recubrimiento bacteriano (Neoh et al., 2017) por ejemplo sobre una superficie de silicona, mediante enlace covalente y de esta manera se consigue eliminar el 92% de las

bacterias en tan solo una hora (Liu et al., 2020). En la figura 15 se ilustran algunas de las estrategias empleadas en su inmovilización.

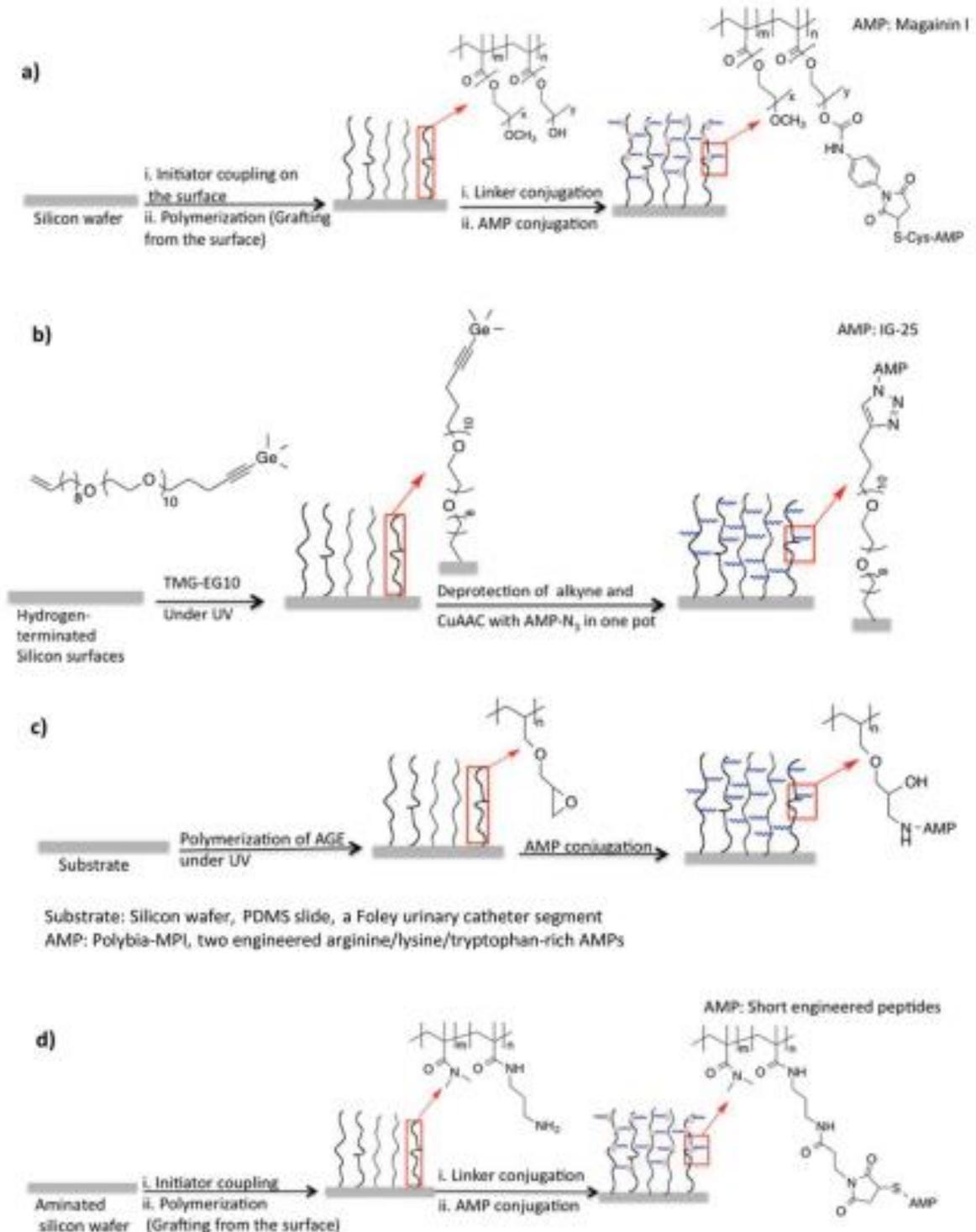


Figura 15. Algunas estrategias para conjugar AMP a sustratos mediante cepillos de polímero (Hadjesfandiari et al., 2014).

Los péptidos antimicrobianos tienen una composición muy variada pero en su estructura presentan dos características comunes (Neoh et al., 2017):

- *Carga catiónica*. La carga positiva hace que se una a la membrana bacteriana, que está cargada negativamente.
- *Proporción de un residuo hidrofóbico*. Lo que facilita la interacción con el ácido graso de las membranas bacterianas.

La idea de incorporar péptidos antimicrobianos ha sido positiva, ya que las superficies han presentado estabilidad a pH fisiológico y una adecuada biocompatibilidad. Sin embargo presentan un pequeño inconveniente: la acumulación de desechos bacterianos y la adsorción de proteínas acortan la vida útil de los catéteres (Liu et al., 2020).

Como solución, se presenta la idea de utilizar materiales duales, con capacidad antiincrustante y antibacteriana a la vez (Liu et al., 2020). La combinación de estas dos funciones hace que el recubrimiento sea “ideal”. Los recubrimientos de función dual están compuestos por (Mitra et al., 2021) (figura 16).

- Componente bactericida. Es un polímero resistente a las incrustaciones y que repela las bacterias vivas y muertas.
- Componente antiincrustante. Es un polímero de liberación, que como su propio nombre indica “libera” las bacterias adheridas.

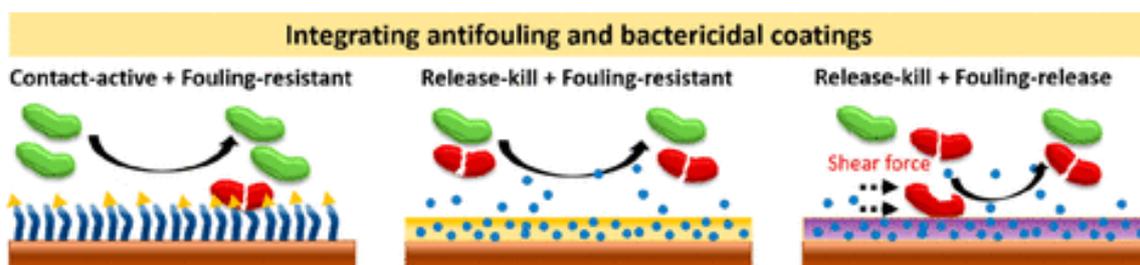


Figura 16. Esquema de materiales funcionales duales (Mitra et al., 2021).

Este tipo de recubrimientos también se pueden adaptar a los distintos estímulos y cambios en las condiciones del medio como puede ser un cambio en el pH, en la temperatura, en la concentración de sales...

Un ejemplo de la excelente efectividad que presentan los cepillos poliméricos con estructura dual, es el (H(N)-b-S) compuesto por poli (metacrilato de sulfobetaina) como antiincrustante y por poli (2-hidroxietil metacrilato) como bactericida (figura 17) (Hou et al., 2020). Ambos bloques se encuentran injertados covalentemente en una superficie de poliuretano. El efecto antibiofilm que tiene este tipo de recubrimiento es de amplio espectro tanto a largo como a corto plazo, eliminando hasta el 99.99% de bacterias Gram positivas y Gram negativas en 24 horas. Se ha comparado con otros recubrimientos de plata o de ion híbrido que no pueden reducir más del 90% (Hou et al., 2020)

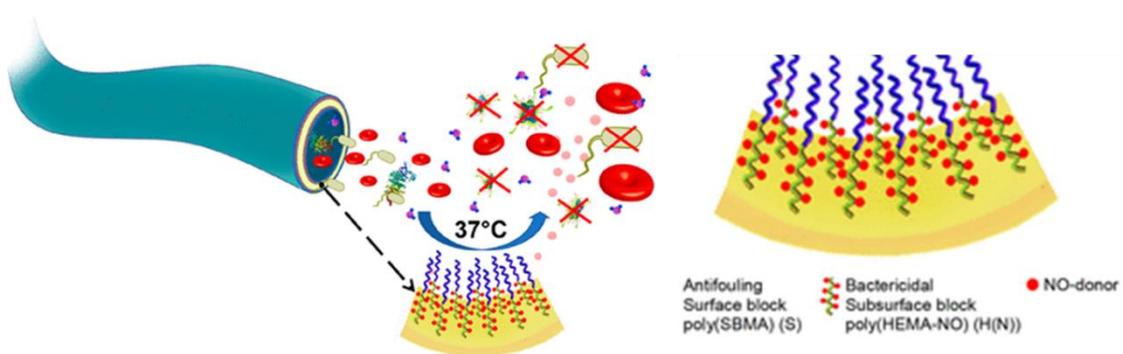


Figura 17. Cepillo de copolímero dibloque. H (N (-b-S)).

Otro ejemplo de moléculas dibloque con actividad antimicrobiana y antiincrustante es la compuesta por AMP y PEG (figura 18). Este revestimiento presenta una acción bactericida frente a bacterias patógenas y una gran acción antiincrustante, disminuyendo la acumulación de desechos bacterianos en la superficie del catéter (Liu et al., 2020).

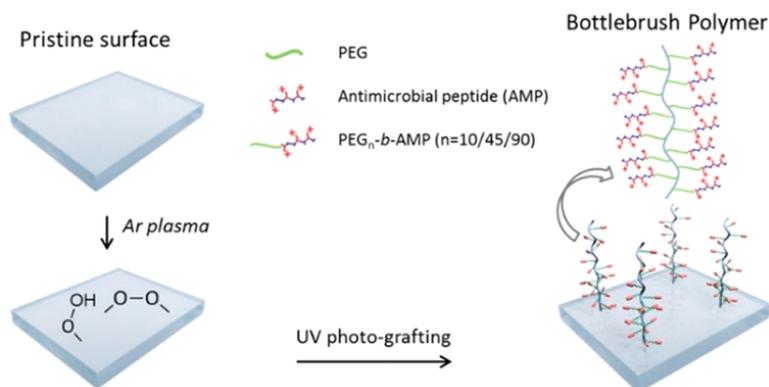


Figura 18. Recubrimiento compuesto por AMP y PEG.

En el caso de los catéteres que están en contacto con la sangre, la modificación de la superficie, aparte de minimizar el riesgo de infección debe de ser hemocompatible. Un recubrimiento hemocompatible ideal tiene que disminuir la adhesión de proteínas, plaquetas y glóbulos rojos y además, inhibir la coagulación de la sangre y evitar la formación de trombos (Mietra et al., 2021).

Un ejemplo de recubrimiento en catéteres intravenosos sería una superficie de poliuretano (PU) injertada con dos capas: la capa base catiónica y bactericida de metacrilato de etilo de poli [2-(dimetildecil amonio) etilo] (o PQ) y una capa superior de PEG con acción antiincrustante que está integrada a la estructura con bases de Schiff (Zhang et al., 2020). La modificación mostró gran capacidad antiincrustante y bactericida además de contar con una tasa de hemólisis inferior al 5% (Mitra et al., 2021). En condiciones normales, la capa de PEG existe a la absorción de las proteínas, pero cuando hay una infección, los enlaces de la base de Schiff se rompen (el ambiente es débilmente ácido) dejando expuesto la capa bactericida interna que mata a las bacterias e inhiben la infección (figura 19) (Zhang et al., 2020).

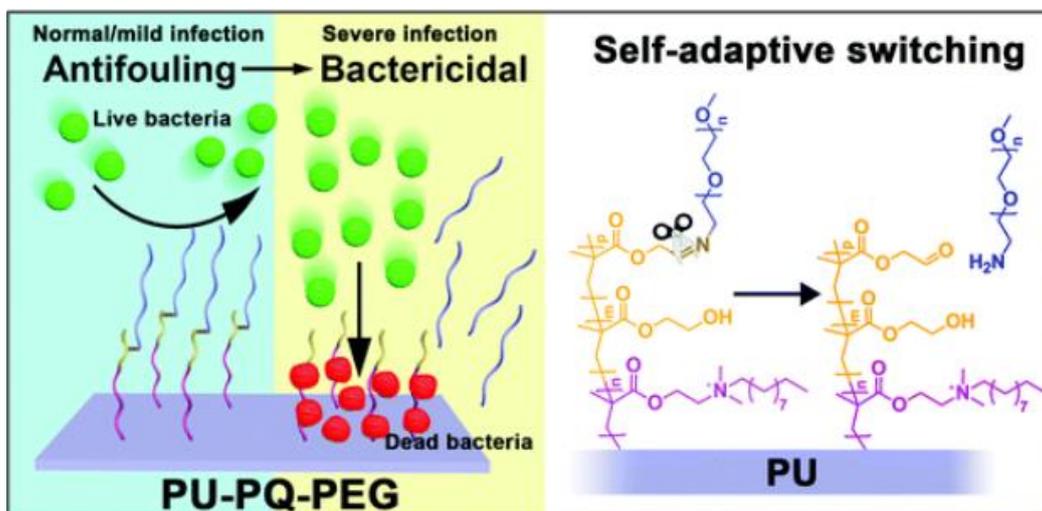


Figura 19. Mecanismo de acción PU-PQ-PEG (Zhang et al., 2020).

Para los catéteres intravasculares se considera muy prometedor el uso de polímeros liberadores de óxido nítrico (NO) porque aparte de poseer actividad antimicrobiana, es un potente vasodilatador e inhibidor plaquetario (Neoh et al., 2017). Se han empleado películas de polímeros de Elast-eon™ E2As como donantes de óxido nítrico (Brisbois et al., 2013) ya que permiten mantener una liberación del antimicrobiano de forma estable

hasta 20 días. El donante utilizado es SNAP debido a su alta estabilidad y se impregna en el polímero por métodos de hinchamiento con solvente (Singha et al., 2017). El recubrimiento, por lo tanto, consiste en una inmersión del catéter utilizando mandriles de acero inoxidable. Estos catéteres implantados en las venas de las ovejas durante 7 días mostraron una reducción de aproximadamente el 70% en el área del trombo y una reducción del 90% en la adhesión bacteriana en comparación con los catéteres de control preparados sin SNAP.

4.3. RECUBRIMIENTO DE HIDROGEL.

Los recubrimientos de hidrogel se utilizan para reducir o eliminar la presencia de cuerpos extraños en la superficie de los catéteres. Actúan como una “piel” que se adapta perfectamente y que permite encapsular antibióticos u otros componentes para impedir la adhesión. Por otro lado, proporcionan una textura suave y resbaladiza gracias a la parte polar e hidrófila de la estructura, lo que le permite que presenten un alto grado de hidratación. Estas características provocan que la capa de hidrogel disminuya el daño en la mucosa uretral (Liu et al., 2020).

Al igual que ocurre con el recubrimiento de cepillo polimérico, en el recubrimiento con hidrogel existe el sistema de doble capa, basado en el empleo de dos materiales con características diferentes como revestimiento del catéter. Sirva de ejemplo, el revestimiento compuesto por una capa inferior de hidrogel de alcohol de polivinilo, encargada de encapsular el colorante, carboxifluoresceína y una capa superior de EUDRAGIT S 100, un copolímero aniónico de ácido metacrílico y metacrilato de metilo (Milo et al., 2017) (figura 20).

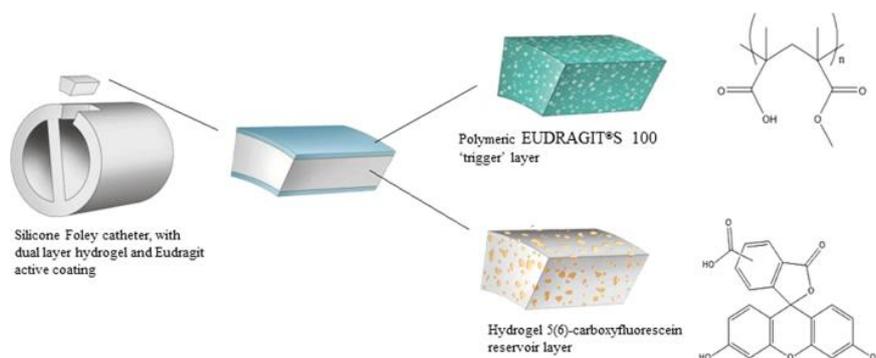


Figura 20. Esquema de la arquitectura polimérica de doble capa.

La capa inferior está sellada por la capa superior “liberadora” sensible al pH (Milo et al., 2016). Al aumentar el pH de la orina como consecuencia de una infección, la capa superior se hincha y hace que la capa inferior libere el colorante que tiene produciendo un cambio de color que actúa como señal (Milo et al., 2017) (figura 21).

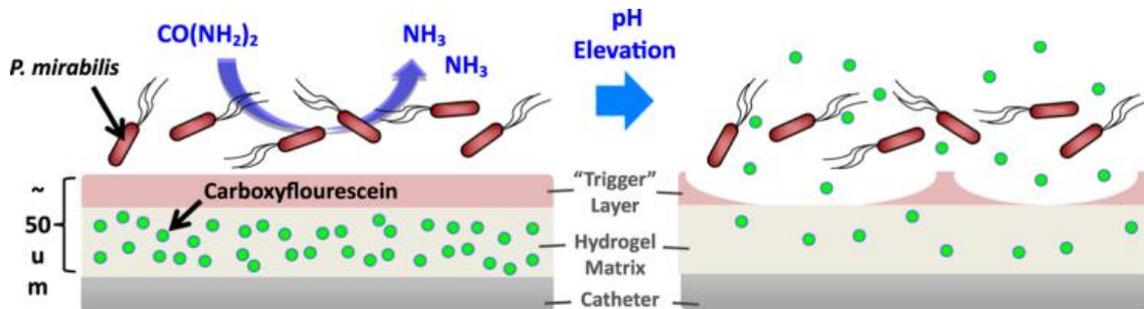


Figura 21. Estructura y mecanismo de acción. Liberación del colorante cuando aumenta el pH.

Otro ejemplo con recubrimiento de hidrogel sería el empleo del quitosano, polímero con excelentes propiedades antibacterianas y antiincrustante; conjugado con catecol y polidopamina (figura 22). La capa de hidrogel disminuye la fricción superficial; minimiza la unión bacteriana y con ello la formación de biopelículas. Además, este tipo de polímeros hidrófilos generan una superficie lubricante con agua que actúa como agente físico e impide también la unión microbiana.

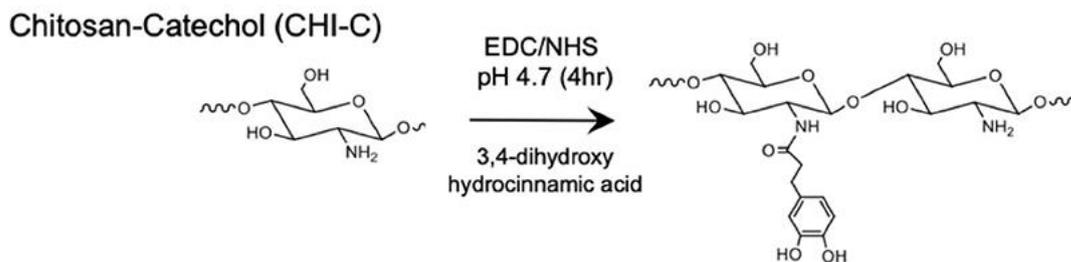


Figura 22. Esquema de síntesis de quitosano con catecol.

En este tipo de revestimiento las moléculas de catecol, se transforman en quinona que pueden reaccionar con otros grupos funcionales como aminas primarias y secundarias, carboxilos y otros grupos catecol. Esto le permite unirse a proteínas vecinas y formar una red polimérica o hidrogel, evitando el empleo de métodos agresivos de revestimiento. A este tipo de hidrogel también se le puede añadir trazas de nanopartículas de plata, maximizando el efecto antimicrobiano (Yang et al., 2019).

Los revestimientos de quitosano con catecol pueden prevenir la formación de biopelículas en catéteres producidas por *Escherichia coli* o *Staphylococcus aureus* principalmente.

Otro tipo de estrategia empleada para evitar la aparición de infecciones asociadas a catéteres es la de utilizar hidrogeles liberadores de bacteriófagos, sobre todo para el tratamiento y la prevención de infecciones bacterianas multirresistentes (MDR) asociadas al uso de catéteres en el tracto urinario. Varios estudios preclínicos avalan la utilización de hidrogeles como vehículo de los bacteriófagos activos frente a *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* o *Proteus mirabilis*. La seguridad de este tipo de mecanismo está consolidada siempre y cuando los bacteriófagos estén perfectamente preparados: libres de endotoxinas y de las proteínas de la célula huésped (Kim et al., 2021).

En las infecciones asociadas al tracto urinario, se pueden emplear como base los hidrogeles que clasificamos en la tabla 2.

TIPO DE HIDROGEL	BACTERIA DIANA	USO
HIDROGEL DE PEG-POLIURETANO	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Proteus mirabilis</i>	Prevención de la infección urinaria asociada al catéter
PVA- EUDRAGIT S 100 HIDROGEL	<i>Proteus mirabilis</i>	Prevención de la incrustación de la luz del catéter

Tabla 2. Hidrogeles liberadores de fagos en el tracto urinario asociado a catéteres.
(Kim et al., 2021).

Para que el sistema sea lo más estable posible se recomienda incorporar el bacteriófago una vez que se formule el hidrogel correspondiente (Kim et al., 2021).

5. CONCLUSIONES

- Disminuir las infecciones nosocomiales asociadas a catéteres es una misión importante. Este tipo de infecciones suponen un aumento en la tasa de mortalidad y mayor tiempo de estancia hospitalaria.
- El mal uso y el abuso de los antibióticos de forma generalizada incrementan la aparición de bacterias superresistentes. Estas bacterias son responsables del desarrollo de muchas infecciones nosocomiales y hacen más complicada su eliminación.
- Dentro de las infecciones nosocomiales, las CRBSI y CAUTIS suponen un riesgo para los pacientes que necesitan portar un catéter por la posible formación de biopelículas sobre la superficie del dispositivo médico.
- El estudio del biofilm y sus estrategias para eliminarlo sin desarrollar resistencia es uno de los campos de investigación más significativos y objetivo de numerosos estudios, de ahí su importancia actual a nivel farmacéutico.
- El recubrimiento bacteriano de la superficie del catéter es una técnica que se queda obsoleta pues la liberación rápida del fármaco no permite mantener la dosis terapéutica correcta y corre el riesgo de iniciar el desarrollo de resistencias, volviéndolos ineficaces a largo plazo.
- El desarrollo de nuevas técnicas basadas en utilizar bases de polímeros ramificados e hidrogeles abarcan muchos de los estudios por sus múltiples ventajas, principalmente, la liberación prolongada en el tiempo del fármaco y la estabilidad del sistema.
- De forma general, las opciones de tratamiento específicas deben diseñarse cuidadosamente, ya que la dispersión de las células de la biopelícula podría provocar efectos secundarios graves, como una enfermedad sistémica.
- Los catéteres relacionados con la sangre deben tener la capacidad de reducir la formación de trombos y una excelente hemocompatibilidad además de la propiedad antibacteriana.

- En la utilización de los catéteres urinarios, se debe prestar más atención para prevenir la formación de incrustaciones y microorganismos.
- Utilizar combinación de dos materiales como recubrimiento de catéteres supone un avance interesante pues parece ser que son más efectivos que los utilizados anteriormente.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Adlington K, Nguyen NT, Eaves E, Yang J, Chang C-Y, Li J, et al. Application of targeted molecular and material property optimization to bacterial attachment-resistant (meth)acrylate polymers. *Biomacromolecules*. 2016;17(9):2830–8.
2. Arredondo Peñaranda A, Londoño López ME. HIDROGELES: POTENCIALES BIOMATERIALES PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE MEDICAMENTOS. *Rev Ing Biomed*. 2009;3(5):83–94
3. Azzaroni O. Polymer brushes here, there, and everywhere: Recent advances in their practical applications and emerging opportunities in multiple research fields. *J Polym Sci A Polym Chem*. 2012;50(16):3225–58.
4. Brisbois EJ, Handa H, Major TC, Bartlett RH, Meyerhoff ME. Long-term nitric oxide release and elevated temperature stability with S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP)-doped Elast-eon E2As polymer. *Biomaterials*. 2013;34(28):6957–66.
5. Cortese YJ, Wagner VE, Tierney M, Devine D, Fogarty A. Review of catheter-associated urinary tract infections and in vitro urinary tract models. *J Healthc Eng*. 2018;2018:2986742
6. España I. ESTUDIO EPINE-EPPS nº 30: 2019 [Internet]. Epine.es. [cited 2021 Aug 6]. Available from: <https://epine.es/api/documento-publico/2019%20EPINE%20Informe%20Espa%C3%B1a%2027112019.pdf/reports-esp>
7. Fisher LE, Hook AL, Ashraf W, Yousef A, Barrett DA, Scurr DJ, et al. Biomaterial modification of urinary catheters with antimicrobials to give long-term broadspectrum antibiofilm activity. *J Control Release*. 2015;202:57–64.
8. Global Intravascular Catheters Market Size, Market Share, Application Analysis, Regional Outlook, Growth Trends, Key Players, Competitive Strategies and Forecasts, 2018-2026 ID: 4772950; Report; May 2019; Acute Market Reports.

9. Hadjesfandiari N, Yu K, Mei Y, Kizhakkedathu JN. Polymer brush-based approaches for the development of infection-resistant surfaces. *J Mater Chem B Mater Biol Med*. 2014;2(31):4968–78.
10. Hook AL, Chang C-Y, Yang J, Lockett J, Cockayne A, Atkinson S, et al. Combinatorial discovery of polymers resistant to bacterial attachment. *Nat Biotechnol*. 2012;30(9):868–75.
11. Hou Z, Wu Y, Xu C, Reghu S, Shang Z, Chen J, et al. Precisely structured nitric-oxide-releasing copolymer brush defeats broad-spectrum catheter-associated biofilm infections in vivo. *ACS Cent Sci*. 2020;6(11):2031–45.
12. Jiménez-Alcaide E, Medina-Polo J, García-González L, Arrébola-Pajares A, Guerrero-Ramos F, Pérez-Cadavid S, et al. Infecciones del tracto urinario de origen hospitalario en pacientes portadores de catéter urinario: factores de riesgo, características microbiológicas y resistencias a antibióticos. *Arch Esp Urol*. 2015; 68(6):541–50.
13. Khan HA, Ahmad A, Mehboob R. Nosocomial infections and their control strategies. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2015;5(7):509–14
14. Kim HY, Chang RYK, Morales S, Chan H-K. Bacteriophage-delivering hydrogels: Current progress in combating antibiotic resistant bacterial infection. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(2):130.
15. Lim H, Lee Y, Han S, Cho J, Kim K-J. Surface treatment and characterization of PMMA, PHEMA, and PHPMA. *J Vac Sci Technol A*. 2001;19(4):1490–6.
16. Liu H, Shukla S, Vera-González N, Tharmalingam N, Mylonakis E, Fuchs BB, et al. Auranofin releasing antibacterial and antibiofilm polyurethane intravascular catheter coatings. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9:37
17. Liu L, Shi H, Yu H, Yan S, Luan S. The recent advances in surface antibacterial strategies for biomedical catheters. *Biomater Sci*. 2020;8(15):4095–108
18. López-Carrasquero F. FUNDAMENTOS DE POLÍMEROS. [object Object]: Escuela Venezolana para la Enseñanza de la Química; 2014.

19. Milo S, Hathaway H, Nzakizwanayo J, Alves DR, Esteban PP, Jones BV, et al. Prevention of encrustation and blockage of urinary catheters by *Proteus mirabilis* via pH-triggered release of bacteriophage. *J Mater Chem B Mater Biol Med*. 2017;5(27):5403–11.
20. Milo S, Thet NT, Liu D, Nzakizwanayo J, Jones BV, Jenkins ATA. An in-situ infection detection sensor coating for urinary catheters. *Biosens Bioelectron*. 2016;81:166–72.
21. Mitra D, Kang E-T, Neoh KG. Polymer-based coatings with integrated antifouling and bactericidal properties for targeted biomedical applications. *ACS Appl Polym Mater*. 2021;3(5):2233–63.
22. Neoh KG, Li M, Kang ET, Chiong E, Tambyah PA. Surface modification strategies for combating catheter-related complications: recent advances and challenges. *J Mater Chem B Mater Biol Med*. 2017; 5 (11): 2045–67.
23. Peng W, Liu P, Zhang X, Peng J, Gu Y, Dong X, et al. Multi-functional zwitterionic coating for silicone-based biomedical devices. *Chem Eng J*. 2020;398(125663):125663.
24. Sharma D, Misba L, Khan AU. Antibióticos versus biopelícula: un campo de batalla emergente en las comunidades microbianas. *Control de infecciones resistentes a los antimicrobianos*. 2019; 8 (1): 76.
25. Singha P, Locklin J, Handa H. A review of the recent advances in antimicrobial coatings for urinary catheters. *Acta Biomater*. 2017;50:20–40.
26. Singh A, Dubey AK. Various biomaterials and Techniques for Improving Antibacterial Response. *ACS Appl Bio Mater*. 2018; 1 (1): 3–20.
27. Srinivasan R, Santhakumari S, Poonguzhali P, Geetha M, Dyavaiah M, Xiangmin L. Bacterial biofilm inhibition: A focused review on recent therapeutic strategies for combating the biofilm mediated infections. *Front Microbiol*. 2021;12:676458.
28. Stickler DJ. Clinical complications of urinary catheters caused by crystalline biofilms: something needs to be done. *J Intern Med*. 2014;276(2):120–9.

29. World Health Organization. (2008). Prévention des infections nosocomiales: guide pratique, 2nd. Ed. Organisation mondiale de la Santé. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/69751>
30. Yang K, Kim K, Lee EA, Liu SS, Kabli S, Alsudir SA, et al. Robust low friction antibiotic coating of urethral catheters using a catechol-functionalized polymeric hydrogel film. *Front Mater* [Internet]. 2019;6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fmats.2019.00274>
31. Zhang Y, Zhang X, Zhao Y-Q, Zhang X-Y, Ding X, Ding X, et al. Self-adaptive antibacterial surfaces with bacterium-triggered antifouling-bactericidal switching properties. *Biomater Sci*. 2020;8(3):997–1006.
32. Zhu Z, Gao Q, Long Z, Huo Q, Ge Y, Vianney N, et al. Polydopamine/poly(sulfobetaine methacrylate) Co-deposition coatings triggered by CuSO₄/H₂O₂ on implants for improved surface hemocompatibility and antibacterial activity. *Bioact Mater*. 2021;6(8):2546–56

7. ABREVIATURAS

AMP. Péptidos antimicrobiano

CAUTIS. Infecciones del tracto urinario asociadas al catéter.

CDC. Centro para el Control de Enfermedades

CRBSI. Infecciones del catéter asociado al torrente sanguíneo.

EPINE. Estudio epidemiológico, transversal, de prevalencia de las infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria.

EPS. Sustancia polimérica extracelular.

IRAS. Infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria.

IRC. Infecciones relacionadas con catéteres.

ISQ. Infección del sitio quirúrgico.

ITU. Infección del tracto urinario.

MDR. Bacterias multirresistentes.

NO. Óxido nítrico.

PAAm. Poli (acrilamida).

PEG. Polietilenglicol.

PHEMA. Poli (metacrilato de 2-hidroxietilo).

PHPMA. Poli (metacrilato de 3-hidroxipropilo)

PHPMAA. Poli (N-(2-hidroxipropil) metacrilamida).

PMOXA. Poli (2-metil-2-oxazolina).

PU. Poliuretano.

PVP. Poli (vinilpirrolidona)

SEMPSPH. Sociedad Española de Medicina Preventiva Salud Pública e Higiene.

SNAP. S-nitroso-N-acetilpenicilamina.