

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE OPTICA Y OPTOMETRIA



TESIS DOCTORAL

**Nuevas técnicas de detección de Acanthamoeba : estudio de la
eficacia de desinfección de las lentes de contacto**

**Novel techniques for Acanthamoeba detection : studying the
efficacy of contact lenses disinfection**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Cristina Pastrana Robles

Directores

**Juan Gonzalo Carracedo Rodríguez
Fernando Huete Toral**

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ÓPTICA Y OPTOMETRÍA



TESIS DOCTORAL

Nuevas técnicas de detección de *Acanthamoeba*: estudio de la eficacia de desinfección de las lentes de contacto

Novel techniques for Acanthamoeba detection: studying the efficacy of contact lenses disinfection

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Cristina Pastrana Robles

DIRECTORES

**Juan Gonzalo Carracedo Rodríguez
Fernando Huete Toral**

Madrid, 2022

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ÓPTICA Y OPTOMETRÍA



TESIS DOCTORAL

Nuevas técnicas de detección de *Acanthamoeba*: estudio de la eficacia de desinfección de las lentes de contacto

Novel techniques for Acanthamoeba detection: studying the efficacy of contact lenses disinfection

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Cristina Pastrana Robles

DIRECTORES

**Juan Gonzalo Carracedo Rodríguez
Fernando Huete Toral**

Madrid, 2022

***“Razonar y convencer, ¡qué difícil, largo y trabajoso!
¿Sugestionar? ¡Qué fácil, rápido y barato!”***

Santiago Ramón y Cajal

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Este momento, que parecía tan lejano cuando empecé, se acerca a su fin dejando atrás un camino lleno de todo tipo de emociones y de personas que me han acompañado.

En primer lugar, gracias a mis directores de tesis, Fer y Gonzalo por ayudarme en todo el proceso. Gracias a Gonzalo por estar siempre ahí ya sea a nivel científico como personal. Gracias por saber hacer fácil lo difícil, por transmitir la tranquilidad que aparentas, por hacer el papel de director y amigo.

A todo el grupo de investigación, que hacen los días en la facultad más amenos. Gracias a Ana, María, Candela, Azza, Julia, Cris, Marisa, Bea que han compartido más años conmigo. Gracias a todos los que habéis hecho que ir a congresos se convierta en un “planazo”. A Teresa, por todos esos planes de *jobo* que nos unieron hasta hoy. A Carlos, por todos estos años, por haber estado siempre. Tenerte ha sido una suerte, infinitas gracias.

Gracias a los que empezaron siendo mi grupo del máster y se han convertido en mi día a día. A Pablo, por aportar siempre su humor, a Sandra por ser todo corazón , a Vicky por ser la parte más racional que a veces necesitamos oír y por último, a Marina y Hanan. Gracias por ser un punto de apoyo, por hacerme reír hasta caerme al suelo y por todas las anécdotas graciosas que podemos contar.

Gracias a Marta y Lorenzo por vuestra disposición y ayuda y por hacer posible mi estancia en el *International Iberian Nanotechnology Laboratory*. A Rafa, por tu dedicación, cercanía y entrega conmigo de la que siempre estaré agradecida. Por animarme y ser siempre positiva cuando todo se veía un poco negro. A mis “españolas

en Braga”, Bea y Espe, por haber llenado de recuerdos bonitos parte de mi estancia en Braga. *To my lab partner, Monisha, for your energy, your dances, for being my confidant, and for showing me your culture. Staying until late (too late) at the lab is always better in your company. Even if you continue moving further away, we will be in contact.*

A mis amigas de la carrera, con vosotras empezó todo este mundo “de los ojos” La parte de atrás de la cafetería siempre será nuestra. Isa, Clara, Raquel, Ángela, Noe, Ana, Cynthia y Sara, gracias por seguir en mi vida todo este tiempo.

A mis amigas de siempre, las del colegio, porque, aunque tenéis una ocupadísima agenda que hace que no nos veamos tanto, es bonito saber que os sigo teniendo.

Por último, gracias a mi familia, los que siempre están y estarán, por apoyarme siempre en todo. A mi madre, a la que siempre recurro cuando quiero oír una versión positiva y feliz de la vida. A mi padre, por darme su visión más “realista”, por traerme nueces recién partidas a la habitación cuando estudiaba para algún examen diciéndome que eran buenas para la memoria (creo que funcionaron) y por los zumos de naranja también. A mi hermano, una de las personas con las que más me he reído en la vida, gracias por saber quitarle importancia a mis preocupaciones y por ayudarme siempre a elegir zapatillas.

Quiero terminar lanzando una disculpa general por todas las veces que he rechazado o dudado de hacer planes diciendo “es que tengo que escribir”. A partir de ahora queda eliminada de mis expresiones.

Se termina esta etapa, y no sé qué vendrá después, pero por suerte, sé que todos vosotros os venís conmigo.

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS	19
ÍNDICES DE FIGURAS Y TABLAS	23
1. ÍNDICE DE FIGURAS	25
2. ÍNDICE DE TABLAS	29
RESUMEN	31
I. INTRODUCCIÓN	39
1. LA SUPERFICIE OCULAR	41
1.1 La película lagrimal	41
1.2 La conjuntiva	43
1.3 La córnea	43
1.4 Infecciones oculares	47
2. ACANTHAMOEBA spp	50
2.1 Antecedentes históricos	50
2.2 Taxonomía	51
2.3 Morfología y ciclo biológico	53
2.4 Distribución	55
2.5 Patogenicidad de <i>Acanthamoeba</i> spp.	56
3. QUERATITIS AMEBIANA	57
3.1 Epidemiología	57
3.2 Factores de riesgo	58
3.3 Signos y síntomas	60
3.4 Patogénesis de la enfermedad	62
3.5 Diagnóstico	68
3.6 Tratamiento de la queratitis por <i>Acanthamoeba</i>	71
4. SISTEMAS DE LIMPIEZA/ MANTENIMIENTO	74
4.1 Soluciones multipropósito (únicas)	74
4.2 Peróxido de Hidrógeno	76
4.3 Povidona yodada	78
5. NANOTECNOLOGÍA Y NANOMEDICINA	79

5.1 Nanopartículas de oro	80
II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	91
1. JUSTIFICACIÓN	93
2. HIPÓTESIS	95
3. OBJETIVOS	96
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	97
1. MATERIAL.....	99
1.1 Productos químicos	99
1.2 Instrumentos y equipos.....	100
2. MÉTODOS	102
2.1 Selección de las secuencias de <i>Acanthamoeba</i>	102
2.2 FASE 1. Desarrollo del sistema de detección de <i>Acanthamoeba</i> con AuNPs	103
2.2.1 Diseño del sistema de detección	104
2.2.2 Nanopartículas de oro	106
2.2.3 Hibridación- estrategia de detección colorimétrica	112
2.2.4 Cultivos de <i>Acanthamoeba</i>	114
2.3 FASE 2. Eficacia de las soluciones de limpieza / mantenimiento.....	118
2.3.1 Contaminación de las lentes de contacto	118
2.3.2 Desinfección de las lentes de contacto.....	121
2.3.3 Limpieza- tratamiento de las lentes de contacto.....	123
2.3.4 Extracción de <i>Acanthamoeba</i> de las lentes de contacto	126
2.4 Análisis de los datos	128
IV. RESULTADOS	131
1. FASE 1. SISTEMA DE DETECCIÓN CON AuNPs	133
1.1 Síntesis y caracterización de las AuNPs	133
1.2 Funcionalización de las nanopartículas de oro.....	136
1.3 Estrategia de detección colorimétrica.....	148
2. FASE 2. EFICACIA DE LOS SISTEMAS DE LIMPIEZA DE LAS LENTES DE CONTACTO	165
V. DISCUSIÓN	189
1. FASE 1. SISTEMA DE DETECCIÓN CON AuNPs.	191

2. FASE 2. EFICACIA DE LOS SISTEMAS DE LIMPIEZA	194
3. LIMITACIONES Y PERSPECTIVA DE FUTURO	213
VI. CONCLUSIONES	215
CONCLUSIONES	217
CONCLUSIONS	219
VII. REFERENCIAS	221
VIII. ANEXO	243

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ADN complementario

ARN: ácido ribonucleico

AuNPs: nanopartículas de oro.

DE: desviación estándar

DLS: dispersión dinámica de la luz, del inglés *Dynamic light scattering*.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

HiSi: hidrogel de silicona

LC: lente(s) de contacto(s)

LoD: límite de detección, del inglés, *Limit of detection*.

LSPR: plasmón de resonancia superficial localizado, del inglés *Localised surface plasmon resonance*.

MBP: proteínas de unión a la manosa, del inglés *mannose-binding protein*

MMP: Metaloproteinasas de matriz, del inglés *Matrix metalloproteinases*.

MQ: Milli-Q

NEANA: amplificación de nanopartículas asistida por mellado de endonucleasa

PCR: reacción en cadena de la polimerasa, del inglés *polymerase chain reaction*.

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR cuantitativa) del inglés real time *polymerase chain reaction*

PHMB: polihexanida, del inglés, polyhexamethylene biguanide.

PQ-1: polyquaternium-1.

PY: povidona yodada

QA: queratitis por Acanthamoeba.

RCF: fuerza centrífuga relativa o fuerza g, del inglés, *Relative Centrifugal Force*.

RGB : coordenadas rojo, verde, azul, del inglés, *Red Green Blue color coordinates*.

RPG: rígidas permeables al gas.

SC: sistema del complemento.

TEM: microscopía electrónica de transmisión, del inglés *Transmission electron microscopy*.

ÍNDICES DE FIGURAS Y TABLAS

1. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Corte histológico de la córnea en el que se identifican sus diferentes capas. Imagen modificada de Meeney y Mudhar, 2013 (46).	47
Figura 2. Quistes de <i>Acanthamoeba</i> vistos con microscopio de contraste. Clasificación A: grupo I ; B: grupo II ; C: grupo III. Lorenzo-Morales et al. 2015 (76).52	
Figura 3. Ciclo biológico de las especies del Género <i>Acanthamoeba</i> . Trofozoíto: Imagen de Carnt et al. 2015 (101). Quiste con sus partes: Imagen modificada de la biblioteca de imágenes de parásitos del CDC (102).....	55
Figura 4. Imágenes representativas de la queratitis por <i>Acanthamoeba</i> . A) Defecto epitelial y anillo de infiltrado estromal anular. B) Cicatrización corneal con neovascularización profunda y superficial. Imagen tomada de Varacalli et al. 2021 (168).	61
Figura 5. Proceso de patogénesis de la queratitis por <i>Acanthamoeba</i> . Imagen modificada de Clarke et al. 2006 (191).	66
Figura 6. Escala de diferentes tamaños relacionada con el contexto biológico. En verde se resalta la zona en la que se encuentran los nanomateriales.	79
Figura 7. Ilustración del efecto de resonancia de plasmón superficial (SPR). Oscilación colectiva de los electrones con el campo electromagnético incidente en una nanopartícula de oro. Imagen modificada de Juan et al. 2011 (296).	81
Figura 8. Apariencia visual de las nanopartículas de oro esféricas de diferentes tamaños en solución (arriba) y su espectro visible (abajo). Se observa un desplazamiento de la banda de absorción hacia longitudes de onda más largas cuanto mayor es el tamaño, acompañado de un cambio de color desde el rojo al violeta. Imágenes modificadas de Njoki et al. 2007 (299).	82
Figura 9. Componentes básicos de un biosensor.	83
Figura 10. Esquema ilustrativo de los tipos de agregación que se pueden desarrollar con AuNPs funcionalizadas. Imagen modificada de Wang et al. 2017 (326)	87
Figura 11. Esquema de las nanopartículas de oro funcionalizadas con el ADN de <i>Acanthamoeba</i> (izquierda). La adición de la sonda de reconocimiento (<i>Target</i>) de	

<i>Acanthamoeba</i> a una muestra de nanopartículas de oro funcionalizadas promueve la agregación cross-linking, produciendo un cambio de color visible (derecha).	105
Figura 12. Esquema representativo de la distancia a la que se encuentran las AuNPs separadas por la unión del target con las sondas de ADN1 y ADN2 complementarias.	106
Figura 13. Diagrama esquemático del tamaño hidrodinámico de la AuNP y el ADN unido, medido mediante DLS. Con la unión del ADN el tamaño medido es mayor.	109
Figura 14. A. Placa con <i>E.coli</i> distribuida en forma de 'Z' en medio AGAR. E un extremo de la 'Z' se encuentra un corte de agar con <i>Acanthamoeba</i> . B. Tras un período de 3 días, la ameba se alimenta de la <i>E.coli</i> siguiendo el camino de la 'Z'. <i>E.coli</i> desaparece y se ve el rastro de la ameba por la placa.....	115
Figura 15. Imagen de un cultivo de <i>Acanthamoeba</i> vista con microscopio óptico, 10X. En la imagen de la izquierda se observan predominantemente quistes y en la de la derecha se puede observar algunos trofozoítos.....	116
Figura 16. Representación de la cuadrícula de conteo del hematocimetro.	117
Figura 17. Disposición de las lentes de contacto en la placa de 24.....	119
Figura 18. LC Hidrogel de silicona tras la contaminación con <i>A.castellanii</i> . En los cuadros se señala la presencia de quistes.	120
Figura 19. Espectro visible de las nanopartículas de oro sintetizadas y las nanopartículas concentradas (diluidas 1000 veces). B) Imagen de las nanopartículas de oro sintetizadas.	134
Figura 20. A) Histograma de frecuencias del tamaño de las nanopartículas de oro sintetizadas medido a partir de las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión. B) Imágenes de las AuNPs tomadas mediante TEM. .	136
Figura 21. Espectros visibles tras la unión del ADN1 y ADN2 mediante el método de reducción del pH, en las condiciones descritas en tabla 10. Comparación frente a la muestra control (sin ADN). Absorbancias normalizadas a 400nm.....	140
Figura 22. A) Espectro visible tras la unión del ADN1 y ADN2 mediante el método de pH, en las condiciones descritas en tabla 10. B) Cambios de tamaño obtenidos medidos mediante DLS.	141

Figura 23. A) Espectros visibles de las AuNPs unidas al ADN1 mediante el método de salt aging en las condiciones descritas en tabla 12. B) Valores del diámetro hidrodinámico obtenido mediante DLS, posición e incremento del pico máximo de absorción obtenido a partir del espectro visible.....	147
Figura 24. Efecto de diferentes concentraciones de sal (NaCl) sobre la estabilidad de las AuNPs funcionalizadas con ADN. A) Imagen digital de la respuesta colorimétrica. B) Espectro visible de las AuNPs con diferentes concentraciones de sal frente al control (sin sal).	149
Figura 25. Estimación del grado de agregación (Abs_{620} / Abs_{max}) para diferentes concentraciones de sal. *P < 0.05, Prueba U de Mann-Whitney, comparación por pares con el control (0 M).....	150
Figura 26. A) Imagen digital del color visible de las muestras. B) Espectro visible de las muestras a lo largo del tiempo.	151
Figura 27. Imágenes de los cambios de color visibles con concentraciones de <i>target</i> de 0.01 μ M, 0.05 μ M, para una concentración de AuNPs: 1 nM y concentración de sal: 0.25 M. A) Comparación de las dos concentraciones de <i>target</i> frente al control B) Comparación sólo de la concentración de <i>target</i> 0.05 μ M frente al control.	152
Figura 28. Efecto de la concentración de AuNPs en la respuesta colorimétrica: 0.4 nM (a), 0.8 nM (b), 0.9 nM (c) y 1 nM. Concentración de sal utilizada [NaCl]: 0.25M.	153
Figura 29. Resultados visuales obtenidos con diferentes concentraciones de <i>target</i> comparados con la muestra control (sin <i>target</i>) a los 20 min y tras 24 horas.....	154
Figura 30. Respuesta colorimétrica analizada mediante los valores R/B para las diferentes concentraciones de <i>target</i> desde 0.005 a 0.2 μ M. La concentración de AuNPs fue 1 nM y se mantuvo constante para cada conjunto de ADN-AuNP.	156
Figura 31. Curva de calibración de la respuesta colorimétrica de diferentes concentraciones de <i>target</i> basada en la relación R/B.	158
Figura 32. A. Espectro de absorción de las muestras con <i>E.coli</i> y con <i>Acanthamoeba</i> donde se observa mayor cambio al añadir <i>Acanthamoeba</i> . B. Cambio de color visible de cada muestra respecto al control.....	160

Figura 33. Respuesta colorimétrica obtenida para diferentes concentraciones de <i>Acanthamoeba</i> estimadas mediante nanodrop. A) Imagen digital del cambio de color visible B) Espectro visible de las muestras, a medida que aumenta la concentración, la absorbancia a longitudes de onda larga aumenta.	162
Figura 34. Estimación del grado de agregación mediante la relación Abs_{620}/Abs_{max} para diferentes concentraciones de <i>Acanthamoeba</i> . A), B) *p < 0.05, prueba U de Mann-Whitney, comparación por pares con el control (0 ng/μL). A medida que aumenta la concentración de ameba, el cociente aumenta y por tanto la agregación.	163
Figura 35. Valores medios de Ct obtenidos en la qPCR representados con su desviación estándar para el gen hsp 70 (A) y el gen TPBF (B). **P < 0.05, test U de Mann-Withney para muestras independientes. *P < 0.05 respecto método 1; +P < 0.05 respecto método 2.....	177
Figura 36. Valores medios de los CTs obtenidos en la qPCR representados con su desviación estándar para el gen hsp70 (A) y TPBF (B). **P < 0.05, test U de Mann-Withney para muestras independientes. *P < 0.05 respecto método 1; +P < 0.05 respecto método 2.....	180
Figura 37. Valores medios de los CTs obtenidos en la PCR-cuantitativa representados con su desviación estándar. **P < 0.05, test U de Mann-Withney para muestras independientes. *P < 0.05 respecto método 1; +P < 0.05 respecto método 2.	183
Figura 38. Valores medios de los CTs obtenidos en la PCR-cuantitativa representados con su desviación estándar. **P < 0.05, test U de Mann-Withney para muestras independientes. *P < 0.05 respecto método 1; +P < 0.05 respecto método 2.	186

2. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reactivos y productos químicos.....	99
Tabla 2. Soluciones tampón.....	100
Tabla 3. Herramientas informáticas utilizadas.....	100
Tabla 4. Equipos e instrumentos utilizados.....	101
Tabla 5. Secuencias de ADN <i>Acanthamoeba</i> seleccionadas para la realización de los experimentos con AuNPs.	104
Tabla 6. Características de las lentes de contacto empleadas en el estudio.	118
Tabla 7. Diseño de estudio realizado por cada placa.....	121
Tabla 8. Soluciones de limpieza empleadas en el estudio.....	122
Tabla 9. Secuencias de los diferentes primers específicos analizados mediante PCR cuantitativa.	128
Tabla 10. Optimización método de reducción del pH.....	137
Tabla 11. Medidas del diámetro hidrodinámico mediante DLS y cálculo del aumento del ζ H respecto a los valores de la muestra control.....	139
Tabla 12. Resumen de los procesos de optimización realizados para el método salt-aging.....	144
Tabla 13. Concentraciones de las muestras de <i>A.castellanii</i> . En la primera columna se muestra las concentraciones de ácidos nucleicos estimadas mediante nanodrop y en la segunda columna se muestran las concentraciones calculadas a partir de valores R/B y curva de calibración (μ M). El número de amebas/ μ L se calculó a partir del recuento de cultivos.....	164
Tabla 14. Resumen de los procedimiento de limpieza previos al uso de las soluciones de limpieza/conservación utilizados en el estudio.	166
Tabla 15. Resultados expresados en tanto por ciento del número de positivos y negativos obtenidos tras conservación de las LC en solución única multipropósito.	169

Tabla 16. Resultados expresados en tanto por ciento del número de positivos y negativos obtenidos tras tratamiento con solución de povidona.....	171
Tabla 17. Resultados expresados en tanto por ciento del número de positivos y negativos obtenidos tras tratamiento con solución peróxido de hidrógeno.	172
Tabla 18. Resultados expresados en tanto por ciento del número de positivos y negativos obtenidos tras el tratamiento con la solución de limpieza Progent.....	173
Tabla 19. Resultados expresados en tanto por ciento del número de positivos y negativos obtenidos tras tratamiento con clorhexidina 0.02%.....	174
Tabla 20. Resultados expresados en tanto por ciento del número de positivos y negativos obtenidos tras aclarado de las LC sólo con solución salina.	175
Tabla 21. Valores de Ct (media \pm DE) obtenidos en la qPCR para las LC que fueron tratadas con la solución única con los diferentes métodos de limpieza previos realizados. La comparación estadística se hizo entre cada uno de los métodos de limpieza previa realizados. *P < 0.05, test U de Mann-Withney para muestras independientes.	178
Tabla 22. Valores de Ct (media \pm DE) obtenidos en la qPCR para las LC que fueron tratadas con la solución con povidona yodada con cada método de limpieza previo realizado. La comparación estadística se hizo entre cada uno de los métodos de limpieza previo realizados. *P < 0.05, test U de Mann-Withney para muestras independientes.	181
Tabla 23. Valores de Ct (media \pm DE) obtenidos en la qPCR para las LC que fueron tratadas con la solución de peróxido de hidrógeno con cada método de limpieza previo realizado. La comparación estadística se hizo entre cada uno de los métodos de limpieza previo realizados. *P < 0.05, test U de Mann-Withney para muestras independientes.	184
Tabla 24. Valores de Ct obtenidos en la qPCR para las LC que fueron tratadas con la solución con Progent con cada método de limpieza previo realizado. La comparación estadística se hizo entre cada uno de los métodos de limpieza previo realizados. *P < 0.05, test U de Mann-Withney para muestras independientes.	187

RESUMEN

*

ABSTRACT

RESUMEN

Acanthamoeba spp. son protozoos de vida libre que se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente. En contacto con la superficie ocular puede comportarse como parásito provocando la queratitis por *Acanthamoeba*, considerada una de las patologías más graves a nivel ocular. La queratitis por *Acanthamoeba* cursa con dolor, fotofobia, daño epitelial, edema y si no se trata de manera adecuada, puede provocar la pérdida irreversible de la visión. Aproximadamente el 85% de los casos de queratitis amebiana está relacionado con el uso de lentes de contacto. El uso de las lentes durante el baño, las malas prácticas de higiene, así como su limpieza con agua de grifo incrementan el riesgo de infección.

La limpieza y la desinfección de las lentes de contacto es esencial para evitar posibles infecciones corneales, por ello, existen numerosos estudios que tratan de valorar su eficacia frente a *Acanthamoeba*. Dada la ausencia de un enfoque estándar en los estudios existentes para valorar la eficacia de los productos de limpieza en la eliminación de *Acanthamoeba*, se dificulta la obtención de las mismas conclusiones.

Un factor fundamental para el buen pronóstico de la patología es la realización de un diagnóstico diferencial rápido para que la infección pueda ser tratada a tiempo. Los métodos de detección actuales requieren de material especial y personal cualificado que pueden ralentizar el proceso de diagnóstico empeorando así la patología. Por ello, se necesitan nuevas herramientas de detección para un diagnóstico temprano y preciso de la infección.

En los últimos años, el uso de las nanopartículas de oro (AuNPs) en el campo de la biomedicina ha ido creciendo. Dadas las interesantes propiedades ópticas que presentan se han empleado en la creación de biosensores colorimétricos para la

detección de diferentes secuencias de ADN con una amplia gama de aplicaciones, mostrando un gran potencial de detección.

En la primera fase de esta tesis doctoral, se desarrolló un método colorimétrico con AuNPs para la detección de material genético de *Acanthamoeba castellanii* (*A.castellanii*) mediante un cambio de color visible. Este enfoque ofrece un método sencillo, asequible y fácil de monitorear. El principio de detección se basa en la resonancia del plasmón superficial (LSPR) de las nanopartículas, que es responsable de un gran pico de extinción a una longitud de onda específica. El sistema de detección desarrollado permite la detección a simple vista de 0.02 y 0.009 μM del material genético sin amplificar de *A.castellanii* en 20 minutos y mediante análisis de color utilizando el móvil.

En la segunda fase de esta tesis doctoral se estudió la eficacia frente *A.castellanii* de varios sistemas de desinfección de lentes de contacto (LC) existentes en el mercado. Para detectar la posible presencia de la ameba, se usaron el método de detección con AuNPs diseñado en la primera fase y la PCR cuantitativa (qPCR) basada en la detección de ARN mensajero (ARNm) de *Acanthamoeba*. Las AuNPs no detectaron la presencia de ameba en las muestras extraídas tras la limpieza de las lentes de contacto. Los resultados obtenidos mostraron que todas las soluciones de limpieza empleadas tuvieron efecto en la eliminación de *A.castellanii* pero no es la misma medida. Las soluciones desinfectantes que mayor eficacia en la eliminación de la ameba mostraron fueron las basadas en peróxido de hidrógeno y el hipoclorito de sodio, seguido de la solución de povidona yodada y, por último, la solución única multipropósito. Entre los materiales de las lentes de contacto empleados, se obtuvieron menor cantidad de resultados positivos de la presencia de *A.castellanii* en las lentes rígidas permeables al gas (RPG) frente a las LC hidrofílicas. Entre los

diferentes materiales de las LC hidrofílicas (hidrogel e hidrogel de silicona) no se observaron diferencias significativas.

Esta tesis doctoral ofrece un nuevo enfoque para el diagnóstico de la queratitis por *Acanthamoeba*. Por un lado, con el diseño de un nuevo método de detección basado en AuNPs, se abre la puerta a la creación de un sistema de detección precoz de la presencia del patógeno rápido y sencillo que no requiere de material ni personal cualificado. Por otro lado, el uso de PCR cuantitativas basadas en la detección de ARNm de *Acanthamoeba* como alternativa a las PCR basadas en la detección de ADN aportan más información sobre la viabilidad de la ameba, lo que puede ser útil en la valoración del estado de la patología.

ABSTRACT

Acanthamoeba spp. are free living protozoa widely distributed in the environment. Under favourable ocular conditions, it can behave as a parasite causing *Acanthamoeba* keratitis (AK), considered as one of the most serious ocular pathologies. *Acanthamoeba* keratitis is an ocular infection characterized by pain, photophobia, epithelial damage, and edema and may lead to irreversible loss of vision if not properly treated. In developed countries, it is estimated that 85% of AK cases occur in contact lens wearers. Poor hygiene practices, the exposure to water wearing the contact lens, ineffective contact lens disinfection solutions as well as the use of tap water to clean them increases the risk of infection.

Cleaning and disinfection of contact lenses is essential to prevent corneal related infections. For this reason, numerous studies have attempted to assess their effectiveness against *Acanthamoeba*. The lack of a standard approach to assess the disinfection commercial products efficacy against *Acanthamoeba*, makes difficult to obtain accurate conclusions.

An early and differential diagnosis is considered the main factor to achieve a good prognosis of the pathology. Current detection methods rely on cultures, in vivo microscopy, or molecular biology techniques, which require bulky equipment and trained personnel and may delay the diagnosis and treatment and therefore, worsening the prognosis. Therefore, there is a pressing need for the development of new diagnostic tools are for an early and accurate assessment of the infection.

Over the last decades, the use of gold nanoparticles (AuNPs) in biomedicine has been considerably increasing. Due to their optical properties, AuNPs have been

employed for the development of colorimetric biosensors for different DNA sequences detection, showing a wide range of applications.

In the first phase of this thesis, it has been developed a new method for the detection of the genetic load of *Acanthamoeba castellanii* (*A.castellanii*) genetic material detection by a colorimetric technique using AuNPs. This approach offers a simple, affordable and easy monitoring method. The detection system is based on the surface plasmon resonance (LSPR) of AuNPs, which is responsible for a large extinction peak at a specific wavelength. This colorimetric system allows, within 20 minutes, the detection of 0.02 and 0.009 μM unamplified *A.castellanii* genome by the naked eye and by colour analysis using the smartphone.

In the second phase of this thesis, the efficacy of several commercially contact lenses disinfection systems against *A.castellanii* has been assessed. The detection of residual amoeba was analysed, firstly, using the designed AuNPs detection method and secondly by quantitative PCR (qPCR). AuNPs did not detect the presence of amoeba in the extracted samples after contact lens cleaning. The qPCR performed was based on the detection of *Acanthamoeba* mRNA. All contact lenses disinfection systems used showed to have any efficacy eliminating *A.castellanii*. The most effective solutions were those based on hydrogen peroxide and sodium hypochlorite, followed by povidone iodine solution and finally the multipurpose solution. Regarding the contact lenses material, RPG lenses showed the best results compared to soft contact lenses. No significant differences were observed between the two soft contact lenses materials.

This doctoral thesis offers a new approach for *Acanthamoeba* keratitis diagnosis. On the one hand, the design of a new detection method based on AuNPs, allowed the

development of a rapid and simple early detection system for the presence of the pathogen, requiring neither material nor qualified personnel. On the other hand, quantitative PCRs based on the mRNA *Acanthamoeba* detection were an alternative to DNA-based PCRs providing more information of the amoeba viability being useful in the assessment of pathology status.

I. INTRODUCCIÓN

1. LA SUPERFICIE OCULAR

La superficie ocular es una unidad funcional constituida por la película lagrimal, epitelio corneal, la conjuntiva, los párpados y las glándulas lagrimales (principal y accesorias) (1). Todo este conjunto protege al resto de las estructuras y tejidos oculares de lesiones y agentes externos como los patógenos o fenómenos de desecación (1, 2).

Conocer las funciones de las diferentes estructuras que la componen es importante a la hora de hacer frente a la aparición de algunas patologías oculares, como las queratitis.

1.1 LA PELÍCULA LAGRIMAL

La película lagrimal es un fluido transparente que cubre la superficie ocular. Es la primera superficie óptica del ojo y tiene la función de lubricar, nutrir y proteger la superficie ocular garantizando la transparencia y la estabilidad del sistema visual (3). Protege el epitelio de la córnea contra los agentes externos del ambiente gracias a la secreción de lactoferrinas, lisozimas, y defensinas, entre otras (4). Además, la película lagrimal es de gran importancia, ya que es la primera capa de la superficie ocular con una función refractiva (5).

Tradicionalmente, la película lagrimal humana se ha descrito como un modelo estructural de tres capas: una capa mucínica, una capa acuosa intermedia y una capa lipídica (6). Sin embargo, la investigación sobre su estructura sigue evolucionando, y actualmente la evidencia sugiere que consiste en una capa mucosa hidratada cubierta por una capa lipídica que está en contacto con el ambiente externo (7).

La parte mucosa de la película lagrimal está constituida por mucinas: por un lado, mucinas transmembrana que están adheridas al epitelio corneal formando la glicocálix y, por otro lado, mucinas formadoras de gel. Además, en la parte más acuosa se encuentran las mucinas solubles. Las mucinas más comunes que forman la glicocálix son la MUC1, MUC4 y MUC16 (8-10) que tienen como función principal actuar de barrera. Las células caliciformes (células de Goblet) del epitelio conjuntival son la principal fuente de las mucinas formadoras de gel MUC2, MUC5B y MUC5AC siendo ésta última la más prevalente en la lágrima. Estas mucinas contribuyen a la estabilidad de la película lagrimal siendo responsables de las propiedades reológicas de la lágrima con su capacidad de retención de agua y formación del gel mucoso (7, 11). Por otro lado, las mucinas solubles son sintetizadas principalmente en la glándula lagrimal. Entre ellas se encuentra la MUC7, expresada principalmente en los acinos de la glándula lagrimal (12). Su función a nivel ocular no está clara, sin embargo, se cree que puede tener un papel bactericida dada su función en otros fluidos (13).

La capa lipídica de la película lagrimal actúa como interfaz entre la capa acuosa y el aire y es producida principalmente por las glándulas de Meibomio. Esta capa está formada por una parte polar en contacto con la capa mucosa y una capa más gruesa de lípidos no polares en la interfaz del aire. Entre sus funciones principales se encuentra la de reducir la tensión superficial, lubricar durante el parpadeo, evitar la evaporación rápida de la lágrima y mantener el fluido lagrimal en los márgenes del párpado (14, 15).

1.2 LA CONJUNTIVA

La conjuntiva es una membrana mucosa transparente que se caracteriza por estar muy vascularizada. Cubre la superficie del globo ocular hasta el limbo y la parte interna de los párpados. Anatómicamente se divide en tres regiones: conjuntiva tarsal o palpebral, conjuntiva del fondo de saco o fórnix y conjuntiva bulbar. Histológicamente está compuesta por un epitelio escamoso estratificado y no queratinizado. Dentro de esta capa se encuentran intercaladas las células de Goblet. En una capa subyacente más profunda está la capa conocida como sustancia propia o submucosa conjuntival, formada por tejido linfoide y fibroso. Por último, hay una capa fibrosa más profunda que contiene vasos sanguíneos y nervios y las glándulas de Krause (16).

La conjuntiva confiere protección mecánica e inmunitaria a la superficie ocular. Las células de Goblet secretan mucinas a la película lagrimal que le confieren viscosidad para humectar y proteger la superficie ocular. Además, liberan citoquinas que modulan la respuesta inmune (17, 18). El papel de la conjuntiva hace que sea un elemento clave en el mantenimiento de la homeostasis de la superficie ocular.

1.3 LA CÓRNEA

La córnea humana es un tejido avascular responsable de entre tres cuartos y dos tercios de la capacidad del sistema visual del ojo humano, siendo su transparencia e integridad esenciales para cumplir dicha función (19). Además, la córnea es uno de los tejidos con mayor inervación sensitiva del cuerpo humano (20, 21). Tiene dos funciones importantes, por un lado, la refractiva y por otro de barrera contra los patógenos. Estas funciones se cumplen gracias a las uniones estrechas (*tight junction*, del inglés) y la regeneración continua de las células en división en la capa de células

basales. Histológicamente está formada por cinco capas: el epitelio, la membrana de Bowman, el estroma, la capa de Dua, la membrana de Descemet y el endotelio (Figura 1).

El **epitelio** de la córnea es una estructura escamosa formada por entre cuatro y seis capas de células estratificadas no queratinizadas. Las células epiteliales de la córnea tienen un promedio de vida útil entre 7-10 días (22). Mide alrededor de 50 μm y contiene tres tipos de células; las células superficiales o apicales, las células intermedias o alares y las células basales. Las células apicales presentan microvellosidades y micropliegues en su superficie que garantizan el máximo contacto con las mucinas de la película lagrimal. Estas células se unen entre sí mediante uniones estrechas “tight junctions” que confieren una permeabilidad a la superficie protegiéndola de agentes externos. La siguiente capa, la intermedia, cuenta con 2-3 capas celulares de células alares que están conectadas entre sí mediante desmosomas, uniones adherentes y uniones gap. La última capa del epitelio, llamada la capa basal, consiste en una sola capa de células con forma de columnas. Estas células son las únicas del epitelio corneal con capacidad de mitosis, encargándose así de la repoblación de la córnea (23). Las células basales se unen entre sí mediante uniones adherentes y uniones gap y a la membrana basal mediante hemidesmosomas manteniendo la integridad de la córnea.

En la parte posterior del epitelio corneal y anterior al estroma se encuentra **la membrana de Bowman**. Es una capa acelular que mide entre 8 y 12 μm de espesor y está compuesta por fibras de colágeno. La membrana de Bowman no se regenera, además, algunos estudios han confirmado que su espesor disminuye con la edad (24, 25). La función de esta capa es principalmente ayudar a la córnea a mantener su forma y proteger el plexo nervioso subepitelial que recorre desde el estroma,

asimismo, esta capa facilita la recuperación de las heridas del estroma, así como ayuda a mantener su transparencia (26). Curiosamente, la ausencia congénita de la membrana de Bowman no impide la visión correcta. Asimismo, el hecho de quitar esta membrana en algunas cirugías como la queratectomía fotorrefractiva no afecta a la visión ni a la estructura de la córnea (27, 28).

El estroma, mide 500 μm aproximadamente en el ser humano y representa alrededor del 90% del volumen total de la córnea. Está formado por una red de fibras de colágeno y una matriz extracelular compuesta por agua, sales inorgánicas, proteoglicanos y glicoproteínas (29). Las fibras de colágeno están formadas principalmente por colágeno tipo I, IV y V y están ordenadas de tal manera que garantizan la transparencia de la córnea (30). Los proteoglicanos rodean estos complejos manteniendo así la organización de las fibrillas (31). Los queratocitos son los principales componentes celulares del estroma, aunque sólo representan un 5-10% de su volumen total. Se encuentran localizados entre las láminas y son los responsables de la síntesis de proteoglicanos, colágeno y de las metaloproteasas de matriz (MMP) (32).

Entre el estroma y la membrana de Descemet se encuentra la **capa de Dua**, descrita en 2013 (33). Esta capa es acelular y, a pesar de tener un espesor de sólo 10 μm , tiene una gran resistencia mecánica debida a la presencia de lamelas de colágeno tipo I que se orientan en diferentes direcciones (31, 43).

La membrana de Descemet es la capa basal del endotelio corneal. En el ser humano tiene un grosor de 3 μm al nacer y puede crecer hasta llegar a los 10 μm en adultos (34). La membrana está compuesta por colágeno tipo IV y proteínas como laminina y fibronectina, componentes que se encuentran en la mayoría de las membranas basales (35). Sin embargo, a diferencia del resto de membranas basales

encontradas en diferentes órganos, en la membrana de Descemet el colágeno tipo VIII es el más abundante (19, 36).

La membrana de Descemet tiene un papel importante en la homeostasis corneal y sus características cumplen un papel fundamental en el mantenimiento de la estructura y curvatura de toda la córnea. Además, ancla el endotelio a la córnea y permite la entrada de nutrientes, factores de crecimiento, y citocinas al estroma corneal (34, 37, 38).

En último lugar, la capa más interna y en contacto con el humor acuoso es **el endotelio corneal**, formado por una sola capa de células hexagonales. Con respecto al crecimiento de las células endoteliales, no hay evidencias de que se dividan durante el desarrollo, de tal manera que, a los 5 años de edad, la densidad de dichas células es de 3500 células/mm² (39, 40). Con los años, la densidad de las células disminuye a un ritmo del 0.6% por año aproximadamente, de modo que el número de las células endoteliales alcanza alrededor de las 2300 células/mm² en la octava década de la vida humana (41-43).

La capa endotelial de la córnea tiene la función principal de mantener la transparencia corneal asegurando que permanezca en un estado de deturgescencia con el mantenimiento del contenido en agua del estroma del 78% (44). Esta función se regula gracias al bombeo de iones del estroma al humor acuoso. Este proceso es mediado por la bomba sodio-potasio de la membrana y por la vía de la anhidrasa carbónica intracelular (44, 45).

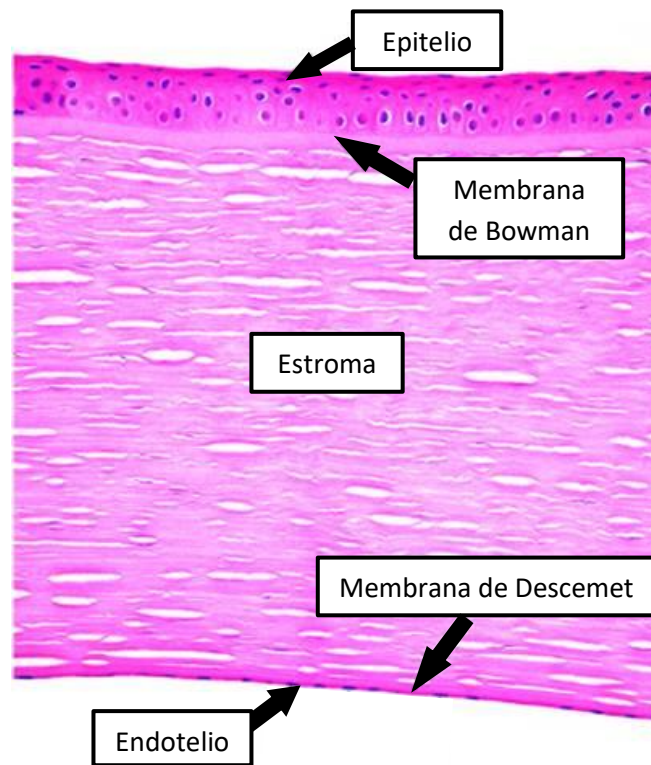


Figura 1. Corte histológico de la córnea en el que se identifican sus diferentes capas. Imagen modificada de Meeney y Mudhar, 2013 (46).

1.4 INFECCIONES OCULARES

Las infecciones oculares son un problema oftalmológico a nivel mundial, pudiendo causar disminución de la visión y ceguera (47, 48). Existe una amplia variedad de infecciones oculares que pueden afectar a diferentes estructuras del ojo provocando conjuntivitis, blefaritis, dacriocistitis, queratitis, endoftalmitis, entre otros. Estas infecciones oculares pueden estar causadas por bacterias, hongos, virus y parásitos.

Las queratitis microbianas son consideradas la quinta causa más común de ceguera en el mundo (49). Requieren de un diagnóstico inmediato, ya que pueden

progresar rápidamente. Existen diferentes condiciones que alteran la superficie corneal y que se consideran factores de riesgo como el uso de lentes de contacto, traumatismos físicos y químicos, abrasiones corneales, cirugía refractiva, la presencia de diabetes, enfermedades inmunosupresoras y el uso de esteroides tópicos (50). El uso de lentes de contacto es el principal factor predisponente al desarrollo de queratitis infecciosa en los países desarrollados (51-53).

El tipo de organismo causante de la queratitis infecciosa varía según la región geográfica y los factores de riesgo del paciente. La queratitis bacteriana es la forma más común de queratitis en América del Norte, Europa y Australia (49). Las bacterias causantes más comunes son *Staphylococcus aureus*, estafilococos coagulasa-negativos, *Streptococcus pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* y especies de la familia *Enterobacteriaceae* (54, 55). *P. aeruginosa* es el microorganismo más común implicado en la queratitis bacteriana entre los usuarios de lentes de contacto (56).

En países con climas tropicales, las queratitis fúngicas tienen una frecuencia igual o mayor que las bacterianas. Esto se ha comprobado en estudios realizados en Asia, donde las tasas de queratitis fúngica frente a bacterianas oscilan en un rango del 56.1-82.0% (57, 58). Las principales especies causantes de la patología son *Candida* spp, *Aspergillus* spp y *Fusarium* spp (55, 59).

Las queratitis víricas suelen estar relacionadas con el virus del herpes simple, el de la varicela-zóster y adenovirus (60). Estudios transversales en población asiática estimaron que del 0.192% y 0.148% de las queratitis infecciosas, el 0.11%, y el 0.065% eran debidas a causas víricas por delante de bacterias y hongos (61, 62).

Los casos de queratitis por *Acanthamoeba* en todo el mundo parecen estar entre el 1% y el 3% de todas las queratitis microbianas. Este porcentaje varía, pudiendo ser

mayor según la región (63-65). Es una patología poco común, pero devastadora. Las especies identificadas que pueden causar queratitis son: *A. hatchetti*, *A. griffini*, *A. rhysodes*, *A. lugdunensis*, *A. quina*, *A. culbertsoni*, *A. castelanii* y *A. polyphaga* siendo estas dos últimas las más comunes (66) .

Dada la gran variedad de patógenos que pueden provocar las queratitis microbianas, es importante conocer las características de cada patología para llevar a cabo un correcto diagnóstico diferencial y seguir un correcto protocolo de actuación.

2. ACANTHAMOEBA SPP

2.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

A principios del siglo veinte, Puschkarew aisló una ameba de una muestra de polvo a la que denominó *Amoeba polyphagus* y que fue renombrada más tarde como *Acanthamoeba polyphaga* (67) (68). En 1930, Aldo Castellani confirmó la presencia de una ameba en un cultivo de *Cryptococcus pararoseus*, la cual fue denominada más tarde por Douglas como *Hartmannella castellanii* (69, 70). Un año después, Volkonsky dividió este género en otros tres nuevos según la morfología de sus quistes: *Hartmannella* quistes con cubierta redondeada y lisa, *Glaeseria* quistes con división nuclear y *Acanthamoeba* a los quistes con doble pared, la externa irregular, siendo ésta la primera vez que se mencionaba el género *Acanthamoeba* (71).

En 1967, Page consideró que junto con la morfología de los quistes, la presencia de “acantopodos” (pseudópodos filiformes característicos del género) eran características suficientes para identificar el género *Acanthamoeba* (68).

La idea de que la *Acanthamoeba* puede causar enfermedades en humanos fue desarrollada por Culbertson et al. en 1958 (72) quienes aislaron una ameba que contaminó cultivos de células de riñón de mono mientras se buscaba una vacuna contra el virus de la polio. Esta ameba se inoculó en ratones y monos tratados con corticosteroides causándoles un síndrome encefálico y su posterior muerte, por lo que Culbertson planteó la hipótesis de que podría existir una infección similar en humanos. Este aislado se denominó posteriormente *Acanthamoeba culbertsoni*.

2.2 TAXONOMÍA

La *Acanthamoeba* pertenece al subreino de los protozoos. La clasificación taxonómica clásica en la que se dividió a los protozoos en cuatro grupos ha sido sustituida actualmente por una clasificación monofilética basada en la información bioquímica, morfológica y filogenética propuesta por el comité de Sistemática y Evolución de la Sociedad Internacional de Protistólogos. En esta clasificación, el género *Acanthamoeba* ha sido clasificado dentro del super grupo Amoebozoa: *Acanthamoebidae* (73).

La primera clasificación de las especies que componen el género *Acanthamoeba* fue definida por Pussard y Pons en 1977 (74). Las 18 especies de *Acanthamoeba* descritas hasta ese momento se dividieron en tres grupos en base al tamaño y la morfología de los quistes (Figura 2). El grupo I engloba especies con quistes de gran tamaño (diámetro $\geq 18 \mu\text{m}$), con una pared externa (ectocisto) redondeada y lisa, fácilmente diferenciable de otra pared interna (endocisto) en forma estrellada. El grupo II, el más común, comprende 10 especies y engloba quistes pequeños o medianos (diámetro $< 18 \mu\text{m}$). La pared interna (endoquiste) es globosa, ovoide o poligonal y la pared externa muy visible y con el tamaño del poro grande. El grupo III es el menos frecuente comprendiendo 5 especies. El diámetro promedio de los quistes es $< 18 \mu\text{m}$. La pared externa es fina, lisa u ondulada mientras que el ectocisto es generalmente redondeado pero nunca estrellado o poligonal (75). Sin embargo, esta clasificación no es siempre fiable ya que la morfología de los quistes puede variar según las condiciones ambientales y de cultivo.

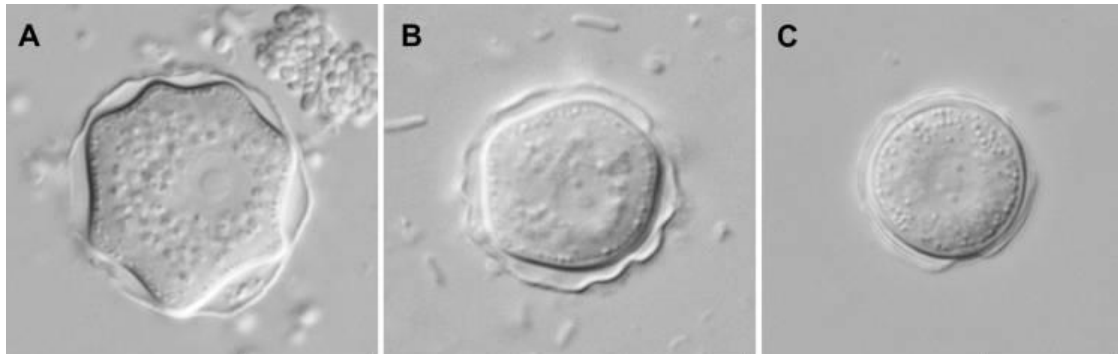


Figura 2. Quistes de *Acanthamoeba* vistos con microscopio de contraste. Clasificación A: grupo I ; B: grupo II ; C: grupo III. Lorenzo-Morales et al. 2015 (76).

Por otro lado, también se han seguido criterios inmunológicos, bioquímicos y fisiológicos para identificar las diferentes especies de *Acanthamoeba*. Sin embargo, estos criterios tampoco son fiables para su clasificación ya que se comprobó que muchas especies comparten varias de estas características.

La búsqueda de un sistema rápido, eficaz y que solventase las ambigüedades existentes, hizo que en 1996 se propusiera una clasificación molecular, basada en la secuencia del gen de la subunidad pequeña 18S del ARN ribosomal (ARNr). Se identificaron 4 genotipos denominados T1, T2, T3, T4 con una diferencia entre secuencias de al menos el 6% (77). Años más tarde, dentro del mismo grupo de investigación, se identificaron ocho nuevos tipos de secuencia con una diferencia entre secuencias del 5% (78). Hasta la fecha se han identificado un total de 23 genotipos (79-87). El genotipo T4 es considerado el más abundante en la naturaleza y el más relacionado con patologías seguido por los genotipos T3 y T11 (88).

2.3 MORFOLOGÍA Y CICLO BIOLÓGICO

El término ameba deriva del griego amoibè (αμοιβή), que significa cambio de forma, y engloba a los protozoos que se desplazan mediante pseudópodos, entre ellos, la *Acanthamoeba*. Por otro lado, el término acanto (en griego "acanto" significa "picos") indica la presencia de prolongaciones de la membrana plasmática denominadas acantopodos las cuales permiten el movimiento, la adhesión y captura de alimento.

El ciclo biológico de la *Acanthamoeba* presenta dos estadios : el trofozoíto, que es la fase activa en la cual la ameba puede replicarse, y el quiste, que es la fase latente que el microorganismo adquiere cuando las condiciones ambientales no son favorables (Figura 3). Existe un tercer estadio que es la forma flagelada presente en la ameba *Naegleria*.

Los trofozoítos de *Acanthamoeba* tiene un tamaño comprendido entre 14 y 40 μm . En su citoplasma podemos encontrar orgánulos típicos de células eucarióticas superiores: complejo de Golgi, retículo endoplásmico liso y rugoso, ribosomas libres, mitocondrias lisosomas, vacuolas digestivas, vacuolas con glucógeno y microtúbulos. Generalmente poseen una o varias vacuolas contráctiles encargadas de la regulación osmótica (89-91). Poseen un único núcleo con un nucleolo de tamaño grande (89). Son organismos aeróbicos, aunque se ha comprobado que pueden adaptarse a ambientes con baja concentración de oxígeno (92, 93). Son capaces de desplazarse tanto en medios sólidos como acuosos mediante la formación de pseudópodos a una velocidad media de 0.8 $\mu\text{m}/\text{segundo}$, bastante rápido en comparación con otras células. Se alimentan de partículas orgánicas, bacterias, algas, hongos y detritus presentes en el ambiente mediante los mecanismos de fagocitosis y pinocitosis (94).

La reproducción celular es asexual y ocurre por fisión binaria. Tienen un tipo de división denominada meta mitosis caracterizada por la desaparición del nucléolo y la membrana nuclear y la formación del huso mitótico (95).

El proceso de diferenciación por el cual las amebas pasan de la forma de trofozoíto a quiste se denomina enquistamiento. Este fenómeno puede ser inducido por algunas alteraciones del entorno como la escasez de alimento, variaciones osmóticas, de oxígeno o de pH, la presencia de compuestos químicos o desinfectantes, temperaturas extremas. En este proceso, el trofozoíto adquiere forma redondeada, y se forma una pared celular doble formándose así el quiste. Su tamaño oscila entre 13-20 μm dependiendo de la especie. La pared externa, denominada ectoquiste, es rugosa y está compuesta por proteínas, y la pared interna, el endoquiste, está formada por celulosa y puede tener forma estrellada, poliédrica o esférica. Ambas paredes se fusionan en determinados puntos formando el ostiolo (Figura 3). Las dos capas normalmente están separadas por un espacio compuesto de fibrillas. Durante el enquistamiento se observa una disminución de los niveles celulares de ARN, glucógeno, fosfolípidos y proteínas, reduciéndose el volumen celular y el peso en seco (96, 97) mientras que el ADN se mantiene. Los quistes son muy resistentes y varios estudios han demostrado que pueden permanecer viables y conservar su patogenicidad durante años, por lo que son fundamentales en la transmisión de las enfermedades producidas por *Acanthamoeba* (98, 99). Cuando las condiciones externas vuelven a ser favorables se produce el desenquistamiento por el cual la ameba se activa y sale por los opérculos del quiste revertiendo a la forma de trofozoíto (68, 100).

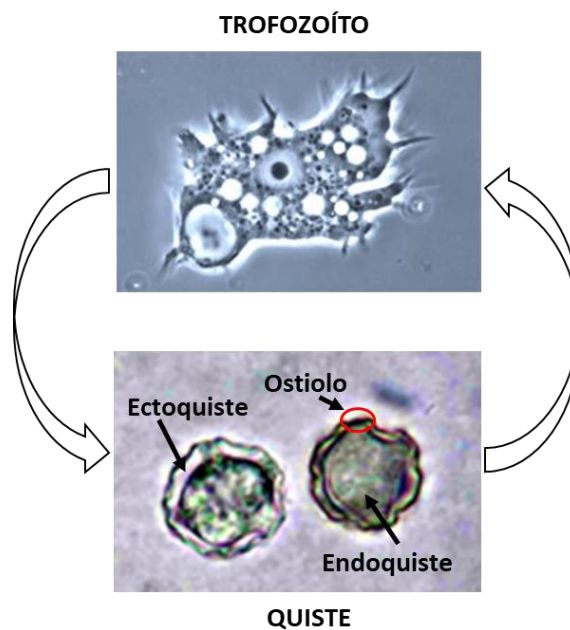


Figura 3. Ciclo biológico de las especies del Género *Acanthamoeba*. Trofozoíto: Imagen de Carnt et al. 2015 (101). Quiste con sus partes: Imagen modificada de la biblioteca de imágenes de parásitos del CDC (102).

2.4 DISTRIBUCIÓN

Las amebas pertenecientes al género *Acanthamoeba* se encuentran ampliamente distribuidas en el medio ambiente habiendo sido aisladas de una gran variedad de muestras. En el agua se ha aislado de ríos, playas, piscinas, lagos, agua embotellada mineral, agua residual, agua potable. Se ha aislado del suelo, arena, polvo, abono; del aire en conductos de ventilación, aires acondicionados, humidificadores. También en vegetales, estuches de lentes de contacto, en material de hospitales. Por otro lado, en humanos han sido aisladas en muestras tomadas de garganta, cavidades nasales, intestinos, tejido cerebral y pulmonar infectado, lesiones cutáneas, biopsias de córnea y líquido cerebroespinal (103-106).

La abundancia y diversidad de *Acanthamoeba* spp. en el ambiente es debido a su gran tolerancia a variaciones de pH, temperatura, osmolaridad y salinidad especialmente en su forma quística (98, 107) adaptándose así a condiciones muy extremas (108) (109).

2.5 PATOGENEICIDAD DE ACANTHAMOEBA SPP.

Acanthamoeba es una ameba de vida libre cuyo hábitat principal es la naturaleza, pero también puede comportarse como patógeno oportunista si encuentra un huésped. La vía de entrada de *Acanthamoeba* puede ser a través de los ojos, las fosas nasales o la piel dañada o con úlceras. Las patologías asociadas son la queratitis por *Acanthamoeba* (QA), la encefalitis granulomatosa amebiana y la Acanthamebiasis cutánea (110, 111).

3. QUERATITIS AMEBIANA

3.1 EPIDEMIOLOGÍA

El primer caso de queratitis por *Acanthamoeba* (QA) se notificó en el Reino Unido en 1974 (112) y en 1984 se describió el primer caso de queratitis amebiana asociado al uso de lentes de contacto blandas (113). La incidencia de QA en el mundo entre 1980 y 1990 se estima alrededor de 1-2 casos por millón de usuarios de lentes de contacto (LC) (114). Aunque es difícil establecer cifras exactas, la incidencia ha ido creciendo con el aumento de usuarios de lentes de contacto y las mejoras en los métodos de diagnóstico (115-117). En Estados Unidos se estima que la tasa de referencia de aparición de la QA es ahora aproximadamente 10 veces mayor que antes de 2004 (118, 119).

Seal et al. (120) concluyen que puede esperarse una incidencia de QA anual de 1 por cada 30.000 usuarios de lentes de contacto de hidrogel en Inglaterra, Europa, Hong Kong y otras áreas donde la adaptación de LC e higiene son similares. En países como Japón, donde la prevalencia de la miopía es alta y el uso de lentes de ortoqueratología es común, el número de infecciones es 15 veces mayor que en Estados Unidos (121). Por otro lado, en países en desarrollo, como India, *Acanthamoeba* representa el 2% de los casos de úlceras corneales con cultivo positivo (122).

3.2 FACTORES DE RIESGO

Existe una variedad de factores que pueden favorecer el desarrollo de la infección. En los países desarrollados, el 85% de los casos de queratitis por *Acanthamoeba* ocurren en usuarios de lentes de contacto principalmente debido a su mal uso (123-126). Los factores que aumentan el riesgo de QA son la falta de higiene y limpieza, falta de reemplazo de las lentes, el uso de soluciones no esterilizadas/ agua de grifo para su conservación o el uso de las lentes durante el baño (127). Además, las lentes de contacto pueden servir como vehículo para la entrada del patógeno en el ojo o el mismo uso de las LC puede causar lesiones corneales que propicien que los organismos penetren.

Por otro lado, en los países en vías de desarrollo donde el uso de lentes de contacto no es tan común, los traumatismos corneales y la exposición de la córnea a tierra y agua contaminadas son los factores de riesgo principales (128-131). Estas razones también parecen ser la causa en aquellas personas que no son usuarias de LC (122, 132).

En cuanto al clima, parece existir una mayor incidencia de QA durante el verano y temporada de lluvias probablemente relacionado con el aumento de *Acanthamoeba* en el medio ambiente y de las actividades en el agua (127).

3.2.1 *Acanthamoeba* y lentes de contacto

El uso de LC puede producir pequeñas abrasiones corneales dañando así la integridad del epitelio corneal y afectando a la barrera que la protege de los microorganismos. Además, las LC también pueden producir daños indirectos al causar hipoxia e hipercapnia corneales. Estos factores se ven aumentados con el uso

de LC con baja permeabilidad al oxígeno y con comportamientos como dormir con LC. La disminución del oxígeno en las células de la córnea conduce a una acumulación de dióxido de carbono y a cambios importantes en las vías metabólicas normales (133).

La ruptura de la barrera protectora permite la adhesión de protozoos al epitelio y el desarrollo de la invasión en las restantes capas de la córnea. Sin esta ruptura, la infección no se convierte en QA. Además del efecto traumático o metabólico, las LC pueden servir de vehículo para la transmisión de *Acanthamoeba* al ojo (134).

La queratitis por *Acanthamoeba* puede aparecer asociada al uso de todo tipo de lentes de contacto: rígidas permeables al gas (RPG), cosméticas, lentes híbridas o lentes blandas, siendo con estas últimas más frecuente (121, 135-141). La adhesión de *Acanthamoeba* a las LC depende de muchos factores, como el material de la lente (142, 143) así como la concentración y el tiempo de exposición al patógeno (140). El contenido en agua de las lentes de contacto y su ionicidad interfieren en la adhesión de quistes y trofozoítos. Así, algunos estudios han encontrado una mayor adhesión en las lentes con mayor contenido en agua (142, 144-146). Otro factor que parece influir en la adhesión del patógeno es la rugosidad de la superficie de la lente de contacto siendo mayor la adherencia a mayor rugosidad (147-149).

Los trofozoítos parecen adherirse más que los quistes al material de las LC (150), y entre las LC blandas, se ha observado mayor adherencia a las lentes de hidrogel de silicona (HiSi) que a las lentes de hidrogel convencional (151-153). Además, entre las generaciones de LC de hidrogel de silicona, las lentes de primera generación tienen una mayor afinidad con las especies de *Acanthamoeba* en comparación con las LC de segunda y tercera generación (151, 152). La adhesión del trofozoíto a la LC se

establece mediante filopodios ubicados en la base de la ameba (154) mientras que en los quistes, la adhesión se produce a través de sustancias adhesivas en el exoquiste (155).

Las LC RPG están menos relacionadas con la aparición de la QA, aunque hay algunos casos clínicos que relacionan las lentes rígidas con la QA (133). Las lentes de ortoqueratología actúan como tratamiento reduciendo la progresión de la miopía, se utilizan durante la noche y provocan un aplanamiento de la córnea. Durante su uso puede generarse hipoxia y se han descrito casos de QA con su uso (156).

A pesar del uso de sistemas de desinfección y mantenimiento de las lentes de contacto, la QA puede desarrollarse ya que no todos son eficaces contra *Acanthamoeba* (150, 157-162).

3.3 SIGNOS Y SÍNTOMAS

Los signos y los síntomas no siempre son específicos de la QA y pueden confundirse con el de otras patologías oculares. En la etapa inicial de la infección, que afecta al epitelio, se pueden observar signos como erosiones puntiformes, pseudodendritas, opacidades subepiteliales o hiperemia conjuntival. En esta etapa el paciente puede sufrir fotofobia, visión borrosa, enrojecimiento, lagrimeo, y dolor de diversa intensidad. Con la progresión de la enfermedad, *Acanthamoeba* invade el estroma produciendo un infiltrado en forma de anillo conocido como el anillo de Wessely, característico de la patología. Otros signos clínicos son los infiltrados estromales, la inflamación central, la opacificación corneal, la aparición de úlceras, hipopion (134, 163). Normalmente la infección se desarrolla de manera unilateral.

El dolor manifestado por el paciente se asocia a la progresión de la enfermedad y a la inflamación del estroma, siendo más intenso en caso de que haya infiltración perineural. Algunas complicaciones que pueden aparecer son las sinequias anteriores, glaucoma secundario (164), atrofia del iris, catarata (165), escleritis (166). Algunas de estas complicaciones podrían estar asociadas a la toxicidad de los tratamientos utilizados (167).

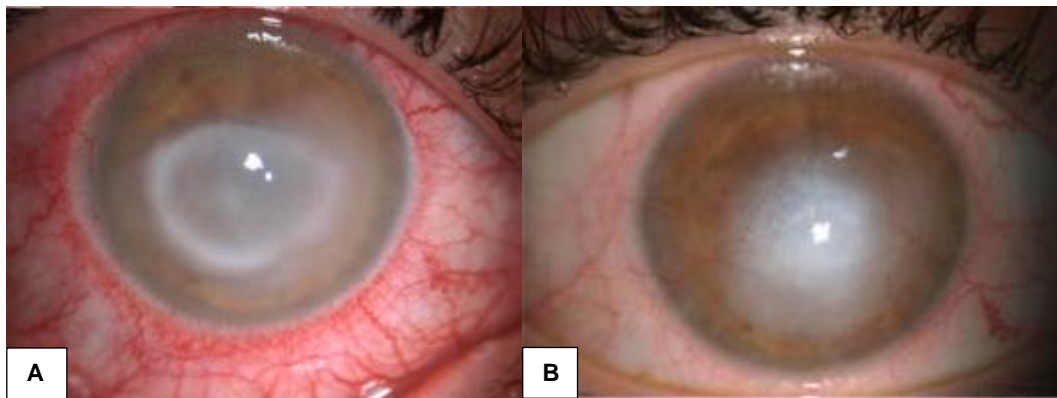


Figura 4. Imágenes representativas de la queratitis por *Acanthamoeba*. **A)** Defecto epitelial y anillo de infiltrado estromal anular. **B)** Cicatrización corneal con neovascularización profunda y superficial. Imagen tomada de Varacalli et al. 2021 (168).

3.4 PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD

La patogénesis de la enfermedad por *Acanthamoeba* está mediada por una serie de procesos desencadenantes descritos a continuación (Figura 5).

3.4.1 Adhesión

El primer paso es la adhesión de los trofozoítos a la superficie del tejido. Este proceso se realiza mediante la expresión de unas proteínas de membrana conocidas como proteínas de unión a manosa (MBP del inglés: *mannose-binding protein*) que se unen a las glicoproteínas que contienen manosa (169). También pueden unirse mediante otras adhesinas como las proteínas de unión a laminina, constituyentes de la matriz extracelular (170).

Uno de los factores de los que depende la adhesión de *Acanthamoeba* al epitelio, es el estado fisiológico de la córnea. Modelos de experimentación con animales han mostrado que la abrasión o traumatismo leve en la córnea es necesario para que haya una infección corneal, así como las lentes de contacto se comportan como vectores que facilitan la transmisión del patógeno a la córnea (171). Los traumatismos o abrasiones corneales desencadenan una mayor expresión de glicoproteínas reactivas y, por tanto, hay una mayor adhesión de las amebas a la córnea dañada, en comparación con la córnea sana (172).

3.4.2 Efecto citopático

Después de la unión de la *Acanthamoeba* al epitelio corneal, se produce la cascada patógena con la destrucción del epitelio corneal y la penetración en la membrana de Bowman subyacente. Los trofozoítos de *Acanthamoeba* pueden utilizar

diferentes mecanismos independientes para inducir efectos citopáticos en células diana, como citólisis directa, fagocitosis y apoptosis. Taylor et al. (173) demostraron que el mecanismo de los efectos citopáticos mediados por *Acanthamoeba* depende de los cambios en la estructura del citoesqueleto y de la actividad de los canales de calcio.

Acanthamoeba expresa unas glicoproteínas en su membrana denominadas ecto-ATPasas que hidrolizan el ATP dando como producto ADP. Este puede unirse a receptores celulares, entre ellos los receptores purinérgicos P2 causando un incremento en la concentración de calcio intracelular lo que activa diferentes cascadas de señalización que llevan a la muerte de la célula por apoptosis (174).

La ameba libera enzimas hidrolíticas como son las proteasas y fosfolipasas, que producen el efecto citopático. Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de proteínas y se sabe que *Acanthamoeba* produce tres tipos diferentes, serina proteasas, cisteína proteasas y metaloproteasas. En la patogénesis de la *Acanthamoeba* se ha observado un aumento de los niveles de proteasas que parecen facilitar la invasión. La exposición a manosa estimula la producción de una serina proteasa de 133 kDa denominada proteína inducida por manosa (MIP133). Esta producción de MIP133 parece ser otro elemento crucial de la cascada patógena de la QA que facilita la destrucción del epitelio corneal y apoptosis (175) (176) (177).

El mecanismo por el cual la *Acanthamoeba* absorbe sus alimentos (bacterias) se conoce como fagocitosis y parece estar involucrado en su patogénesis. Así, mediante la inducción de re-arreglos en el cito-esqueleto y la formación de amoebastomas en su superficie celular, puede fagocitar las células epiteliales de la córnea (178).

3.4.3 Invasión estromal

Después de la unión y descamación del epitelio corneal, el siguiente paso en la queratitis por *Acanthamoeba* implica la invasión del estroma corneal. Para ello, *Acanthamoeba* utiliza las diferentes proteasas para degradar el estroma. Las serinas proteasas tienen la capacidad de degradar el colágeno tipo I, que representa la principal proteína estructural que mantiene la integridad del estroma (179). Un signo clínico característico de las queratitis por *Acanthamoeba* es el infiltrado estromal en forma de anillo. Se cree que las enzimas colagenolíticas podrían tener un papel en la generación de este anillo (180) aunque también se ha sugerido que es producto del infiltrado de neutrófilos.

Además, las proteasas también son capaces de degradar fibronectina, laminina, IgA secretora, IgG, plasminógeno, albúmina de suero bovino, fibrina y fibrinógeno. La IgA secretora es la principal inmunoglobulina en la lágrima y actúa como barrera primaria contra los microbios patógenos.

La *Acanthamoeba* patógena también puede usar activadores de plasminógeno para catalizar la escisión del plasminógeno del huésped para formar plasmina, que a su vez activa las MMP que degradan las membranas basales y los componentes de la matriz extracelular como el colágeno, las fibronectinas y la laminina (181, 182). Por tanto, las MMP están implicadas en la remodelación tisular (183, 184).

3.4.4 Neuritis

Después de adherirse, destruir el epitelio corneal, penetrar en la membrana de Bowman y descamar el estroma, la cascada patógena de la queratitis por *Acanthamoeba* parece detenerse antes de la invasión del endotelio corneal.

A diferencia de otras infecciones oculares como queratitis por *Pseudomonas*, QA rara vez produce infección intraocular y endoftalmitis (185-188). En estudios in vitro, Clarke et al. (188) sugirieron que los trofozoítos usan la serina proteasa MIP-133 para penetrar en la membrana de Descemet y en el endotelio corneal, pudiendo así, entrar en la cámara anterior del ojo. Sin embargo, al inyectar trofozoítos en la cámara anterior, estos trofozoítos se eliminaron debido a la formación de un intenso infiltrado de neutrófilos. Esta respuesta inmune que se produce podría ser la razón por la que se controla la infección impidiendo que penetre a nivel intraocular.

Los datos histopatológicos y clínicos indican que los trofozoítos a menudo infiltran los nervios corneales, produciendo queratoneuritis radial en pacientes con queratitis por *Acanthamoeba*. Los estudios in vitro han demostrado que los trofozoítos responden quimiotácticamente a las células derivadas de la cresta neural (189). Además, los trofozoítos pueden matar las células nerviosas por citólisis directa y apoptosis (190). Esta respuesta de los trofozoítos que provoca daño nervioso, puede ser la explicación del dolor intenso asociado con esta infección.

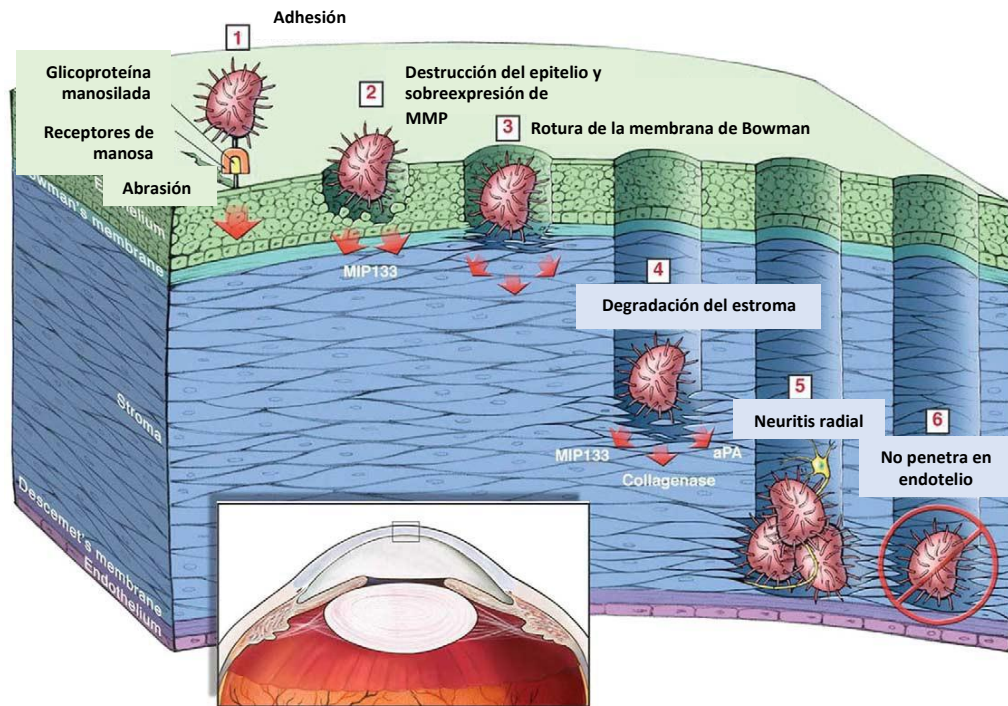


Figura 5. Proceso de patogénesis de la queratitis por *Acanthamoeba*. Imagen modificada de Clarke et al. 2006 (191).

3.4.5 Respuesta inmunológica

La baja incidencia de queratitis por *Acanthamoeba* lleva al planteamiento del importante papel que juega la respuesta inmune del hospedador en el desarrollo y severidad de la patología. La respuesta inmune puede ser innata o adaptativa (192, 193). Los macrófagos y neutrófilos son células del sistema inmune innato que juegan un papel significativo en la resolución de QA. Estudios in vitro han demostrado su papel destruyendo a los trofozoítos y a los quistes lisados (194-198). Hurt et al. (198) encontraron que los neutrófilos parecen mostrar más efectividad que los macrófagos frente a los quistes.

La exposición a *Acanthamoeba* también desencadena la respuesta humoral, aunque el papel de los anticuerpos no está completamente definido. Los anticuerpos

pueden prevenir la adhesión del patógeno a las células huésped, inhibir la motilidad de las amebas o neutralizar su citotoxicidad. Se pueden diferenciar entre anticuerpos séricos y de secreción de mucosas. Walochnik et al. (199) observaron diferencias en la expresión de anticuerpos IgG y especialmente IgA en el suero sanguíneo de sujetos con QA siendo su inmunoreactividad mayor contra la cepa no patógena que contra la cepa patógena. En un estudio in vitro en el que se inmunizaron intramuscularmente hámsteres chinos con antígenos de *Acanthamoeba*, se observó una producción elevada de anticuerpos séricos, pero el desarrollo de la QA prosiguió (200). Esto demostró la importancia de la IgA de las lágrimas y la falta de respuesta protectora de la IgG sérica en el caso de QA. Por otro lado, al cambiar a inmunización por vía oral en el mismo modelo, así como en cerdos, sí que se observó protección, que parecía estar relacionada con la presencia de IgA (201, 202). Estos estudios parecen indicar que la respuesta inmune de mucosas con producción de IgA es eficaz previniendo la infección frente a *Acanthamoeba* (203). Alizadeh et al. (204) estudiaron los niveles de IgG y de IgA en las lágrimas de personas sanas y pacientes de QA y observaron que los niveles séricos de IgG eran similares entre ambas poblaciones mientras que los niveles de IgA se encontraban disminuidos en los pacientes de QA. Por ello, sugirieron que la única inmunoglobulina que confería protección frente a QA era la IgA secretada independientemente de la inmunoglobulina sérica. En la lágrima, otros estudios han observado una disminución de los niveles de IgA y IgG en pacientes con QA debido a su degradación por las serinas proteasas que se generan durante la infección (205, 206).

Por otro lado, se activa el sistema del complemento (SC) que actúa como primera línea de defensa frente a infecciones microbianas y puede estar presente en ambas respuestas inmunes (207, 208). Juega un papel importante en la eliminación del

patógeno mediante lisis de la ameba o aumentando la muerte mediada por macrófagos. Sin embargo, su papel en la patogénesis de la QA tampoco está del todo claro. La activación del SC conlleva la aparición de las anafilotoxinas C3a y C5a que median la respuesta inflamatoria y el daño tisular por lo que podrían estar favoreciendo la destrucción de tejido favoreciendo la infección en vez de la eliminación de *Acanthamoeba*. Algunos estudios in vitro confirman que los trofozoítos de *Acanthamoeba* pueden sucumbir a la lisis mediada por el SC en presencia o ausencia de anticuerpos (209). Sin embargo, otros estudios in vitro han demostrado que los trofozoítos de *Acanthamoeba* puede resistir a esta lisis, posiblemente debido a la presencia de proteínas inhibitoras en la superficie del trofozoíto o a algunas proteínas presentes en el epitelio corneal y en la lágrima (210). Las especies más patógenas de *Acanthamoeba* spp. parecen ser más resistentes a la lisis que las menos patógenas (211, 212).

3.5 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la queratitis por *Acanthamoeba* a menudo es complejo ya que puede ser confundida con la queratitis bacteriana, viral o micótica. Por ello, un buen diagnóstico diferencial y temprano es esencial para el buen pronóstico de la enfermedad (213-215).

3.5.1 Cultivos de raspados corneales

La obtención de muestras mediante raspado corneal o biopsia para la realización de cultivos microbiológicos en placa es considerada tradicionalmente como la prueba de referencia (en inglés, *gold standard*) para el diagnóstico de queratitis amebiana.

Es una prueba sencilla, fácil de realizar y de bajo coste en la que *Acanthamoeba* se cultiva en medio agar no nutritivo con *Escherichia coli* (*E.coli*) o *Enterobacter* que les sirve de alimento. Aunque las pruebas de cultivo tienen una alta especificidad (100%) la sensibilidad oscila entre el 7 y el 66.7% (216, 217). Esto hace que su efectividad pueda verse disminuida si existe coinfección con otro patógeno siendo poco útil para diagnosticar la QA. Otro aspecto a tener en cuenta es el tiempo requerido para la obtención del resultado ya que tarda un promedio de 7 días en demostrar un resultado positivo, lo que permite que la patología siga avanzando. Para obtener mejores cultivos en ocasiones se requiere realizar biopsias de la córnea lo que hace de esta técnica un procedimiento muy invasivo (217).

3.5.2 Análisis histopatológico

Como alternativa al cultivo, se pueden utilizar los raspados o biopsias de la córnea para su análisis histopatológico utilizando tinciones especiales. Las tinciones más usadas de manera rutinaria para detectar *Acanthamoeba* dado que no requieren técnica o material especial son la hematoxilina y eosina, giemsa, Gram, ácido periódico-Schiff y tricrómico (218). Otras tinciones más especiales son el blanco de calcoflúor (219, 220), los anticuerpos fluorescentes indirectos (221) o el naranja de acridina (222), los cuales requieren un microscopio fluorescente para su identificación. Tanto la destreza del observador, así como el tipo de tinción usada influyen en la identificación de la *Acanthamoeba*. En ocasiones, los quistes amebianos pueden confundirse con células mononucleares o epitelio degenerado. Algunos estudios indican que la tinción blanca de calcoflúor así como de naranja de acridina son métodos más fiables para detectar quistes amebianos en frotis de córnea y muestras de biopsia (219, 222).

3.5.3 Microscopía confocal in vivo

Es una técnica de diagnóstico no invasiva que proporciona imágenes a tiempo real del epitelio corneal, el estroma y el endotelio, y permite la identificación y observación in vivo de microorganismos sin necesidad de biopsia de tejido ni tintes (223). La sensibilidad y especificidad de la prueba es mayor del 90% (216, 224-226) siendo mayor que la reacción en cadena de la polimerasa y los cultivos (216). Una limitación de este método es la dificultad para detectar trofozoítos, de manera que solo identifica de manera fiable los quistes de *Acanthamoeba*, por lo que la enfermedad puede estar en una etapa inactiva en ese momento. Por otro lado, para su realización se necesita un equipo de altas prestaciones y personal cualificado por lo que no siempre se considera la opción más accesible (227).

3.5.4 Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa, del inglés PCR (Polymerase chain reaction) es una técnica molecular también usada en el diagnóstico de QA cuyo tiempo medio para obtener un resultado es de unos 5 días (mínimo 1/2 días). Tiene una alta especificidad (100%) y una sensibilidad que varía del 66.7% al 100% dependiendo de la secuencia de ADN usada (216, 217). Algunos estudios confirman la superioridad de la PCR frente a los cultivos en el diagnóstico de QA (216, 217, 228). La PCR a tiempo real es una técnica con un rango de sensibilidad y especificidad similares a la PCR estándar que permite obtener resultados aún más rápidos. La realización de la PCR requiere material especial y puede resultar más costoso que otras técnicas de diagnóstico. Además, la PCR puede tener la desventaja de que aun en ausencia del patógeno puede dar un resultado positivo (229).

Por otro lado, existen otras técnicas menos usadas que se plantean como posibles opciones para el diagnóstico de QA. La citología de impresión se usa en el diagnóstico de infecciones y enfermedades de la superficie ocular. Además, se ha descrito su uso en el diagnóstico de QA en córneas con afectación superficial (230-232) considerándose un procedimiento rápido y mínimamente invasivo. Otra posible herramienta para el diagnóstico temprano de QA es la tomografía de coherencia óptica del segmento anterior (AS-OCT, de sus siglas en inglés). Con la AS-OCT se puede identificar la queratoneuritis radial que puede servir para respaldar el diagnóstico y seguimiento de QA en estadio temprano (233).

3.6 TRATAMIENTO DE LA QUERATITIS POR *ACANTHAMOEBA*

Actualmente no existe un protocolo estandarizado para el tratamiento de la QA. El tipo de tratamiento varía según la severidad y el estado de la infección. En el caso de la queratitis amebiana lo más importante es un diagnóstico precoz que evite el progreso de la queratitis.

3.6.1 Agentes antiamebianos

Las biguanidas son agentes antimicrobianos útiles porque pueden matar ambas formas de *Acanthamoeba*, trofozoítos y quistes. Actúan penetrando en las amebas provocando daños en la membrana plasmática y la posterior lisis y muerte celular (234). Los dos compuestos de biguanida más usados actualmente por su eficacia son polihexametileno biguanida (PHMB) y la clorhexidina. PHMB, en una concentración baja de 0.02% tiene una alta actividad cisticida contra múltiples cepas del patógeno (235). Mientras que el uso de clorhexidina y PHMB por separado en monoterapia es efectivo, su uso combinado no está recomendado porque produce mayor toxicidad

(236). En la actualidad, el tratamiento general más empleado consiste en la aplicación combinada de una biguanida y una diamidina (isotianato de propamidina al 0.1% o hexamidina al 0.1%) (237, 238). Las diamidinas también provocan cambios en la membrana celular que afectan a su permeabilidad. La propamidina y la hexamidina han mostrado su eficacia clínicamente contra las formas de trofozoíto y quiste de *Acanthamoeba* (239, 240). La propamidina también se ha administrado con medicamentos antimicóticos como miconazol tópico al 1% e itraconazol oral obteniendo resultados exitosos frente a la QA (241-243). Por lo general, los trofozoítos son más sensibles a los tratamientos mientras que los quistes son más resistentes y pueden persistir en la superficie corneal durante mucho tiempo. La toxicidad de estos tratamientos ha sido relacionada con la aparición de cataratas, atrofia del iris, glaucoma y úlceras periféricas como posibles efectos secundarios (165, 244).

En el caso de inflamación severa se pueden usar corticosteroides. Sin embargo, su uso es controvertido porque pueden provocar un empeoramiento de la infección (245, 246) y la supresión de la respuesta inmunológica del paciente en la etapa inicial de la infección inhibiendo la actividad de los macrófagos. Además, producen inhibición de los procesos de enquistamiento y escisión de *Acanthamoeba*, que podría ser una causa de la aparición de problemas de resistencia.

3.6.2 Cirugía

El trasplante de córnea (queratoplastia) es otra opción terapéutica cuando los tratamientos tópicos u orales han fracasado. Se recomienda esta intervención si la infección está en fase aguda, si la córnea está dañada o demasiado delgada, o si la visión es limitada. Sin embargo, hay un riesgo de no eliminar todos los trofozoítos o

quistes antes de la cirugía lo que podría colonizar la nueva córnea (241, 247, 248). La queratoplastia lamelar anterior profunda tiene las ventajas de no invadir la cámara anterior y reduce el riesgo de rechazo y fallo endotelial (249, 250). Por otro lado, otra opción es el trasplante de membrana amniótica que se utiliza para recuperar la córnea, especialmente en caso de defectos epiteliales persistentes o úlceras (251, 252).

La técnica de *cross-linking* combina la aplicación de riboflavina y luz ultravioleta que produce daño en el ADN de *Acanthamoeba* retrasando la destrucción corneal (253, 254).

La crioterapia corneal es un tratamiento adyuvante de la terapia tópica. Las áreas corneales infectadas o el área receptora antes de una queratoplastia penetrante se tratan con una criosonda fría hasta que se formen cristales de hielo en el estroma corneal. El efecto de este tipo de crioterapia en células madre epiteliales del limbo no ha sido aclarado hasta la fecha. Estudios in vitro han mostrado su eficacia en la disminución de trofozoítos, pero no de los quistes, en ausencia de tratamiento médico en combinación (255-258).

4. SISTEMAS DE LIMPIEZA/ MANTENIMIENTO

Actualmente existen una gran variedad de productos en el mercado para el mantenimiento y desinfección de las lentes de contacto.

4.1 SOLUCIONES MULTIPROPÓSITO (ÚNICAS)

Las soluciones únicas de mantenimiento son las más empleadas por los usuarios de lentes de contacto. Contienen cuatro componentes básicos sobre su base salina

- Agentes surfactantes que recubren la superficie de las lentes protegiéndolas de la acumulación de los depósitos
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), compuesto que es capaz de captar iones como el Mg^{2+} y Ca^{2+} impidiendo la formación de depósitos de calcio en la lente (259).
- Agentes tampón que mantiene el pH de las soluciones similar al de la lágrima humana.
- Agentes antimicrobianos, que, con relación a esta tesis se describen a continuación con detalle.

Para la mejora del confort del usuario, algunos incluyen otros componentes como los agentes humectantes o lubricantes. Los más empleados actualmente son PolivinilPirrolidona (PVP), Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), dexpantenol e hialuronato de sodio.

- **Agentes antimicrobianos**

La clorhexidina es técnicamente una biguanida (260) con efecto bacteriostático que presenta una formulación más antigua en comparación con las biguanidas utilizadas en las soluciones actuales. Se demostró que era eficaz contra la *Acanthamoeba* in vitro, contra los hongos *Fusarium* y *Aspergillus* y algunas bacterias *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *S. marcescens* (261, 262). Antiguamente se incluía en las soluciones multipropósito pero dada su posible toxicidad en el ojo actuando como agente irritante actualmente no se incluye en la formulación de las soluciones multipropósito dejando paso a nuevos y mejores conservantes de alto peso molecular.

La polihexanida (PHMB, del inglés, polyhexamethylene biguanide) es el agente antimicrobiano más utilizado en soluciones únicas en concentraciones que van desde 0.5 ppm hasta 2 ppm. Actúa perforando la membrana fosfolipídica bacteriana, provocando la destrucción de las bacterias, aunque también se ha sugerido que se introduce en el interior de la célula mediante translocación sin causar daño en la membrana y, una vez dentro, se une al ADN bloqueando potencialmente el proceso de replicación del ADN (263). Las soluciones a base de PHMB han mostrado su eficacia contra las bacterias como *P. aeruginosa* y *S. aureus* (264, 265). Por el contrario, estas soluciones no son tan eficaces contra especies de hongos, levaduras o amebas. Un amplio número de estudios han confirmado que las soluciones de PHMB son ineficaces contra *Acanthamoeba* (266-269).

El polyquad® o polyquaternium-1 (PQ-1) es un compuesto de amonio cuaternario con función bactericida (270). Para potenciar su eficacia, normalmente se encuentra en combinación con otros componentes como la miristamidopropil dimetilamina (MAPD) también conocida como ALDOX® que inhibe eficazmente los

hongos y las amebas. El efecto de PQ-1 frente *Acanthamoeba* no está del todo claro. Algunos estudios que evaluaron su eficacia encontraron que no era eficaz contra la *Acanthamoeba* (271-273). La combinación PQ-1 con Aldox, parece ser igual de ineficaz frente a *Acanthamoeba* que la PQ-1 sola según algunos estudios (266, 274-276), aunque existen otros que muestra su eficacia en quistes y trofozoítos (269, 270).

En el año 2006 hubo un brote mundial de queratitis por *Fusarium* y en 2007-8 de queratitis por *Acanthamoeba* (277, 278). Estos brotes se relacionaron directamente con soluciones de mantenimiento concretas. Así, la solución de mantenimiento Complete MoisturePlus® (Advanced Medical Optics (AMO)) fue retirada del mercado de manera voluntaria por la empresa por su relación con los casos de queratitis por *Acanthamoeba* en usuarios de lentes de contacto blandas (159). Además, se retiraron otras soluciones únicas Renu® MoistureLoc® (Bausch & Lomb Incorporated).

Con el fin de incrementar el poder de desinfección de las soluciones únicas, los laboratorios combinan los agentes antimicrobianos buscando el mayor espectro de acción contra bacterias y hongos. Además de la mejora en la eficacia, otro factor importante que se tiene en cuenta es el nivel de toxicidad ocular que pueden producir los agentes antimicrobianos en los usuarios de lentes de contacto cuando se combinan con los distintos materiales (279).

4.2 PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) no está clasificado como conservante, pero se utiliza como sistema de desinfección. Se basa en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% que desinfecta y otra parte que neutraliza la reacción mediante un disco de platino o una pastilla de catalasa durante un mínimo de seis horas. Aunque

antiguamente este proceso se hacía en dos pasos, en la actualidad la mayoría de los sistemas lo realizan en un único paso. Estas soluciones matan los microorganismos produciendo radicales libres que destruyen las membranas celulares y oxidan componentes esenciales del microorganismo. Las lentes tratadas pueden aplicarse directamente en el ojo con un riesgo mínimo de daños en la superficie ocular, ya que la cantidad residual de agente desinfectante tras la neutralización está dentro del rango adecuado para no causar citotoxicidad (280).

Diferentes estudios han mostrado la eficacia de estos sistemas eliminando bacterias, virus, hongos y *Acanthamoeba*. La efectividad de los sistemas de peróxido de hidrógeno frente *Acanthamoeba* está relacionada con la concentración de desinfectante y el tiempo de exposición. Así, se ha demostrado la capacidad de diferentes sistemas de limpieza con peróxido de hidrógeno eliminando *A. castellanii* tanto a las 6 como a las 24 horas (158, 276). Los sistemas de peróxido de hidrógeno muestran mayor efectividad frente *Acanthamoeba* en tiempos de almacenamiento menores que otras soluciones únicas con PHMB y PQ-1 (268, 271, 276). Algunos estudios concluyen que los sistemas de peróxido de dos pasos (menos comunes actualmente) parecen ser más efectivos contra más cepas de *Acanthamoeba* y eliminando más cantidad de quistes (281, 282).

4.3 POVIDONA YODADA

Dada la amplia capacidad antibacteriana de la povidona yodada (PY), es comúnmente usada como antiséptico en procedimientos quirúrgicos (283). Además, su baja toxicidad hace que pueda ser usada en bajas concentraciones a nivel ocular (284). Su capacidad de desinfección ha sido demostrada en lentes de contacto rígidas y de ortoqueratología (285). Yanai et al. (286) estudiaron la capacidad antimicrobiana y la citotoxicidad de la povidona yodada, peróxido de hidrógeno y una solución única con PHMB. Los resultados mostraron que la solución de povidona fue más eficaz contra las bacterias y los hongos y la menos citotóxica de las tres soluciones. Otros estudios han demostrado su eficacia contra *P. aeruginosa* (287, 288). En relación con la *Acanthamoeba*, las soluciones de povidona han demostrado su eficacia contra cepas patógenas aisladas (289) y contra quistes y trofozoítos de *Acanthamoeba* (290, 291).

5. NANOTECNOLOGÍA Y NANOMEDICINA

El físico estadounidense Richar Feynman, premio Nobel de Física en 1965, propuso el concepto de nanotecnología a finales de 1959, con su famoso discurso “*There is plenty of room at the bottom*” en la reunión anual de la Sociedad de Física Americana (292). La nanotecnología es la ciencia que se ocupa de la síntesis, manipulación y aplicación de la materia con dimensiones entre 1 y 100 nm. El prefijo -nano hace referencia a la milmillonésima parte de un metro ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$). Existen diferentes nanoestructuras como los nanotubos, nanocanales, nanopartículas, nanoporos, nanofibras. Los nanomateriales pueden ser diseñados para que sus propiedades sean útiles para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades a nivel molecular (293). Concretamente, las nanopartículas han cobrado un papel importante en biomedicina. Entre la amplia variedad, se puede destacar aquellas formadas por metales nobles como el oro, plata y cobre, cuyas propiedades únicas las hace útiles para diferentes aplicaciones, entre ellas, los biosensores (294).

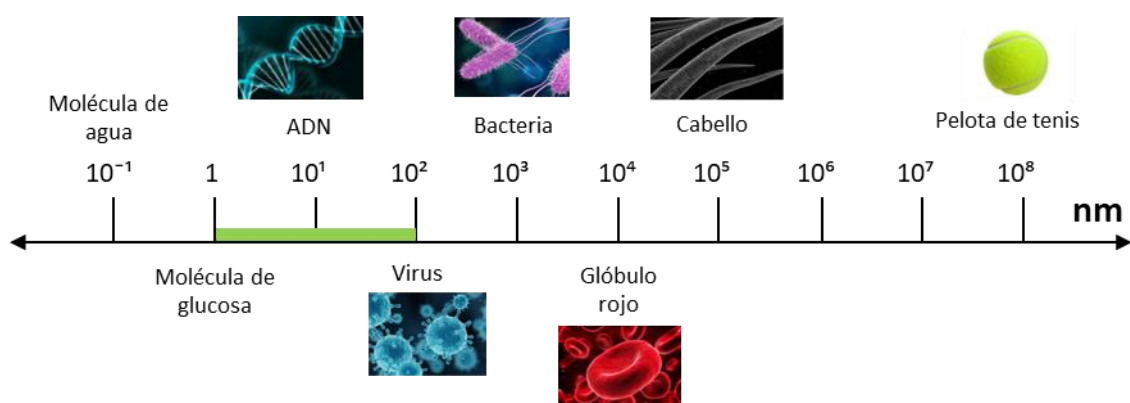


Figura 6. Escala de diferentes tamaños relacionada con el contexto biológico. En verde se resalta la zona en la que se encuentran los nanomateriales.

5.1 NANOPARTÍCULAS DE ORO

Las nanopartículas metálicas de oro (AuNPs) son de especial interés debido principalmente a sus propiedades ópticas, químicas y electrónicas que a su vez dependen en gran medida del tamaño y forma de las propias nanopartículas.

Las nanopartículas pueden ser sintetizadas con diferentes geometrías dando lugar a estructuras como nanoesferas, nanobarras, nano estrellas, nanopirámides y nanoflores. Así, mientras que las nanopartículas esféricas presentan propiedades isotrópicas, el resto de las formas tienen propiedades anisotrópicas.

5.1.1 Propiedades ópticas

Las soluciones de AuNPs muestran diferentes colores dependiendo del tamaño y la forma de las nanopartículas. Fue Faraday en 1857 quien desarrolló los primeros coloides de oro y estudió las propiedades ópticas del oro coloidal (295).

Las nanopartículas metálicas, en este caso de oro, presentan electrones libres en la banda de conducción de su superficie. Al interactuar con un haz de luz incidente, se produce la excitación de estos electrones libres, provocando una oscilación coherente de los electrones de la superficie que se denomina “plasmones de superficie”. Cuando el campo electromagnético generado está en resonancia con el de la luz incidente se produce el fenómeno conocido como resonancia del plasmón de superficie (SPR del inglés, Surface plasmon resonance) . Esta resonancia se origina cuando el tamaño de las nano partículas es menor que la longitud de onda del haz incidente $d \ll \lambda$.

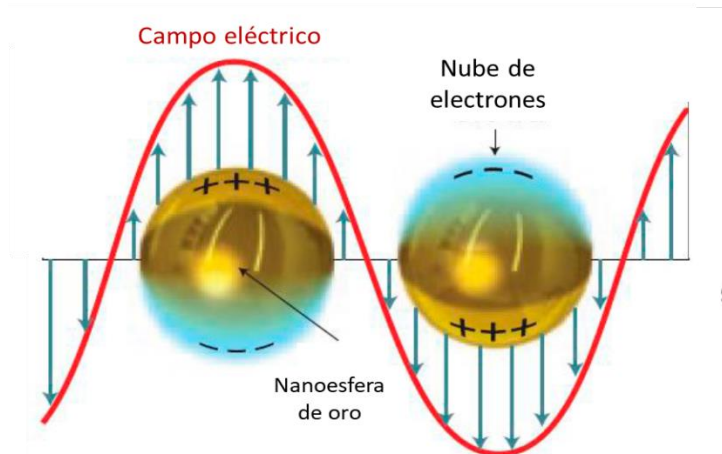


Figura 7. Ilustración del efecto de resonancia de plasmón superficial (SPR). Oscilación colectiva de los electrones con el campo electromagnético incidente en una nanopartícula de oro. Imagen modificada de Juan et al. 2011 (296).

La resonancia de plasmón de superficie (SPR) tiene un papel vital en la absorción y la dispersión de la luz que es responsable del color de las suspensiones coloidales de AuNPs. La frecuencia de resonancia del plasmón depende de varios factores como son el tamaño y composición de las nanopartículas, la constante dieléctrica, el tipo de disolvente, del tipo de ligando, la distancia entre partículas y la temperatura (297). Así, por ejemplo, a medida que aumenta el tamaño, el color de las suspensiones coloidales de AuNPs cambia de rojo a azul o púrpura y viceversa. Esto es debido a un desplazamiento en el pico de absorción (Figura 8). En el caso de las nanoesferas de oro la resonancia del plasmón de superficie localizado (LSPR) presenta una fuerte banda de absorción de resonancia de plasmón en la región visible, normalmente entre 500 a 550 nm con un pico de absorción máxima alrededor de 520 nm. Las AuNPs tienen un coeficiente de extinción elevado que permite la observación visual de las AuNPs a bajas concentraciones de nM e incluso pM (298).

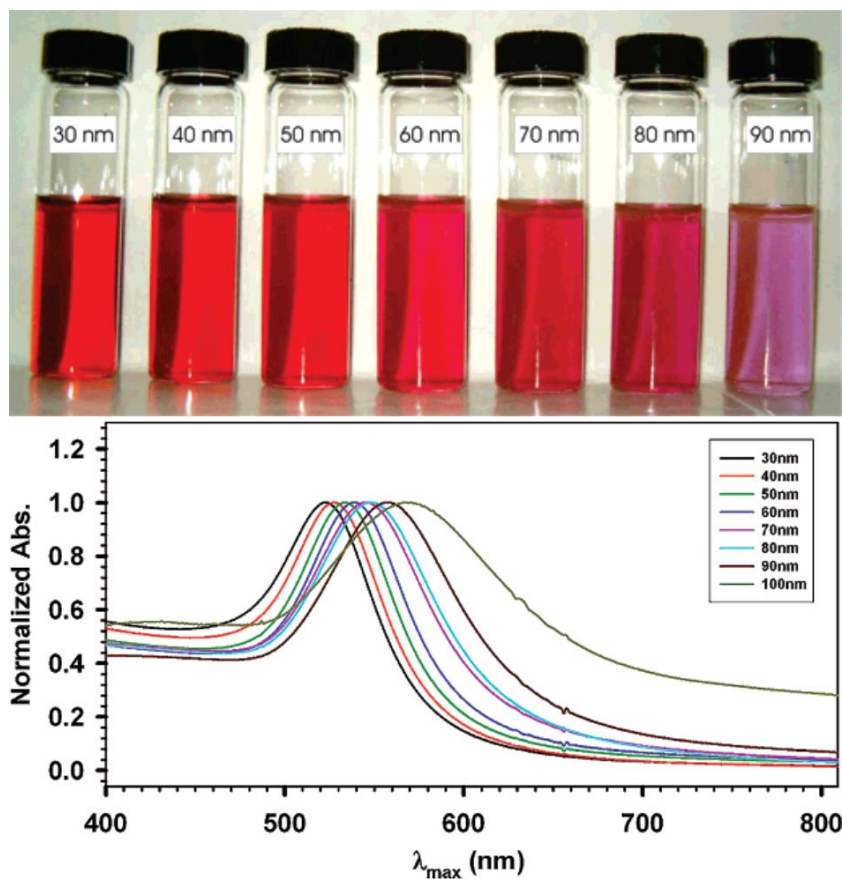


Figura 8. Apariencia visual de las nanopartículas de oro esféricas de diferentes tamaños en solución (arriba) y su espectro visible (abajo). Se observa un desplazamiento de la banda de absorción hacia longitudes de onda más largas cuanto mayor es el tamaño, acompañado de un cambio de color desde el rojo al violeta. Imágenes modificadas de Njoki et al. 2007 (299).

5.1.2 Sensores

Junto con sus propiedades ópticas, la biocompatibilidad de las nanopartículas de oro les confiere una gran cantidad de aplicaciones en biomedicina en los campos de diagnóstico, terapia e inmunología. Una de las aplicaciones más importantes de las AuNPs en el diagnóstico, es su uso en la creación de biosensores para diferentes iones o moléculas químicas y biológicas (300). Un biosensor es un dispositivo que

permite la detección de un analito mediante la conversión de una respuesta biológica en una señal medible (301). Los biosensores en general se componen por tres elementos fundamentales (Figura 9).

- Bioreceptor: es una biomolécula específica que reconoce el analito/objetivo de interés.
- Transductor: es el elemento encargado de convertir el reconocimiento biológico en una señal medible.
- Detector: dispositivo que capta la señal emitida por el transductor y permite el procesamiento de datos.

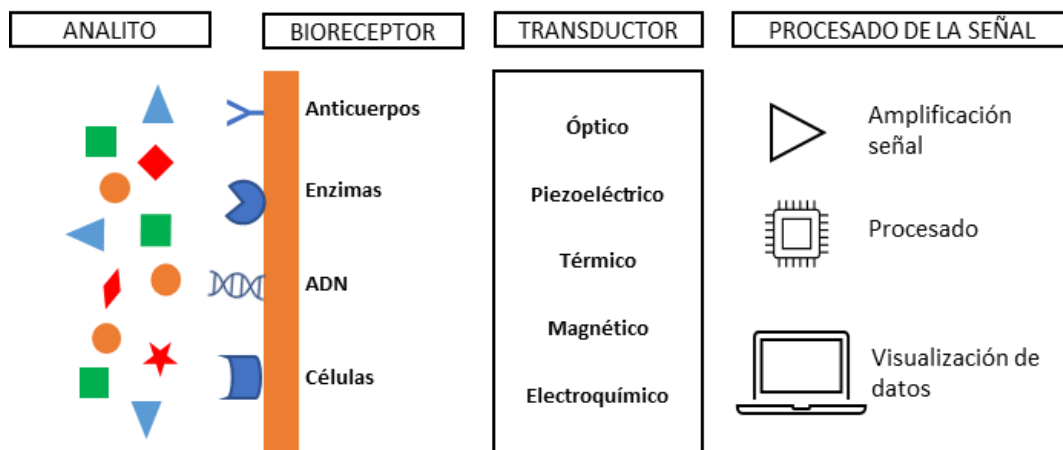


Figura 9. Componentes básicos de un biosensor.

Muchos tipos de nanopartículas se han empleado en la creación de los biosensores, siendo las nanopartículas de oro las nanopartículas metálicas más utilizadas como transductores. Estos biosensores pueden ser utilizados para identificar diferentes analitos de una muestra. En particular, en relación a esta tesis, nos enfocamos en su uso para la detección de ácidos nucleicos.

Por otro lado, según la estrategia de detección, los sensores con AuNPs pueden ser: sensores basados en fluorescencia (302, 303) , sensores electroquímicos (304-306) o sensores colorimétricos. Dado que los métodos de detección basados en fluorescencia o electroquímicos suelen requerir material especializado, los ensayos colorimétricos basados en nanopartículas de oro ofrecen una alternativa menos costosa.

5.1.2.1 Sensores colorimétricos con nanopartículas de oro

Debido al fenómeno de LSPR, las AuNPs exhiben propiedades ópticas que dependen del tamaño de la nanopartícula (307, 308), la forma (309), la distancia entre partículas (310, 311) y las propiedades del ambiente dieléctrico de las partículas (297, 312, 313). Cualquier circunstancia que cambie alguno de estos factores, provoca un cambio en la intensidad del LSPR lo que lleva a un cambio visual en el color de la solución. En el caso de la agregación de AuNPs, se produce un acoplamiento de plasmón de superficie entre ellas que da como resultado un desplazamiento en la banda de absorción provocando el cambio de color visible del rojo al azul. El cambio de color producido es una herramienta práctica para la detección colorimétrica de cualquier analito objetivo que desencadene la agregación de las AuNPs. Así, se pueden desarrollar sensores plasmónicos de detección que evalúan el cambio de

color de las soluciones de nanopartículas en función de su estado de agregación o estado de dispersión, observándose fácilmente a simple vista. El uso de AuNPs como sensores colorimétricos se ha empleado para la detección de ácidos nucleicos, iones metálicos (314), proteínas (315, 316) y otras moléculas pequeñas que se pueden comportar como biomarcadores específicos para determinadas enfermedades (317-320).

Los sensores colorimétricos son métodos simples, rápidos y económicos que permiten la detección a simple vista. Por otro lado, una desventaja que presentan es su limitada sensibilidad. En general, el límite de detección usando AuNPs está alrededor del orden nanomolar, que es mucho más alto que el necesario para muchos diagnósticos (321). Los sensores colorímetros con AuNPs para la detección de secuencias de ADN generalmente se basan en la estrategia de agregación. Las estrategias de agregación más comunes son *crosslinking*, *non-crosslinking* e hibridación de superficie.

- **Agregación *crosslinking***

La agregación *crosslinking* se produce cuando las nanopartículas se encuentran lo suficientemente próximas entre ellas para agregarse. Para ello, primeramente, las AuNPs se modifican en su superficie con ADN que se une de manera covalente mediante grupos funcionales químicos, principalmente tioles. De este modo, el proceso de agregación *crosslinking* está mediado por la hibridación de tres elementos. Por un lado, dos grupos de AuNPs funcionalizadas con sondas distintas de ADN monocatenario modificado con tiol (ADN-AuNP). Por otro lado, una secuencia de ADN de cadena simple (*target*) que es complementaria a ambas sondas adheridas a las AuNPs. Así, en presencia del *target*, se produce la hibridación específica por

complementariedad de secuencias de las sondas y actúa como elemento de unión entre las ADN-AuNPs provocando su agregación (Figura 10). En consecuencia, se produce un cambio en el espectro de absorción de la solución, que se traduce visualmente en un cambio de color de rojo a azul. Este cambio puede detectarse visualmente, fotométricamente o mediante dispersión dinámica de la luz (322). La sensibilidad de esta estrategia está determinada por la cantidad mínima de ADN *target* que es necesario para que la agregación de las nanopartículas sea apreciable a simple vista (323, 324).

En 1996, Mirkin y colaboradores demostraron por primera vez que se podía usar este método colorímetro para la detección de ADN. Utilizaron nanopartículas de 13nm y mediante la técnica de agregación *crosslinking* obtuvieron un cambio de color visible de rojo a azul (325). Además, este método, al estar basado en la hibridación entre ácidos nucleicos, es un proceso reversible. Al aumentar la temperatura por encima de la temperatura de fusión se produce la desnaturalización del ADN y, en consecuencia, la disociación de los agregados de AuNPs, volviendo al color inicial de la solución (325).

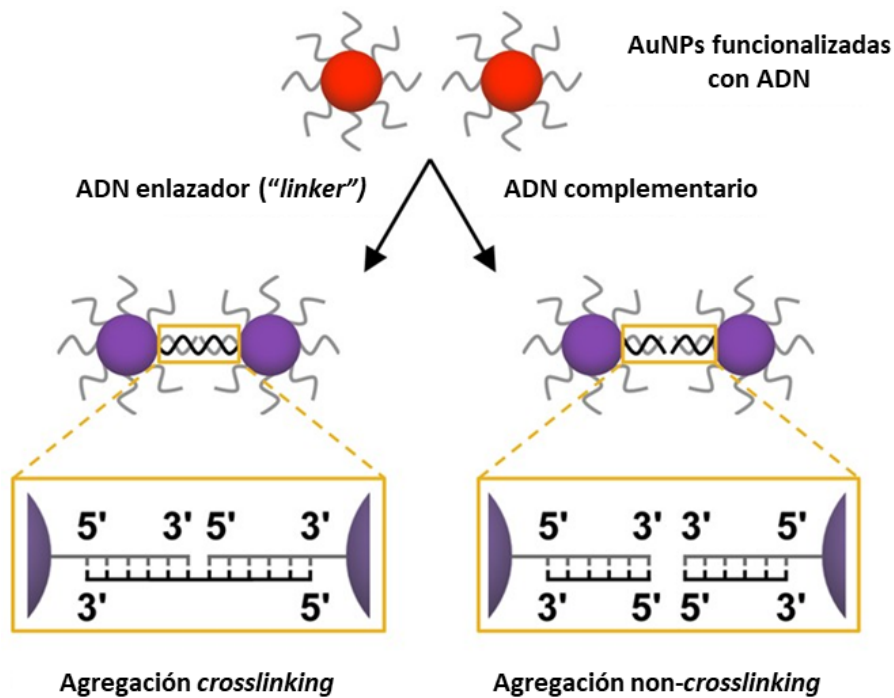


Figura 10. Esquema ilustrativo de los tipos de agregación que se pueden desarrollar con AuNPs funcionalizadas. Imagen modificada de Wang et al. 2017 (326)

- **Agregación *non-crosslinking***

La agregación *non-crosslinking* se produce cuando las fuerzas de repulsión entre las AuNPs que están negativamente cargadas no son suficientes para mantener la dispersión coloidal, de manera que las fuerzas atractivas de Van der Waals conducen a la agregación. Normalmente, la agregación ocurre por un aumento en la fuerza iónica del medio ocasionado por la adición de sal o por cambios en el pH de la disolución (327, 328). Este tipo de agregación puede ocurrir tanto con las AuNPs modificadas o sin modificar. En el primer caso, cada molécula de ADN hibrida por

complementariedad con una sonda de ADN monocatenario inmovilizada en la superficie de la nanopartícula (Figura 10).

En el segundo caso, el ADN es adsorbido por la superficie de la nanopartícula. El ADN monocatenario libre se absorbe en la superficie de las AuNPs no modificadas a través de los átomos de nitrógeno de sus bases, creando una capa eléctrica con efecto repulsivo, aportando estabilidad a las AuNPs incluso frente a concentraciones altas de sal (329, 330). Sin embargo, en el caso del ADN bicatenario, la doble hélice impide la adsorción de los átomos de nitrógeno, y no se consigue la estabilización electrostática, lo que lleva a la agregación de las nanopartículas provocado un cambio de color de rojo a púrpura (329). Esta técnica es muy sencilla porque no requiere la modificación de la superficie de las AuNPs con el ADN. Sin embargo, existen otros inconvenientes como la baja especificidad o agregación inespecífica.

5.1.3 Aplicaciones de las Nanopartículas de oro

Los biosensores con AuNPs se han utilizado principalmente en la detección del ADN de diferentes organismos patógenos. Así, se ha logrado detectar diferentes agentes patógenos como *Mycobacterium tuberculosis* (331), hepatitis B (332), *Salmonella spp* (333), el virus del papiloma humano de alto riesgo (334) o el virus SARS-CoV (335), entre otros. También se han desarrollado biosensores con nanopartículas de oro para la detección de queratoconjuntivitis infecciosas (336).

A nivel ocular, el uso de las nanopartículas de oro está principalmente enfocado en el tratamiento. Una de sus aplicaciones más estudiada es la liberación de fármacos para el tratamiento de diferentes patologías. Estudios de liberación de fármacos antiglucomatosos como el timolol y bimatoprost demostraron que la incorporación de

nanopartículas de oro en la matriz de las lentes de contacto mejoraba su liberación (337, 338). También se han utilizado las AuNPs combinadas con hidrogel de agarosa para la administración de anti angiogénicos en el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad (339).

Además, las propias nanopartículas de oro presentan propiedades antiangiogénicas y antiinflamatorias. Así, pueden ser empleadas en el tratamiento de enfermedades como son la retinopatía del prematuro, retinopatía diabética, degeneración macular asociada a la edad (DMAE) y enfermedades reumáticas (340, 341). Ensayos in vitro y en animales in vivo, han demostrado que las AuNPs pueden ser conjugadas para su uso en terapia génica mostrando buena biocompatibilidad (342, 343). Las nanopartículas de oro conjugadas con polietilimina han mostrado su eficacia reduciendo la fibrosis corneal en ojos de conejo (344).

Otra aplicación estudiada de las nanopartículas de oro es la mejora del contraste en el diagnóstico mediante OCT. Así, se obtiene una mejor observación de diferentes tejidos oculares, como la retina o la córnea, contribuyendo al diagnóstico precoz de patologías oculares (345-348).

II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. JUSTIFICACIÓN

La queratitis microbiana es una de las patologías más peligrosas en usuarios de lentes de contacto, siendo las causadas por *Acanthamoeba* spp las que presentan mayor gravedad (103, 163). Existen diferentes factores de riesgo para el desarrollo de la QA, entre los que se encuentran traumas, daños de la superficie ocular y el uso de lentes de contacto (130, 277). Numerosos estudios han demostrado la asociación entre el uso de lentes de contacto y el desarrollo de la QA, siendo considerado el principal factor de riesgo (123). El uso de las LC durante el baño, las malas prácticas de higiene, así como su limpieza con agua de grifo incrementan el riesgo de infección (127).

La QA es más frecuente asociada al uso de las lentes de contacto blandas, aunque puede aparecer con el uso de todo tipo de materiales de lentes, incluyendo las rígidas permeables al gas (RPG) y lentes híbridas (141, 349, 350). Por ello, el uso de productos adecuados para la desinfección y conservación de las lentes de contacto es esencial para evitar posibles infecciones corneales. Sin embargo, según las directrices de la Organización Internacional de Normalización (ISO 14729:2001) no es esencial probar la eficacia de las soluciones contra *Acanthamoeba*. Pese a ello, existen numerosos trabajos que tratan de valorar su efectividad frente a *Acanthamoeba*, aunque la ausencia de un enfoque estándar dificulta la comparación y valoración de la eficacia relativa de los productos.

Un factor clave para el buen pronóstico de la QA es la realización de un diagnóstico rápido y diferencial. Sin embargo, las técnicas de diagnóstico actuales requieren equipos complejos y/o personal capacitado, lo que puede ser costoso y llevar mucho tiempo, ralentizado el diagnóstico y tratamiento adecuado. Actualmente

las técnicas de PCR empleadas se basan en la detección del ADN de *Acanthamoeba*. Dada la estabilidad química de las moléculas de ADN, las PCRs basadas en su detección impiden diferenciar entre la presencia de ameba viva o muerta y, por tanto, conocer si la patología está en fase activa.

Por estas razones se plantea la necesidad de nuevas herramientas de diagnóstico para una evaluación temprana y precisa de la infección. En este sentido, mientras que existen muchos trabajos centrados en la búsqueda de nuevas opciones de tratamiento de la queratitis amebiana, hay pocos estudios enfocados en el desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas más sencillas y asequibles.

En los últimos años, se han desarrollado biosensores colorimétricos basados en nanopartículas de oro para la detección de diferentes patógenos mostrando buenos resultados. Por este motivo, se propone el desarrollo de un sensor colorimétrico con AuNPs rápido, asequible y fácil de usar para la detección temprana de la queratitis por *Acanthamoeba* y el seguimiento de la *Acanthamoeba*. De este modo, puede ser accesible para el personal sanitario a la hora de realizar un diagnóstico rápido y tratamiento adecuado y para los usuarios de lentes de contacto para un diagnóstico preventivo.

Por otro lado, se plantea el uso de PCR basadas en la detección de ARN, para hacer un diagnóstico más preciso del estado de la queratitis amebiana y su uso para una valoración más fiable de la eficacia de los productos de limpieza de las LC.

2. HIPÓTESIS

Las dos hipótesis principales del presente trabajo son:

Las nanopartículas de oro podrían ser empleadas para el desarrollo de un dispositivo de detección de *Acanthamoeba*, comportándose así, como un sensor colorímetro ante el patógeno.

Existen diferencias en la capacidad de limpieza desinfección de los diferentes sistemas de mantenimiento de lentes de contacto.

3. OBJETIVOS

Objetivos generales

1. El diseño de un método de detección de *Acanthamoeba castellanii* con nanopartículas de oro.
2. Aplicación de PCR cuantitativa basadas en la detección de ARN de *A.castellanii*.
3. La evaluación de la capacidad de desinfección de diferentes sistemas de limpieza de lentes de contacto frente a *A.castellanii* mediante las AuNPs y qPCR basadas en detección de ARN.

Objetivos específicos

1. Diseñar y optimizar protocolos para la funcionalización e hibridación de las nanopartículas de oro con secuencias específicas de *Acanthamoeba*.
2. Evaluar la eficacia del sistema de detección con AuNPs con muestras de *Acanthamoeba* reales y establecer los límites de detección.
3. Validación del sistema de detección con AuNPs junto con la PCR cuantitativa para la detección de posibles amebas residuales tras el uso de sistemas de limpieza de lentes de contacto.
4. Selección de secuencias específicas de ARN para la detección de *A.castellanii* mediante qPCR.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1 PRODUCTOS QUÍMICOS

A continuación, se enumeran los reactivos y productos químicos utilizados (Tabla 1) así como las soluciones tampón empleadas para realizar los experimentos (Tabla 2).

Tabla 1. Reactivos y productos químicos

USO	REACTIVO	CASA COMERCIAL
Síntesis Nanopartículas	Ácido tetracloroáurico(III) trihidrato ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich
	Citrato de sodio	
	Hydroxilamina	
	Ácido nítrico (HNO_3)	
	Ácido clorhídrico (HCl)	
	Hidróxido de sodio (NaOH)	
Para Buffers	Dodecilsulfato sódico (SDS)	
	Dihidrógenofosfato de sodio dihidrato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	
	Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4)	
	Cloruro de Sodio, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ KH_2PO_4	
	Ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)	
	Citrato de sodio dihidrato ($\text{C}_6\text{H}_9\text{Na}_3\text{O}_9$)	
Cultivos	Solución azul tripán (0.4%) (del inglés, trypan blue)	Invitrogen, Thermo Fisher
	Dimetilsulfóxido (DMSO)	PanReac
	Agar purificado	CONDA
	Buffer RLT	Quiagen
Extracción	β -Mercaptoetanol	Sigma-Aldrich
	RNeasy 96 Kit (código: 50974181)	QIAGEN

Tabla 2. Soluciones tampón

SOLUCIONES TAMPÓN	COMPOSICIÓN
Tampón fosfato: PB 0.1M, pH 7	NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O; Na ₂ HPO ₄
Tampón citrato: 80 mM, pH 3	C ₆ H ₉ Na ₃ O ₉ (0.0819 M); C ₆ H ₈ O ₇ (0.0181 M)
Buffer para salt-aging	NaCl (2 M) ; SDS (0.01%) ; PB (10 mM)
Buffer para hibridación	NaCl (2 M); PB (10 mM)
Solución salina de Neff's Modificada (PAS)	NaCl (1.20 g) ; MgSO ₄ ·7H ₂ O (0.04 g) ; CaCl ₂ ·2 H ₂ O (0.04 g); Na ₂ HPO ₄ (1.42 g) ; KH ₂ PO ₄ (1.36 g); 1 Litro de agua destilada

1.2 INSTRUMENTOS Y EQUIPOS

En las siguientes tablas se describen los programas informáticos empleados (Tabla 3) y los materiales e instrumentos usados para el desarrollo de la tesis (Tabla 4).

Tabla 3. Herramientas informáticas utilizadas

HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS	USO
Image J (National Institutes of Health)	Análisis de imágenes
Pubmed (National Institutes of Health)	Motor de búsqueda en bases de datos bibliográficas
GenBank (National Institutes of Health)	Base de datos para ácidos nucleicos
BLAST	Programa informático de alineamiento de secuencias
QuantStudio Real Time PCR (Applied Biosystems)	Software para el análisis PCR
SPSS 23.0 (SPSS Inc.)	Análisis estadístico
IrfanView	Análisis imágenes (valores RGB)
Origin 2022b	Gráficas
Matlab	Max./Min. de gráficas

Tabla 4. Equipos e instrumentos utilizados.

USO	MATERIAL/EQUIPOS	CASA COMERCIAL
GENERAL	Autoclave	Trade Raypa
	Balanza de precisión	Arpival SA
	Centrífuga de sobremesa Biofuge® pico	Heraeus
	Centrífuga Labofuge 400	Heraeus
	Centrífuga refrigerada KUBOTA 6500	Kubota Corporation
	Espátula de microprecisión	JP. selecta
	pH-metro GLP-21	Cultek
	Pipetas estériles (5, 10 y 25 mL)	Thermo Fisher
	Pipetas automáticas	Eppendorf
	Tubos Eppendorf (1.5/2 mL)	Eppendorf
	Tubos Falcon (15/25 mL)	Thermo Fisher
	Sonicador ultrasónico	JP selecta
	Vórtex	Heidolph
	Eppendorf Low bind	Eppendorf
	Espectrofotómetro LAMBDA 950	PerkinElmer
Dynamic light scattering (DLS) instrument	Horiba	
CULTIVOS	Cámara de Neubauer	GmbH & Co
	Campana de flujo laminar	Heraeus
	Criotubos	Thermo Fisher Scientific
	Placas de 24 pocillos	Thermo Fisher Scientific
	Asa de siembra	Thermo Fisher Scientific
	Placas Petri	Thermo Fisher Scientific
	Rasqueta, "Scraper"	Thermo Fisher Scientific
	Portaobjetos	LineaLab
	Microscopio labophot	Nikon

2. MÉTODOS

En la actualidad, la detección de la presencia de *Acanthamoeba* se lleva a cabo principalmente mediante la realización de cultivos o la realización de técnicas PCR. La técnica de PCR permite detectar en tiempo real secuencias específicas del genoma de *Acanthamoeba*, resultando útil en el diagnóstico de queratitis por *Acanthamoeba*. Actualmente, los métodos de PCR que se utilizan en la identificación de *Acanthamoeba* se basan en la detección de ADN. Dada la gran estabilidad química que presentan las moléculas de ADN, la PCR basada en detección de ADN no permite diferenciar, en muchas circunstancias, entre la presencia de parásito vivo y muerto.

En este sentido, en el grupo de investigación de Bioquímica y Biología molecular de la Facultad de Óptica y Optometría de la UCM, se desarrolló un sistema de detección PCR mediante retrotranscriptasa basado en la detección de secuencias específicas de ARN. A continuación, se describe como se realizó el proceso de selección de las secuencias y su uso en las siguientes fases de la tesis.

2.1 SELECCIÓN DE LAS SECUENCIAS DE *ACANTHAMOEBA*

Se eligió la especie *Acanthamoeba castellanii* perteneciente al genotipo T4 debido a que es la más relacionada con casos de queratitis. En base a la literatura, se seleccionaron dos secuencias ARNm de reconocimiento específicas: la proteína de choque térmico70, hsp70 y la proteína de activación de la secuencia específica de transcripción del gen TBP, TPBF (351). Las secuencias de estos ARN mensajeros se obtuvieron de la “*Nucleotide database*” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>).

Para la identificación de las regiones altamente conservadas, se realizaron alineamientos de múltiples secuencias mediante el programa CLUSTAL W2. Los cebadores específicos (primers) se diseñaron mediante el programa Primer Express® v2 Software (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain). Finalmente, la especificidad de los cebadores diseñados se comprobó mediante PCR y secuenciación en la Unidad de Genómica de la UCM.

2.2 FASE 1. DESARROLLO DEL SISTEMA DE DETECCIÓN DE ACANTHAMOEBA CON AUNPS

Para la realización de los experimentos in-vitro de detección mediante AuNPs, se diseñó una secuencia ADN complementaria a la secuencia correspondiente del mensajero objetivo de detección (“*target*”) que había sido seleccionado. La elección de este *target* artificial en ADN es debido a que el ADN muestra más estabilidad que el ARN para la realización de los experimentos in-vitro.

Complementarias a esta secuencia de *target* se diseñaron las sondas (denominadas en la tesis como ADN1 y ADN2) para unirse a las AuNPs. Fueron modificadas en sus extremos 3’ y 5’ respectivamente, con la adición de un grupo tiol (-SH) para favorecer su unión a las AuNPs (Tabla 5).

Tabla 5. Secuencias de ADN *Acanthamoeba* seleccionadas para la realización de los experimentos con AuNPs.

	SECUENCIAS (5'-3')
Target = <i>A.castellanii</i>	GAGCCCACCGCCGCTGCCATCGCGTACGGTCTCGGCAAGAAGTC
ADN1/AuNP	ATGGCAGCGGCGGTGGGCTCTTTAAAA-SH
ADN2/AuNP	SH- AAAATTTTGACTTCTTGCCGAGACCGTA

Para verificar que el sistema con AuNPs a desarrollar es específico para la detección de nuestro *target* : *A.castellanii*, se realizó un estudio de similitud de secuencias con otras especies también relacionadas con queratitis utilizando el software BLAST (National Institutes of Health, Bethesda, MD, Estados Unidos). En el sistema de detección desarrollado basado en AuNPs, el *target* debe unirse a ambas sondas (ADN1 y ADN2) consecutivamente en la misma molécula para promover la agregación de AuNPs e inducir el cambio de color (Figura 11). Por lo tanto, el estudio de alineación se realizó para ambas secuencias de sonda juntas y la búsqueda se realizó para las especies de hongos y bacterias más comunes relacionadas con las QA. Entre ellas: *Fusarium* spp, *Aspergillus* spp, *Candida* spp, *E.coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*. No se encontró similitud para ninguno de ellos.

2.2.1 Diseño del sistema de detección

Se diseñó un sensor colorimétrico con nanopartículas de oro basado en la agregación *crosslinking* para la detección de secuencias específicas de *Acanthamoeba*. Las nanopartículas de oro se modificaron con dos sondas diferentes

de ADN monocatenario (ADN1 y ADN2) complementarias a la secuencia específicas de los mensajeros de *Acanthamoeba* (funcionalización). En presencia de la secuencia específica de *Acanthamoeba* (“*target*”), las sondas ADN1 y ADN2, que se encuentran unidas a la superficie de las AuNPs, hibridarán con ésta mediante complementariedad de las bases nitrogenadas. Esto hace que las AuNPs queden a la distancia óptima para que se den los fenómenos de transferencia de energía de resonancia y la agregación de las AuNPs. El resultado de esta agregación es un cambio de color de la muestra que nos indica la presencia de la secuencia diana del patógeno.

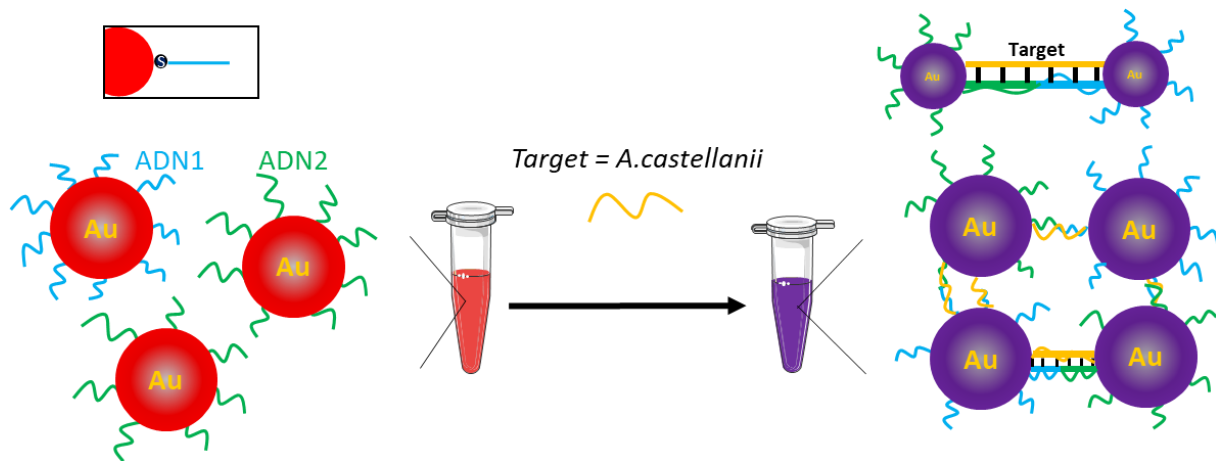


Figura 11. Esquema de las nanopartículas de oro funcionalizadas con el ADN de *Acanthamoeba* (izquierda). La adición de la sonda de reconocimiento (*Target*) de *Acanthamoeba* a una muestra de nanopartículas de oro funcionalizadas promueve la agregación cross-linking, produciendo un cambio de color visible (derecha).

A la hora de diseñar un sistema de detección colorimétrica con nanopartículas de oro, el tamaño de éstas es un factor importante a considerar ya que el fenómeno de resonancia del plasmón de superficie localizado se produce cuando la distancia entre las nanopartículas es menor que su tamaño (303). En este caso, las secuencias de oligonucleótidos constituyen una longitud de 18 nm por lo que el diámetro de las nanopartículas debe ser mayor que dicha distancia para la detección colorimétrica (Figura 12). Por ello, se emplearon nanopartículas de un tamaño en torno a 25-30 nm.

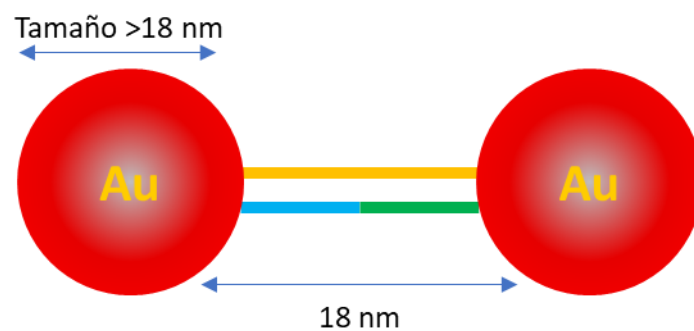


Figura 12. Esquema representativo de la distancia a la que se encuentran las AuNPs separadas por la unión del target con las sondas de ADN1 y ADN2 complementarias.

2.2.2 Nanopartículas de oro

Síntesis de las Nanopartículas de oro

La síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs) esféricas se realizó siguiendo el método de reducción con citrato introducido por Turkevich en 1951 (352). Este procedimiento químico sigue la técnica conocida como “bottom-up” (de abajo hacia arriba) basada en la reducción química de los iones metálicos a átomos metálicos, seguido por la nucleación o agregación controlada de estos átomos formando las

nanopartículas de oro. Esta técnica permite controlar el tamaño de las nanopartículas que va a depender de la relación molar entre el oro y el citrato.

Todo el material de vidrio utilizado en la síntesis de AuNPs se limpió previamente con agua regia durante 30 minutos seguido de un enjuague minucioso con agua ultrapura filtrada con sistema milli-Q (MQ). El agua regia se preparó utilizando ácido clorhídrico concentrado y ácido nítrico concentrado con una relación de volumen de 3: 1 respectivamente. El lavado con agua regia hace que los recipientes queden libres de iones, evitando así, la formación de agregados en el proceso de síntesis.

Para un diámetro teórico de 25 nm, se preparó una solución de ácido cloroáurico (HAuCl_4) 0.25 mM que se llevó durante 5-10 min a ebullición con agitación magnética. Una vez alcanzado el punto de ebullición, y en continua agitación, se añadieron 12.5 mL de citrato sódico 40 mM previamente calentado a 50-60°. En este paso el citrato sódico se convierte en ácido cítrico. Durante el proceso, la disolución, previamente amarilla, pasa primero a ser transparente y durante un tiempo de aproximadamente 20 minutos, cambia de color a negro/púrpura para finalmente terminar con un color rojizo indicativo del fin del proceso. La suspensión de AuNPs se dejó enfriar a temperatura ambiente (22°C) y se almacenó en oscuridad a 4°C.

Las AuNPs sintetizadas se preconcentraron mediante centrifugación a 3000 rpm (857 rcf) durante 15 minutos. A continuación, se eliminó el sobrenadante quedándonos sólo con el pellet obtenido.

Caracterización de las AuNPs

Las nanopartículas de oro se caracterizaron mediante espectroscopía visible, microscopía electrónica de transmisión y dispersión dinámica de luz.

La caracterización óptica de las AuNPs se realizó mediante el espectrofotómetro Lambda 950 (PerkinElmer; Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) obteniendo el espectro visible desde 400 nm a 800 nm. En el caso de que las nanopartículas estuviesen muy concentradas se diluían con agua MQ. Las muestras se añadieron a una cubeta de cuarzo Hellma 104 Suprasil (Fisher Scientific; Hampton, Nuevo Hampshire, Estados Unidos) de un paso óptico de 10 mm. El agua MQ se usó como blanco. El pico de absorbancia de los espectros se midió con el programa informático MATLAB R2018b (MathWorks; Natick, Massachusetts, Estados Unidos).

Las dimensiones de AuNPs se evaluaron utilizando un microscopio electrónico de transmisión (TEM) mediante el sistema JEOL JEM 2100-HT que funciona a un voltaje de aceleración de 200 kV (JEOL Ltd.; Tokio, Japón). Las muestras se prepararon centrifugando las AuNPs sintetizadas (500 μ l) a 3000 rpm (857 rcf) durante 15 minutos, seguido de la redispersión del sedimento en 1 ml de MQ. Seguidamente se colocó 5 μ l de esta solución en una rejilla de visualización del microscopio (malla Formvar / Carbon 200, cobre, TED PELLA) y se dejó secar durante la noche, en un entorno protegido, un día antes de la obtención de imágenes. Las imágenes TEM fueron analizadas por el software Image J (NIH; Bethesda, Maryland, Estados Unidos). Los diámetros se estimaron en base al análisis de al menos 100 partículas haciendo una media del tamaño vertical y el horizontal.

La dispersión dinámica de luz permite medir el tamaño y la distribución de moléculas y partículas en suspensión. Esta técnica se basa en la dispersión de la luz

(láser) a través de la disolución, debido al movimiento browniano de las partículas. La cantidad de luz dispersa es directamente proporcional al tamaño de una nanopartícula. Esto significa que los tamaños más pequeños inducen una menor intensidad de luz dispersa (353). Se utilizó el equipo NanoPartica SZ-100Z (Horiba; Kioto, Japón) y se utilizaron cubetas de cuarzo Hellma de paso óptico 10 mm. Todas las mediciones se realizaron con muestras diluidas hasta alcanzar una concentración final de oro metálico ($[Au^0]$) de 0.03 mM. Se realizó un promedio de cinco medidas por muestra durante 160 segundos bajo una temperatura de 25°C y fijando un ángulo de medida de 173°. Todas las medidas tuvieron un conteo inferior a 10^6 cps (conteos por segundo). Las concentraciones de oro metálico $[Au^0]$ se estimaron basándose en datos de UV-vis asumiendo que la correlación Abs_{400} de 1.2 corresponde a $[Au^0] = 0.5$ mM (354).

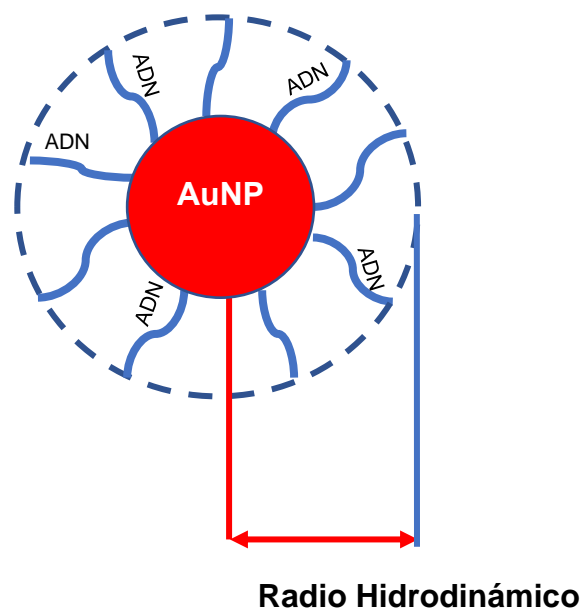


Figura 13. Diagrama esquemático del tamaño hidrodinámico de la AuNP y el ADN unido, medido mediante DLS. Con la unión del ADN el tamaño medido es mayor.

Funcionalización de las AuNPs

Las nanopartículas de oro se modificaron en su superficie con dos secuencias de oligonucleótidos tiolados (sondas), ADN1 y ADN2, un tipo por cada nanopartícula de oro. Este proceso se conoce como funcionalización. La unión de la sonda en la superficie de oro depende de las interacciones covalentes oro-tiol. Además, los oligonucleótidos están cargados negativamente, lo que genera repulsiones electrostáticas entre las propias hebras y también con la superficie de la nanopartícula lo que dificulta la inmovilización de las sondas en la AuNP (355). Para favorecer una correcta unión y en proporciones adecuadas, se emplearon dos estrategias: el método “salt aging” y el método de reducción del pH.

- **Método “salt aging”**

El método de sal fue descrito por Mirkin y colaboradores (324) y se basa principalmente en reducir la repulsión entre las cargas negativas de las nanopartículas y el ADN mediante la adición de sal. Sin embargo, esta adición debe hacerse lentamente para mantener la estabilidad de las nanopartículas (356).

El protocolo con sal se optimizó para lograr la máxima unión de ADN en las AuNPs. Se probaron varios protocolos para realizar el “salt-aging”, variando la concentración de sal y sus formas de añadirla, la adición de tensioactivos (SDS), y variando la relación AuNPs/ADN como se detalla en la Tabla 11 de resultados.

Una vez optimizado, el protocolo seleccionado fue el siguiente: una mezcla compuesta por una solución que contenía 5 μL de AuNPs concentradas (10 nM), 10 μL de PB (10 mM), 1 μL de SDS (10 %), 44 μL de ADN1 (100 μM) y 40 μL de MQ se

incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente (22°C). La relación ADN/AuNP fue de 4055.

Transcurrido este tiempo, se añadió la solución con 2 M NaCl+ SDS 0.01% + PB 0.01 M en incrementos de 1 µl (10 mM) hasta conseguir una concentración final de NaCl de 0.18 M. Tras cada adición, la solución se sonicó durante 10 segundos y se incubó durante 20 minutos en un mezclador a 22°C y 350 rpm, en posición horizontal y protegida de la luz. Tras la última adición de sal, la solución se incubó durante la noche (12 horas) en las mismas condiciones. El exceso de ADN1 libre se eliminó mediante centrifugación a 8000 rpm (1523 RCF) durante 10 minutos y el pellet obtenido se dispersó en 100 µl de SDS al 0.01%.

- **Método de reducción del pH**

Este método se basa en la protonación de bases del ADN a pH ácido para reducir la repulsión entre las cadenas de ADN y AuNPs. Se realizó para funcionalizar las nanopartículas con el ADN2.

El protocolo realizado se describe a continuación: se prepara una solución que contiene 138 µL de tampón citrato, pH: 3, (Cf: 9 mM) y 10 µL de ADN2 preparado en agua MQ (Cf: 6.7 µM). La solución se sonicó durante 3 minutos seguido de la adición de 13 µl de AuNPs 4.6 nM y se incubó durante 2 horas, en un termo-mezclador, en posición horizontal a 450 rpm y 22°C. La relación de concentración de ADN2-AuNPs usada fue 1400.

Se repitió el mismo procedimiento para diferentes relaciones de ADN por nanopartícula (ADN/AuNP) de 658, 690, 800, 1391. Las concentraciones finales de tampón de citrato probadas fueron 7.4 ; 7.5; 7.6; 54 y 9 mM y pH de 3.

Se eliminó el exceso de ADN2 mediante centrifugación a 4000 rpm (1523 RCF) durante 10 minutos y el sedimento se redispersó en 100 μ l de PB 10mM. La solución de ADN2-AuNPs se diluyó hasta una concentración final de 13.3 nM de AuNPs ($[Au^0]$ de 4.91 mM).

Las optimizaciones mostraron que la mejor condición fue la relación ADN/NP 1400, el pH de 3 y la concentración de tampón citrato de 9 mM.

2.2.3 Hibridación- estrategia de detección colorimétrica

La estrategia colorimétrica se basó en la agregación (*crosslinking*) específica de las AuNPs inducida por la hibridación entre el *target* con los dos conjuntos de AuNPs funcionalizadas con ADN1 y ADN2. De esta manera, la presencia del *target*, secuencia específica de *Acanthamoeba castellanii*, es detectada por un cambio colorimétrico de rojo a morado. La estabilización de las AuNPs funcionalizadas con ADN se evaluó estudiando su agregación inespecífica, para lo cual se probaron concentraciones crecientes de NaCl que iban de 0.25 a 0.4 M con una concentración constante de AuNP de 1 nM para cada conjunto de ADN-AuNP. La intensidad del color y, por tanto, la perceptibilidad a simple vista del cambio de color se ajustó probando diferentes concentraciones de AuNPs de 1 a 0.4 nM manteniendo constante la concentración de *target* (0.02 μ M).

Para la detección del *target*, se mezclaron las AuNPs funcionalizadas con el ADN1 y ADN2 (2.3 μL de ADN1-AuNPs y 4 μL de ADN2-AuNPs) con el *target* (volumen ajustado a cada concentración final probada) y 2.5 μL de NaCl 2 M preparado en solución PB 10mM, pH 7 para obtener una concentración final de NaCl de 0.25 M. La adición de sal es para minimizar la repulsión electrostática entre AuNP y ADN y favorecer la agregación. Se probaron diferentes concentraciones de *target* desde 0.005 hasta 0.2 μM . Las muestras control se prepararon de la misma manera, utilizando el volumen equivalente de 10 mM de PB, pH 7 en lugar del *target*. Tras la adición del *target*, las soluciones se mantuvieron a temperatura ambiente (22°C) hasta que se produjo un cambio de color visible.

Análisis de la respuesta colorimétrica

La respuesta colorimétrica se evaluó directamente a simple vista comparando el color de la muestra con *target* con la muestra sin *target* (control). Además, las muestras se fotografiaron a 15 cm de distancia con un smartphone Samsung S8 (Suwon, Corea del Sur) con una resolución dual de 12 MP, 2960 x 1440 píxeles a 507 ppi.

Con las fotografías tomadas de las muestras se empleó un enfoque colorimétrico alternativo basado en el análisis de las coordenadas de color rojo, verde y azul (coordenadas RGB) de cada muestra. Estas coordenadas se tomaron de 5 puntos diferentes para cada muestra dentro de la misma imagen y se midieron utilizando el software Irfan view. Se analizaron al menos tres imágenes. Se calcularon los datos promedio de las coordenadas y la relación R/B, y los valores se normalizaron sobre

los valores de la muestra control (sin *target*) sin agregación. Se representó la correlación de la concentración de ADN frente a la relación R/B y se realizó su ajuste utilizando el software Origin 2021 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, Estados Unidos).

2.2.4 Cultivos de *Acanthamoeba*

Un cultivo monoaxénico de *Acanthamoeba castellanii* (CCAP 1501/1A; genotipo T4) fue obtenido de Culture Collection of Algae and Protozoa (Cumbria, Reino Unido).

Para el crecimiento de la ameba, se realizaron cultivos monoxénicos en medio sólido AGAR no nutriente en placas Petri. En este tipo de cultivos, la ameba crece en presencia de un único organismo, en este caso, *Escherichia coli* (*E.coli*) (ATCC:PTA-1980). Esta bacteria sirve de alimento para la *Acanthamoeba*, permitiendo así, mantener a la ameba en su fase activa de trofozoíto.

En primer lugar se preparó el medio AGAR no nutriente en una solución PAS (del inglés, Page's amoeba saline) descrita anteriormente y fue autoclavado (357). Con el medio aún en estado líquido, se plaqueó y se esperó a que se enfriase y solidificase. Por otro lado, para preparar *E.coli* se sembraron placas con *E.coli* en agar sangre un día antes de la realización de los cultivos.

Para asegurarnos de que la ameba está en fase activa de trofozoíto, en las placas con el AGAR no nutritivo se distribuyó la *E.coli* en forma de Z (Figura 14.A). Para ello, la *E.coli* se levantó directamente con el asa de siembra del agar sangre donde estaba sembrada. Se cortó con un bisturí un trozo rectangular del cultivo inicial de *Acanthamoeba* y se puso en la nueva placa en un extremo de la "Z".

De esta manera, la ameba para alimentarse de la *E.coli* debe avanzar por la placa siguiendo el camino de la Z dejando un rastro como se muestra en Figura 14.B y confirma que la ameba se encuentra en fase activa de trofozoíto. Las placas se almacenaron en la estufa a 30°C durante una media de 3 días para permitir el crecimiento de la ameba. Transcurrido ese tiempo, las placas se observaron con microscopio óptico a 10X para comprobar el crecimiento de la ameba en la placa. La identificación de los trofozoítos y/o quistes se hizo en base a su morfología (Figura 15).

Estos cultivos de *Acanthamoeba* se emplearon para la realización de los experimentos posteriores.

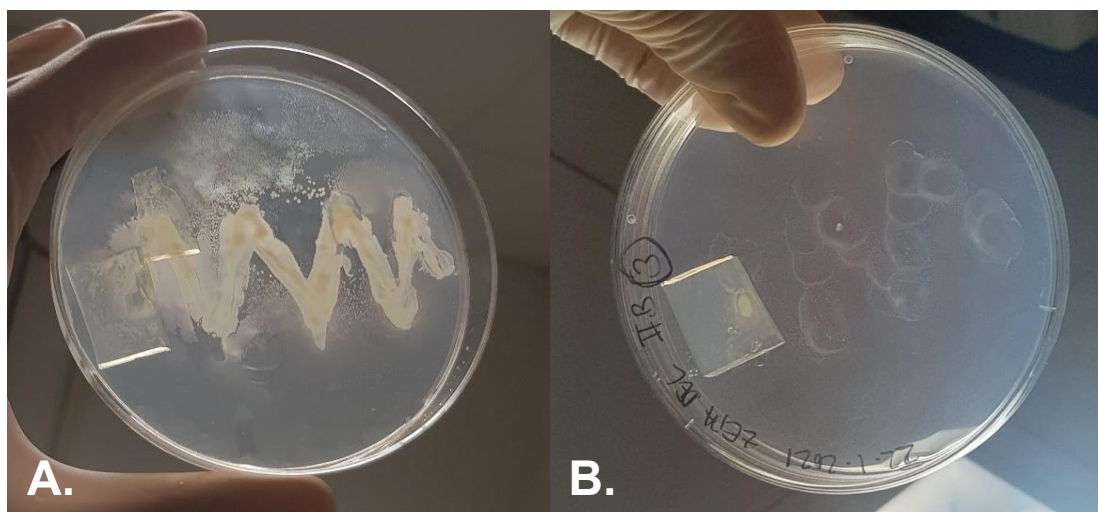


Figura 14. A. Placa con *E.coli* distribuida en forma de 'Z' en medio AGAR. E un extremo de la 'Z' se encuentra un corte de agar con *Acanthamoeba*. **B.** Tras un período de 3 días, la ameba se alimenta de la *E.coli* siguiendo el camino de la 'Z'. *E.coli* desaparece y se ve el rastro de la ameba por la placa.

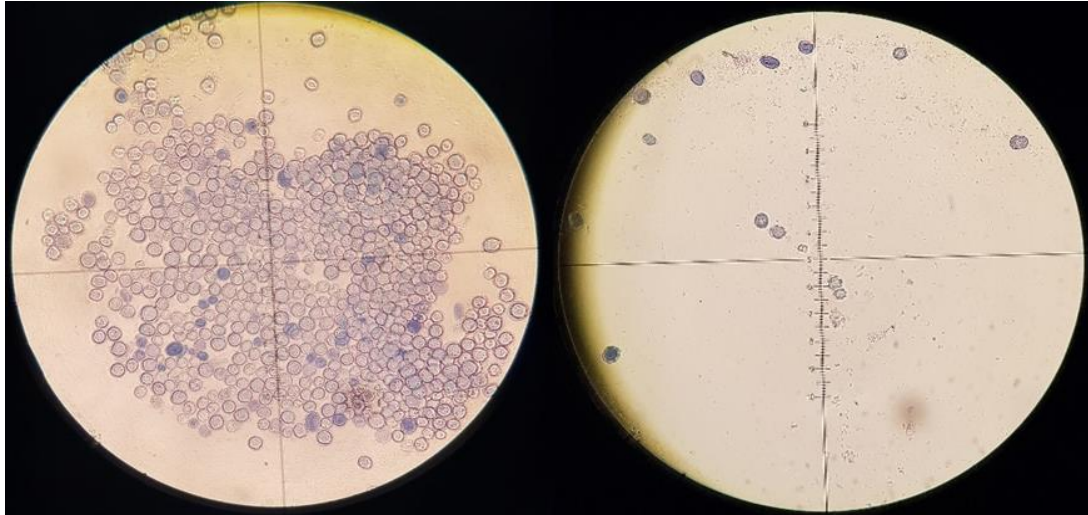


Figura 15. Imagen de un cultivo de *Acanthamoeba* vista con microscopio óptico, 10X. En la imagen de la izquierda se observan predominantemente quistes y en la de la derecha se puede observar algunos trofozoítos.

Cuantificación de amebas

Las placas de cultivo con *Acanthamoeba* se lavaron por arrastre con 1 mL de solución PAS y asa estéril, recogiendo el lavado en un tubo eppendorf. La dilución extraída se mezcló con solución de azul tripán en proporción 1:1. Para cuantificar la cantidad de ameba, se pipetearon 10 μ L de la mezcla en cada lado de una cámara de recuento Neubauer mejorada (Paul Marienfeld GmbH & Co., Lauda-Königshhofen, Alemania). Seguidamente, se colocó en un microscopio óptico modelo labophot (Nikon Corp; Tokio, Japón) donde se observaron con un aumento de 10x y se cuantificaron las células de los cuatro cuadrantes ubicados en las esquinas de la cámara de recuento obteniendo un promedio del número de células (Figura 16).

2.3 FASE 2. EFICACIA DE LAS SOLUCIONES DE LIMPIEZA / MANTENIMIENTO

2.3.1 Contaminación de las lentes de contacto

Para la realización del estudio de la contaminación de lentes de contacto con *Acanthamoeba* y la evaluación de la eficacia de las soluciones de limpieza/mantenimiento se utilizaron tres tipos de lentes de contacto de materiales diferentes descritos en Tabla 6. Se eligió un n=8 por cada tipo de lente.

Tabla 6. Características de las lentes de contacto empleadas en el estudio.

PARÁMETROS	LENTE DE CONTACTO BLANDAS		LC RPG
Nombre comercial	Biofinity	Biomedics 55	Paragon CRT
Material (USAN)	Comfilcon A	Ocufilecon D	Paflucocon D
Material	Hidrogel de Silicona	Hidrogel	Gas permeable
Grupo FDA	V	IV	I
Dk/t (at -3.00D)	116	27	100
Contenido en agua (%)	48%	55%	<1%
Curva base (mm)	8.7	<i>Potencias negativas:</i> 8.6 /8.9 <i>Potencias Positivas:</i> 8.8	8.5
Diámetro (mm)	14.5	14.2	
Potencia (D)	-0.50 a -3.00		

En primer lugar, en condiciones de esterilidad, dentro de una cabina de flujo laminar, las lentes de contacto se colocaron en placas de 24 pocillos sumergidas en solución salina durante las 24 horas previas a la realización de los experimentos para igualar las condiciones de partida de todas las lentes.

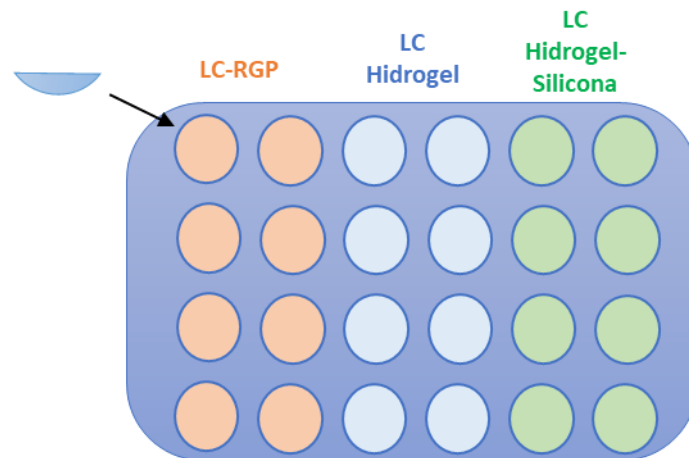


Figura 17. Disposición de las lentes de contacto en la placa de 24.

Pasadas las 24 horas, las lentes de contacto se colocaron en una placa nueva con la cara anterior de la lente hacia arriba. En cada pocillo se añadió 1 ml de una disolución de *Acanthamoeba* preparada como se indicó previamente y se ajustó para tener una concentración final de 1×10^5 amebas/ml por pocillo. Cada placa se dejó incubando durante 24h en la estufa a 30°C.

Para comprobar la adhesión de la *Acanthamoeba* a las lentes de contacto transcurridas 24 horas, se hizo una prueba con cada tipo de lente de contacto con un $n=3$ y se observaron con microscopio óptico. Las lentes de contacto se cogieron con pinzas y se sumergieron en solución salina con el fin de eliminar posibles amebas que

estuviesen flotando y no estuvieran adheridas a la superficie de la lente. Además, a las LC blandas se les realizó un pequeño corte para poder colocarlas aplanadas en un portaobjetos y poder observarlas al microscopio.

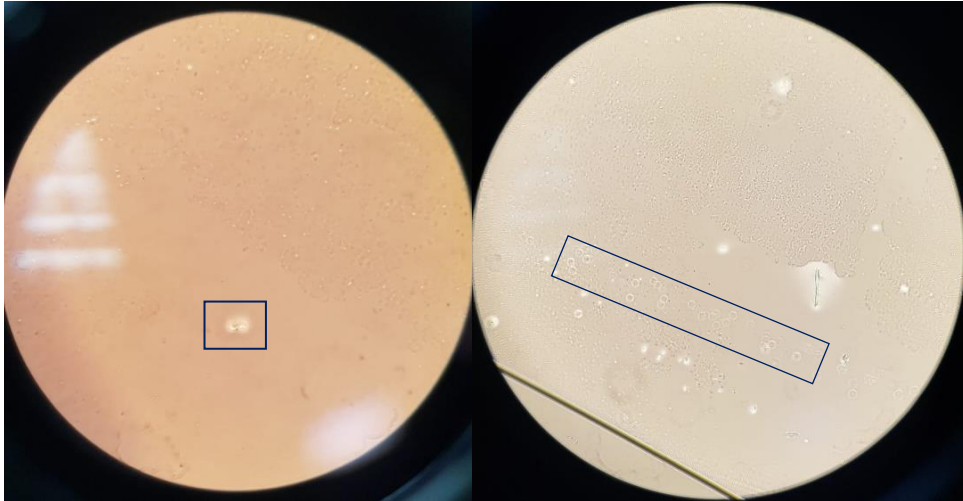


Figura 18. LC Hidrogel de silicona tras la contaminación con *A.castellanii*. En los cuadros se señala la presencia de quistes.

2.3.2 Desinfección de las lentes de contacto

Transcurrido el tiempo de contaminación con *Acanthamoeba*, para cada placa de 24 pocillos se realizó un tratamiento diferente. El diseño de los experimentos realizados se resume en la siguiente tabla.

Tabla 7. Diseño de estudio realizado por cada placa.

	Contaminación <i>Acanthamoeba</i>	LIMPIEZA-TRATAMIENTO			
		1 ^{er} PASO			2 ^o PASO
		Limpiador	Aclarado		Sistema de limpieza/ mantenimiento
			Agua de grifo	NaCl 0.9%	
Control negativo	-	-	-	-	-
Control Positivo	sí	-	-	-	-
Control aclarado con salina	sí	-	-	sí	-
Placa X	sí	-	-	sí	Clorhexidina
Placa 1	sí	-	sí	-	Solución Única
Placa 2					Povidona
Placa 3					Progent
Placa 4					Ever clean
Placa 5	sí	-	-	sí	Solución Única
Placa 6					Povidona
Placa 7					Progent
Placa 8					Ever clean
Placa 9	sí	sí	sí	-	Solución Única
Placa 10					Povidona
Placa 11					Progent
Placa 12					Ever clean
Placa 13	sí	sí	-	sí	Solución Única
Placa 14					Povidona
Placa 15					Progent
Placa 16					Ever clean

Para la realización de la placa de control negativo, las LC no se contaminaron con *Acanthamoeba* y se conservaron en medio PAS. Como control positivo, las LC fueron contaminadas sin utilizar ningún tipo de tratamiento posterior.

Como sistemas de aclarado, desinfección y mantenimiento de las lentes de contacto se utilizaron diferentes productos con diferentes principios activos descritos en la tabla 8.

Tabla 8. Soluciones de limpieza empleadas en el estudio.

PRODUCTO	CASA COMERCIAL	COMPOSICIÓN
Ever Clean Plus	Avizor S.A; Madrid, España	Peróxido de hidrógeno al 3% y comprimidos con agentes biotecnológicos para limpieza, humectación y neutralización.
Solución Única clásica	Avizor S.A; Madrid, España	Solución tamponada isotónica y estéril con Poloxamer, Edetato disódico y Polihexanida (PHMB) 0.0001%
Progent	Menicon; Nagoya, Japón	Hipoclorito de sodio y Bromuro de Potasio
Cleadow	Opthecs; Tokyo, Japón	Iodopovidona 0.05% Comprimido: sulfito de sodio, enzima proteolítica
Clorhexidina	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE.UU	Clorhexidina digluconato, 20% en H ₂ O
Limpiador: Duolens	Disop S.A; Madrid, España	Ácido bórico, tetraborato sódico, hidroxietilcelulosa, cocoamphodiacetato disódico, alcohol isopropílico 20% y edetato disódico 0.1% en agua purificada.

2.3.3 Limpieza- tratamiento de las lentes de contacto

Primer paso

Previo al tratamiento de las lentes con los sistemas de limpieza/mantenimiento: Solución única, solución de povidona yodada, Progent, Ever Clean se incluyó el uso de un limpiador y/o el aclarado de las lentes con solución salina y con agua de grifo.

El limpiador empleado, Duolens, se usó tanto con las lentes de contacto blandas como con las lentes RPG. Para ello, las lentes de contacto se sacaron de la placa donde se encontraban con la ameba, se colocaron en la palma de la mano con el uso de guantes de protección, y se frotaron siguiendo instrucciones de fabricante. Seguidamente, se aclararon por inmersión con solución salina o con agua de grifo.

El siguiente paso de aclarado de las lentes ya sea con solución salina o con agua de grifo se realizó cogiendo con pinzas las lentes de contacto tras su contaminación y aclarándolas por inmersión antes de aplicar el tratamiento posterior. Para evaluar el efecto que tiene sólo el aclarado de las lentes con la solución salina se realizó un control. Para ello, tras su contaminación y transcurridas las 24 horas, las lentes se aclararon por inmersión con la solución salina únicamente.

Por otro lado, también se utilizaron muestras de agua del grifo y de la marca comercial Bezoya para analizar individualmente la posible presencia de ameba mediante la qPCR. El agua se filtró mediante la técnica de filtración al vacío. Un volumen de agua de 500 ml se hizo pasar través de un papel de filtro circular en cuya superficie se quedan retenidos los microorganismos. El papel del filtro se troceó con bisturí en una placa de cultivos y los trozos se introdujeron en un eppendorf al que se añadió 300 µL del buffer RLT. Las muestras se agitaron en el vórtex y se centrifugaron

a 1000g durante 3 minutos. El líquido restante, se extrajo a otro eppendorf y se conservó a -80°C hasta la realización de la qPCR.

Segundo paso

A continuación, se describen los productos que se utilizaron en el segundo paso para la limpieza y desinfección de las lentes de contacto.

- **Clorhexidina**

La clorhexidina es un compuesto biguanídico utilizado como agente antiséptico y que tiene actividad antibacteriana tópica. Se utilizó una solución de Clorhexidina digluconato (20% en H₂O) que se diluyó en agua MQ para obtener una concentración final de 0.02% como único tratamiento de las lentes.

- **Ever Clean Plus**

Se utilizó el sistema peróxido Ever Clean® de Avizor con las lentes blandas y las RPG. La lente de contacto se introdujo en el portales con la solución Ever Clean®. Esta solución contiene peróxido de hidrógeno al 3% con alto poder oxidante para la desinfección. Los radicales libres que se liberan son capaces de romper las paredes celulares bacterianas. Acto seguido se añade el comprimido, que actúa en combinación con el peróxido de hidrógeno desinfectando. Como componente principal, contiene catalasa, una enzima que actúa neutralizando el peróxido de hidrógeno. Este proceso provoca la liberación de oxígeno gaseoso que se expulsa al exterior a través de una válvula que dispone el portales. Al final del proceso en el portales queda una solución salina formada por el agua proveniente de la neutralización del peróxido de hidrógeno junto a otros componentes del comprimido.

- **Cleadew (Iodopovidona)**

La solución de povidona yodada (PY) empleada cuenta con dos versiones distintas según sean lentes de contacto blandas o lentes permeables al gas. Las lentes de contacto de estudio (blandas y RPG) se introdujeron en el portales al que se añadió un comprimido Cleadew junto a la solución Cleadew. El comprimido contiene povidona yodada encargada de destruir los microorganismos nocivos, ácido ascórbico para neutralizar y una enzima proteolítica para eliminar los depósitos de proteínas. La solución añadida se utiliza para disolver el comprimido. Al principio, la solución tiene color naranja que cambia a transparente cuando acaba el proceso de limpieza. Tras un mínimo de 4 horas, se retiran las lentes y se enjuagan con la solución Cleadew. En el caso de las lentes RPG, se aclaran las lentes con solución salina.

- **Progent**

Es una solución de desproteización y desinfección para lentes de contacto RPG cuyo uso está contraindicado para lentes de contacto blandas por posible decoloración del material. Sin embargo, por cuestiones de metodología experimental en esta tesis se empleó también con las lentes de contacto blandas. Se añadió al portales con las lentes de contacto dos soluciones: una solución A compuesta por hipoclorito de sodio y una solución B compuesta por Bromuro de Potasio que en conjunto actúan destruyendo las cadenas de proteínas. Por recomendación del fabricante, las lentes se retiraron a los 30 minutos y se aclararon con solución salina.

- **Solución única clásica**

Esta solución multipropósito está indicada para la desinfección, aclarado y conservación de lentes de contacto blandas. Como agente antimicrobiano contiene

PHMB, perteneciente al grupo de las biguanidas. Para asegurar la completa aseptización, el fabricante recomienda conservar las lentes de contacto con la solución única un tiempo mínimo de 4 horas. En este estudio se conservaron durante 24 horas.

2.3.4 Extracción de *Acanthamoeba* de las lentes de contacto

Transcurrido el tiempo de tratamiento, las lentes de contacto se sacaron de las placas con las soluciones de tratamiento y se metieron en eppendorfs con 1 ml de solución salina helada. Se incubaron las muestras con hielo durante 15 min y posteriormente se agitaron en el vórtex durante 10 segundos para promover la liberación de ameba unida a las LC. Estudios previos han mostrado la efectividad de este método para extraer los trofozoítos o quistes adheridos a la superficie de la lente de contacto (358) .Se extrajo la lente de contacto y el líquido restante se centrifugó a 1000 g durante 3 minutos. Se eliminó el sobrenadante, y el precipitado se resuspendió en RLT. Finalmente, las muestras con el buffer RLT se almacenaron a -80° hasta la realización de la PCR.

2.3.5 Detección de la presencia de *Acanthamoeba* residual

Para detectar la presencia de ameba residual en las muestras se utilizó el sistema de detección con AuNPs y la técnica de PCR cuantitativa.

Nanopartículas de oro

Para el uso de las AuNPs con las muestras de *Acanthamoeba* real, que estaban conservadas en RLT, se realizó previamente un protocolo de purificación de los ácidos nucleicos basado en el procedimiento tradicional fenol-cloroformo (359). 266 μL de la muestra de *A. castellanii*, se mezcló con 133 μL de fenol saturado de agua y 133 μL de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 y se agitó por inmersión. Se incubó durante 10 minutos con hielo y se centrifugó 10 minutos a 9000 rpm. El sobrenadante extraído se conservó y se le añadió 1/10 de su volumen de acetato sódico 3 M y 2 veces su volumen de etanol absoluto. Se incubó 10 minutos en hielo y se centrifugó posteriormente en las mismas condiciones. Eliminamos el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en PB 10mM.

La muestra restante se mezcló con las nanopartículas de oro funcionalizadas en las proporciones optimizadas con anterioridad para la detección del material genético de ameba residual.

PCR cuantitativa

El objetivo de la PCR cuantitativa (qPCR) fue detectar la presencia de ARNm de *Acanthamoeba* residual tras el tratamiento de las lentes de contacto. Las extracciones se hicieron con el kit “RNeasy 96 kit” (QIAGEN), siguiendo indicaciones del fabricante, con lavados y dos eluciones de 70 μL . La síntesis del ADN complementario (ADNc) se hizo con el kit “PrimeScript RTR Master Mix (Perfect Real Time)” de TAKARA, partiendo de 8 μL de ARN total y en 10 μL de volumen final.

La PCR cuantitativa se hizo por duplicado para cada gen utilizando el kit “FastStart Universal SYBRGreen Master (ROX)” (MERCK-Sigma). Los primers diseñados y utilizados se muestran en la Tabla 9. Las reacciones qPCR se hicieron en placas 384, usando el termociclador “QuantStudio 7Flex” (Applied Biosystems). La programación de los ciclos fue la siguiente: 10 min a 95°C, 40 ciclos de 15 s a 95°C, 1 min a 65°C.

Por último, la extracción y análisis de datos se hizo con el software “QuantStudio Real Time PCR”.

Tabla 9. Secuencias de los diferentes primers específicos analizados mediante PCR cuantitativa.

PRIMER	SECUENCIA (foward / reverse)
hsp70	5'-GACTTCTTGCCGAGACCGTA-3' / 5'-CCCGCCTACTTCAACGACT-3'
TPBF	5'-TTCTTCCGCGTCTACTTCACC-3' / 5'-CATCGCATTCTCGCAATC-3'

2.4 ANÁLISIS DE LOS DATOS

El análisis estadístico de los resultados presentados se realizó utilizando el software SPSS Statistics 23 (IBM; Chicago, Illinois, Estados Unidos). La normalidad de las distribuciones se comprobó mediante el test de Shapiro-Wilk dando como resultado la no normalidad. Por ello, para el análisis estadístico se utilizaron test no paramétricos.

En la primera fase del estudio, para las optimizaciones y pruebas del sistema de detección con AuNPs, se utilizó el test no paramétrico U de Mann-withney para comparar el cambio colorimétrico respecto a la muestra control.

En la segunda fase del estudio se analizaron los resultados obtenidos de la PCR cuantitativa con el software “QuantStudio Real Time PCR” (Applied Biosystems; Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Los resultados obtenidos en la PCR se expresaron, por un lado, de manera cualitativa con el porcentaje de resultados positivos y negativos obtenidos y, por otro, de manera cuantitativa con los valores de Ct obtenidos representados con la media y su desviación estándar (DE). La eficacia de los diferentes tratamientos respecto de los controles se evaluó para las variables cualitativas con el test chi cuadrado con la prueba exacta de Fisher en los casos donde el recuento esperado fue menor que 5 en más del 20% de la muestra. Para evaluar la eficacia entre los diferentes tratamientos con las variables cuantitativas se utilizó el test U de Mann-Withney para muestras independientes. Para todos los casos, se fijó un nivel de significación estadística del 95 % ($p < 0.05$).

IV. RESULTADOS

1. FASE 1. SISTEMA DE DETECCIÓN CON AUNPS

A continuación, se describen los resultados obtenidos en la Fase 1, con la discusión de los mismos.

1.1 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LAS AUNPS

La síntesis de AuNPs se realizó por el método de reducción de citrato que permite ajustar el tamaño de las nanopartículas esféricas de oro cambiando la concentración de citrato añadida a la solución acuosa de HAuCl_4 (352).

El espectro visible de las nanopartículas de oro sintetizadas se muestra en la Figura 19, donde se observa un pico de absorbancia para una longitud de onda de 524.95 ± 0.04 nm. El tamaño de las nanopartículas de oro sintetizadas se puede estimar a partir del espectro visible con el método propuesto por Haiss et al. (360), que relaciona la longitud de onda del pico de absorbancia con el cociente entre la absorbancia de dicho pico y la de 450 nm ($A_{\text{máx}}/A_{450}$). Teóricamente, la disminución de la relación ($A_{\text{máx}}/A_{450}$) resulta en la disminución del tamaño de las AuNPs. Mediante este método, se estimaron tamaños en torno a 30 nm para un pico de absorbancia entre 524-525 nm y de 20 nm para un cociente $A_{\text{máx}}/A_{450}$ de 1.73. Mediante UV-vis también se evaluó la concentración de oro metálico $[\text{Au}^0]$ de las AuNPs basándose en la correlación teórica de que un valor de 1.2 para la absorbancia a 400 nm corresponde a una concentración de Au^0 de 0.5 mM (354). En este caso la $[\text{Au}^0]$ fue de 0.26 mM.

La concentración de las AuNPs se estimó a partir de los datos obtenidos en el espectro visible utilizando la ley de Lambert-Beer. Para ello es necesario conocer el valor del coeficiente de extinción molar que se obtiene a partir de estudios que han

correlacionado dichos valores con el tamaño de las nanopartículas (360). Utilizando un coeficiente de extinción de $\sim 1.10 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (para nanopartículas de $\sim 25 \text{ nm}$ de diámetro) se estimó una concentración de AuNPs sintetizadas de 0.4 nM . Una vez que las nanopartículas sintetizadas fueron caracterizadas, se preconcentraron antes de unir el ADN a las nanopartículas con el objetivo de trabajar con concentraciones mayores. El espectro visible mostró una buena dispersión de las nanopartículas con una posición del pico de absorbancia máximo de $524.72 \pm 0.07 \text{ nm}$; $[\text{AuNP}] = 207 \text{ nM}$ y $[\text{Au}^0] = 104 \text{ mM}$.

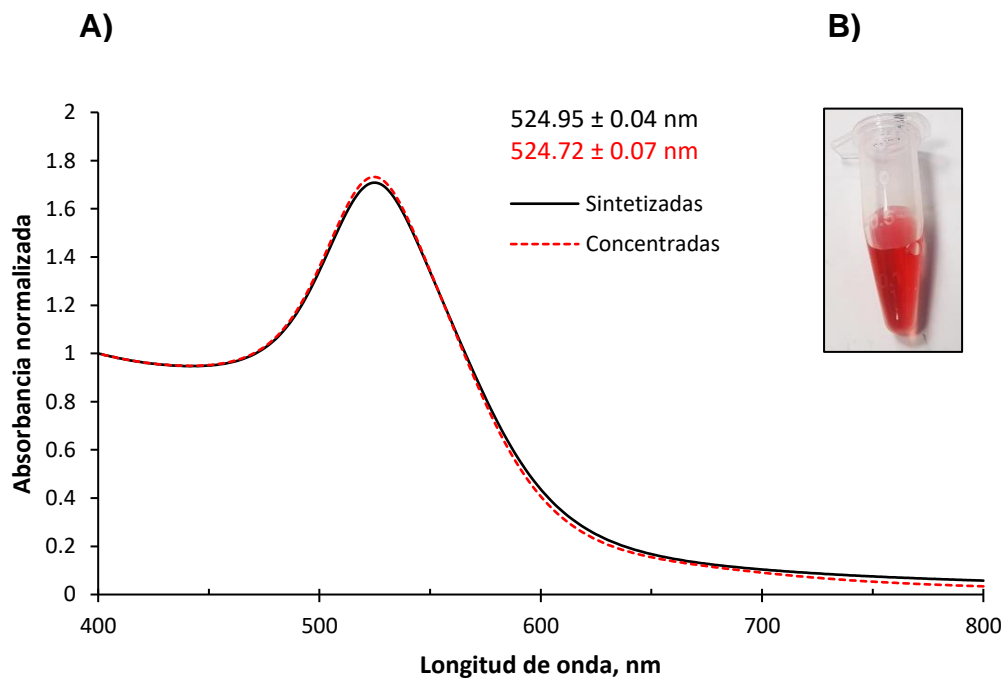


Figura 19. Espectro visible de las nanopartículas de oro sintetizadas y las nanopartículas concentradas (diluidas 1000 veces). B) Imagen de las nanopartículas de oro sintetizadas.

El análisis por TEM de las AuNPs sintetizadas mostró partículas de forma esférica con buena dispersión como se muestra en la Figura 20.B. En cuanto a su tamaño, las medidas de la microscopía electrónica de transmisión, cuyo histograma de frecuencias se muestra en la Figura 20.A, ofrecieron una media de 25.86 ± 3.50 nm. Las mediciones mediante DLS mostraron un diámetro hidrodinámico de 28.91 ± 0.43 nm para las AuNPs sintetizadas y de 30.12 ± 0.72 nm para las AuNPs preconcentradas una diferencia insignificante entre ellas de 1.21 nm que indica que las AuNPs permanecieron estables. La diferencia de tamaño entre las medidas realizadas mediante TEM y DLS es esperable. Esta diferencia se debe principalmente al hecho de que mediante TEM se miden las nanopartículas en estado seco, mientras que mediante DLS se miden las nanopartículas en disolución. Por lo tanto, se espera que el tamaño de las nanopartículas fuese mayor mediante DLS, debido a las moléculas de disolvente unidas a la superficie de oro (361). Además, hay que considerar que la microscopía ofrece una medida directa del tamaño, mientras que la dispersión lo mide indirectamente.

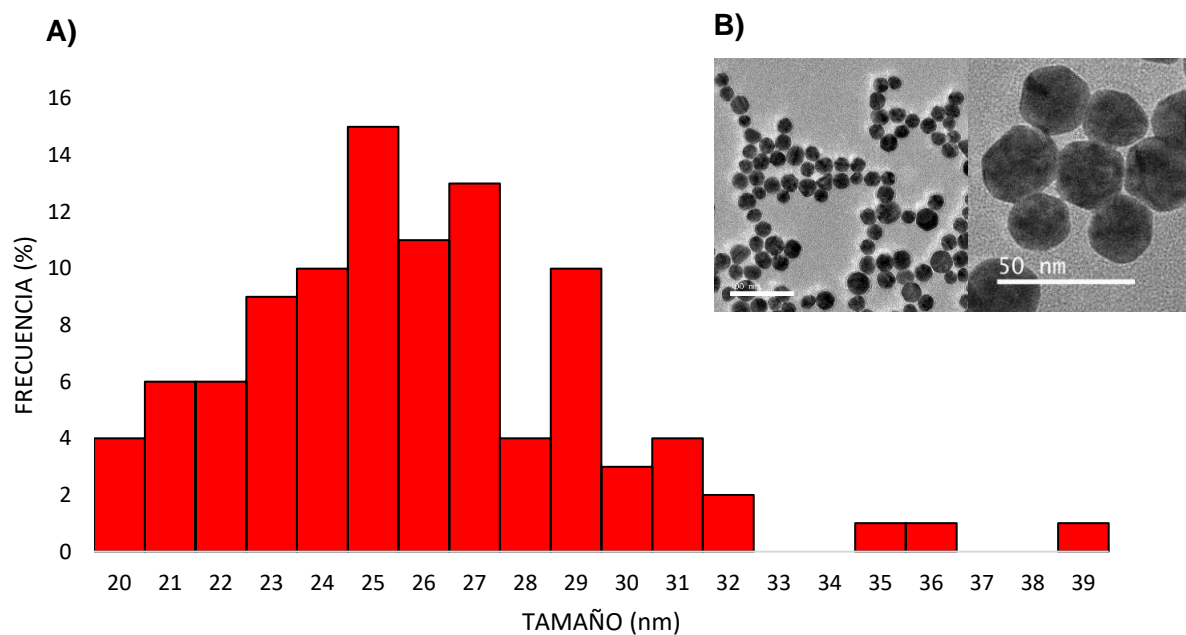


Figura 20. A) Histograma de frecuencias del tamaño de las nanopartículas de oro sintetizadas medido a partir de las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión. **B)** Imágenes de las AuNPs tomadas mediante TEM.

1.2 FUNCIONALIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO

Las secuencias de ADN complementarias a la sonda que se quiere reconocer “target” (*Acanthamoeba*), se unieron a la superficie de las AuNPs a través de sus grupos tiol. Este proceso se llevó a cabo siguiendo los métodos de reducción del pH y “salt aging”.

1.2.1 Optimización del método de reducción del pH

Mediante este método, el pH de la solución se cambió a ácido para protonar las bases del ADN. Esto reduce la repulsión entre las cadenas de ADN y las nanopartículas, ambas cargadas negativamente, permitiendo así la rápida unión. Este método se utiliza para unir ADN a una amplia gama de tamaños de AuNPs. La principal ventaja del método de pH bajo es que permite la unión de diferentes secuencias de ADN que tienen diferentes tasas de adsorción con proporciones AuNP/ADN constantes.

Se desarrolló un método de pH que requiere un total de tiempo de unos 25 minutos para unir el ADN a la superficie de las AuNPs (362). Para la mejora de este proceso se ajustaron parámetros como la relación AuNP/ADN o la concentración de la solución tampón de citrato empleada.

Tabla 10. Optimización método de reducción del pH.

Nº Protocolo	Conc. ADN, μM		RATIO ADN/AuNP		Con. AuNP, nM	Conc. Citrato pH:3, mM
	ADN1	ADN2	ADN1	ADN2		
1	20		690		28.7	7.4
2	40	20	1391	690	28.7	7.5
3	20	-	1391	-	28.7	54
4	20		658		25	7.6
5	6		800		5	9

Para la interpretación de los resultados se observaron en conjunto los resultados obtenidos del espectro visible, el color de la muestra y el cambio de tamaño hidrodinámico (DLS). El método de reducción del pH se probó con una concentración alta de AuNPs de 28 nM. Para el ratio AuNPs/ADN 1:690 (protocolo n°1), los resultados mostraron que hay un ligero desplazamiento del pico de absorción de aproximadamente ~1.03 nm para el ADN1 y de ~3.80 nm para el ADN2 (Figura 21). En los resultados de cambio de tamaño medido con DLS se observa un incremento de tamaño de 4.53 nm y 15.72 nm para ADN1 y ADN2 respectivamente (Tabla 11). La muestra de AuNPs/ADN1 mostró un color ligeramente cambiado a morado en comparación con el color de la muestra control, por lo que ese cambio de tamaño obtenido en el DLS puede ser por agregación de nanopartículas. Estos resultados obtenidos no confirman la presencia de ADN1 unido a las nanopartículas, sin embargo, la unión del ADN2 sí. Por ello, en las mismas condiciones, se probó a aumentar al doble la concentración del ADN1 (protocolo n°2). Los resultados obtenidos fueron parecidos a los del protocolo n°1 con un desplazamiento del pico de absorción de ~1.13 nm para el ADN1 y de ~3.63 nm para el ADN 2 (Figura 21) y cambio de tamaño hidrodinámico de 3.82 nm y 12.70 (Tabla 11). No se observó cambio de color en la muestra que indicase agregación por lo que estos resultados parecen ser positivos en la unión del ADN1 y ADN2. Sin embargo, debido a que se usó una alta concentración de ADN (40 μ M) se decidió seguir optimizando el protocolo para necesitar menos cantidades.

Dado que los cambios en el diámetro hidrodinámico eran mayores para el ADN2 que para el ADN1, en el protocolo n°3 se utilizó el agente reductor Tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP del inglés) con el ADN1 para favorecer su unión. Este compuesto rompe los puentes disulfuro que se pudieran estar formando entre los grupos tiol de las

secuencias de ADN, produciendo un plegamiento de la secuencia e impidiendo su unión a la nanopartícula. Sin embargo, al realizar este proceso, la muestra se agregó visiblemente y se decidió continuar ajustando el resto de los parámetros.

En el protocolo nº4 se disminuyó el ratio ADN/AuNP (1:658) y la concentración de nanopartículas a 25 nM. El desplazamiento del pico de absorción fue de 3.96 y de 0.48 nm (Figura 21) y el cambio de tamaño fue 12.90 y 0.12 nm para el ADN2 y ADN1 respectivamente (Tabla 11). Como el cambio de tamaño obtenido para el ADN1 es muy bajo, estos resultados no garantizan la unión del ADN1 a las nanopartículas de oro.

Tabla 11. Medidas del diámetro hidrodinámico mediante DLS y cálculo del aumento del ϕH respecto a los valores de la muestra control.

Nº		Diámetro hidrodinámico (ϕH), nm \pm DE	$\Delta\phi H$, nm
1	Control	30.13 \pm 1.44	-
	AuNP/ADN1	34.66 \pm 1.30	4.53
	AuNP/ADN2	45.85 \pm 0.72	15.72
2	Control	29.46 \pm 1.45	-
	AuNP/ADN1	33.28 \pm 0.70	3.82
	AuNP/ADN2	42.06 \pm 2.63	12.60
3	Control	29.46 \pm 1.45	-
	AuNP/ADN1	39.66 \pm 1.91	10.20
4	Control	30.68 \pm 0.44	-
	AuNP/ADN1	30.80 \pm 0.51	0.12
	AuNP/ADN2	43.58 \pm 2.34	12.90

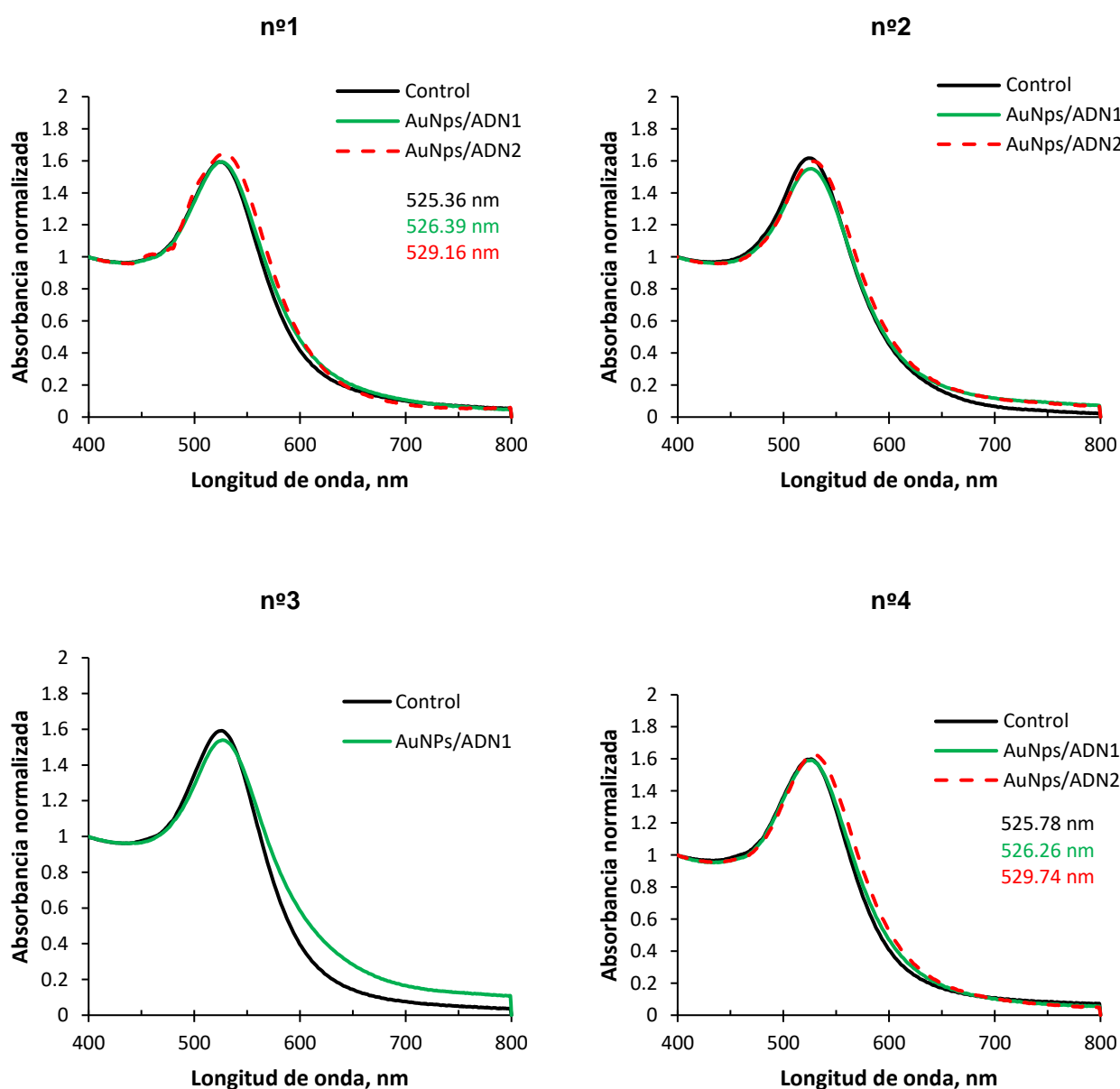
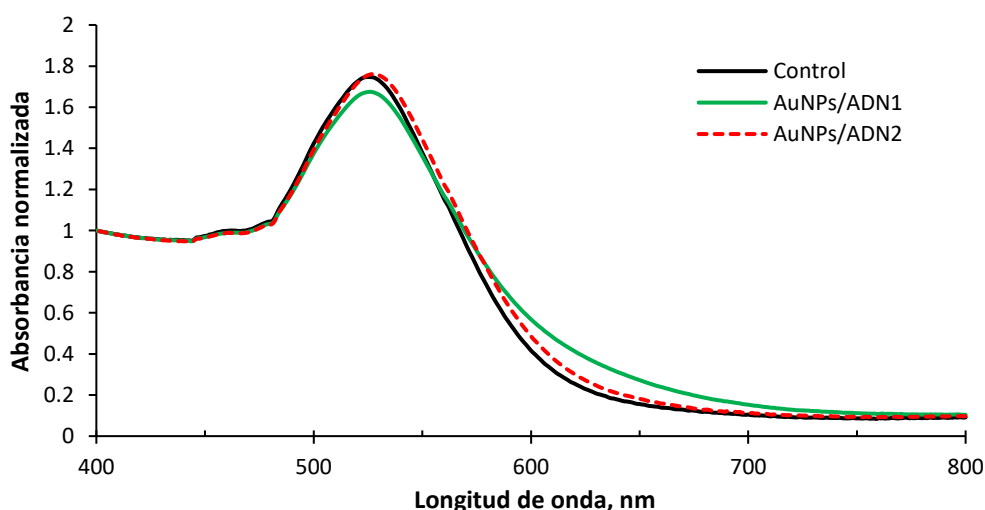


Figura 21. Espectros visibles tras la unión del ADN1 y ADN2 mediante el método de reducción del pH, en las condiciones descritas en tabla 10. Comparación frente a la muestra control (sin ADN). Absorbancias normalizadas a 400nm.

Con el objetivo de ajustar al máximo la cantidad mínima necesaria de ADN y AuNPs para la funcionalización, en el protocolo nº5 se redujeron estos factores (Tabla 10). Para ello se utilizó una concentración del tampón citrato de 9 mM, a pH 3, para una solución de [AuNPs]= 4.6 nM y [Au⁰]= 2.2 mM y un ratio ADN2/AuNP de 1440 hebras. Al unir el ADN a la superficie, la banda máxima del plasmón de resonancia superficial localizado se desplazó a 527.5 nm para el ADN2, un desplazamiento de 2.15 nm respecto al control (Figura 22. A). Sin embargo, en el caso del ADN1 no hubo un desplazamiento en el pico máximo de absorción como se observa también en la Figura 22. A.

A)



B)

	Díámetro hidrodinámico, nm ± DE	Incremento de tamaño, nm	λ_{max} , nm	$\Delta\lambda_{max}$, nm
Control	32.62 ± 1.36	-	525.31	-
AuNps/ADN1	37.16 ± 0.18	4.54	525.62	0.31
AuNps/ADN2	44.24 ± 0.47	7.08	527.46	2.15

Figura 22. A) Espectro visible tras la unión del ADN1 y ADN2 mediante el método de pH, en las condiciones descritas en tabla 10. **B)** Cambios de tamaño respecto al control medidos mediante DLS y cambios en el pico de absorción obtenidos del espectro visible.

El desplazamiento en el pico de absorción del ADN2 representa el aumento del índice de refracción local alrededor de la nanopartícula debido a la presencia de moléculas de ADN en la superficie de ésta. Además, la presencia de ADN en la superficie también fue confirmada por DLS como se muestra en la Figura 22. B. Los cambios en el diámetro hidrodinámico obtenidos tras la unión del ADN mostraron un aumento del diámetro de 7.08 nm con el ADN2 en comparación con el control, lo que está dentro del aumento esperable de 5 a 10 nm. Con el ADN1 el cambio obtenido fue de 4.54 nm. Simultáneamente, en el caso del ADN2 no se observó agregación en el proceso de funcionalización, como se confirma con el espectro de absorción similar al del control a la longitud de onda de aproximadamente 620 nm. Finalmente, el protocolo n°5 muestra las mejores condiciones conseguidas para la unión del ADN2 por el método de reducción del pH.

La unión del ADN a las nanopartículas mediante el método de reducción del pH es un método sencillo y rápido. Sin embargo, en este caso, para el ADN1 no se obtuvieron buenos resultados. Esto es debido a que este método, basado en la protonación de bases, se ve afectado por la composición de bases del ADN. Por un lado, la adenina y la citosina tienen valores de pKa superiores a 3 que se protonan cuando la unión se realiza a pH 3, sin embargo, para la guanina y la timina, el pH debe ser inferior a 2 para su protonación, lo que queda fuera del rango experimental (298, 362, 363). Por esta razón, para el ADN 1 (bases: A=6, C=5, G=10, T=7) se decidió probar otro método de unión mediante sal que se describe a continuación, y para el ADN 2 (bases: A=8, C=6, G=5, T=9) la funcionalización se realizó sólo con este método de pH bajo.

1.2.2 Optimización método “ salt-aging”

La funcionalización de las AuNPs con ADN mediante el método de la sal se basa en reducir la repulsión entre las cargas negativas de las AuNPs y el ADN mediante la adición de sal.

Varios de los protocolos probados provocaron la agregación de las nanopartículas incluso con una adición lenta de sal, lo que indica la inestabilidad del sistema. Es importante conseguir una concentración de sal necesaria para reducir la repulsión, pero sin provocar la agregación inespecífica de las nanopartículas. Por ello, para mejorar este problema, se ajustaron los factores involucrados en dicha agregación: la concentración de sal en la solución tampón, el uso de agentes surfactantes (SDS) en la composición del tampón, y la relación ADN/NP. En la Tabla 12 se muestran los cambios realizados para la optimización del método.

Los resultados de la funcionalización se analizaron mediante espectro visible (Figura 23.A). La formación de agregación se indica por la disminución de la intensidad del pico LSPR, así como por un aumento en la curva de absorción en longitudes de onda en torno a 620 nm como puede observarse en Figura 23.A N° 4 y N°5. La información obtenida de los espectros visibles se complementó con el análisis del cambio de tamaño de las nanopartículas medido mediante DLS, cuyos resultados se muestran como media \pm desviación estándar (DE) en la Figura 23.B Es importante tener en cuenta que el aumento de tamaño puede ser debido a la presencia de ADN ligado a la nanopartícula (funcionalización) y también a la agregación de las nanopartículas. Por ello, la interpretación de los resultados se hace analizando el espectro, el color de la muestra y los resultados del DLS juntos.

Tabla 12. Resumen de los procesos de optimización realizados para el método salt-aging.

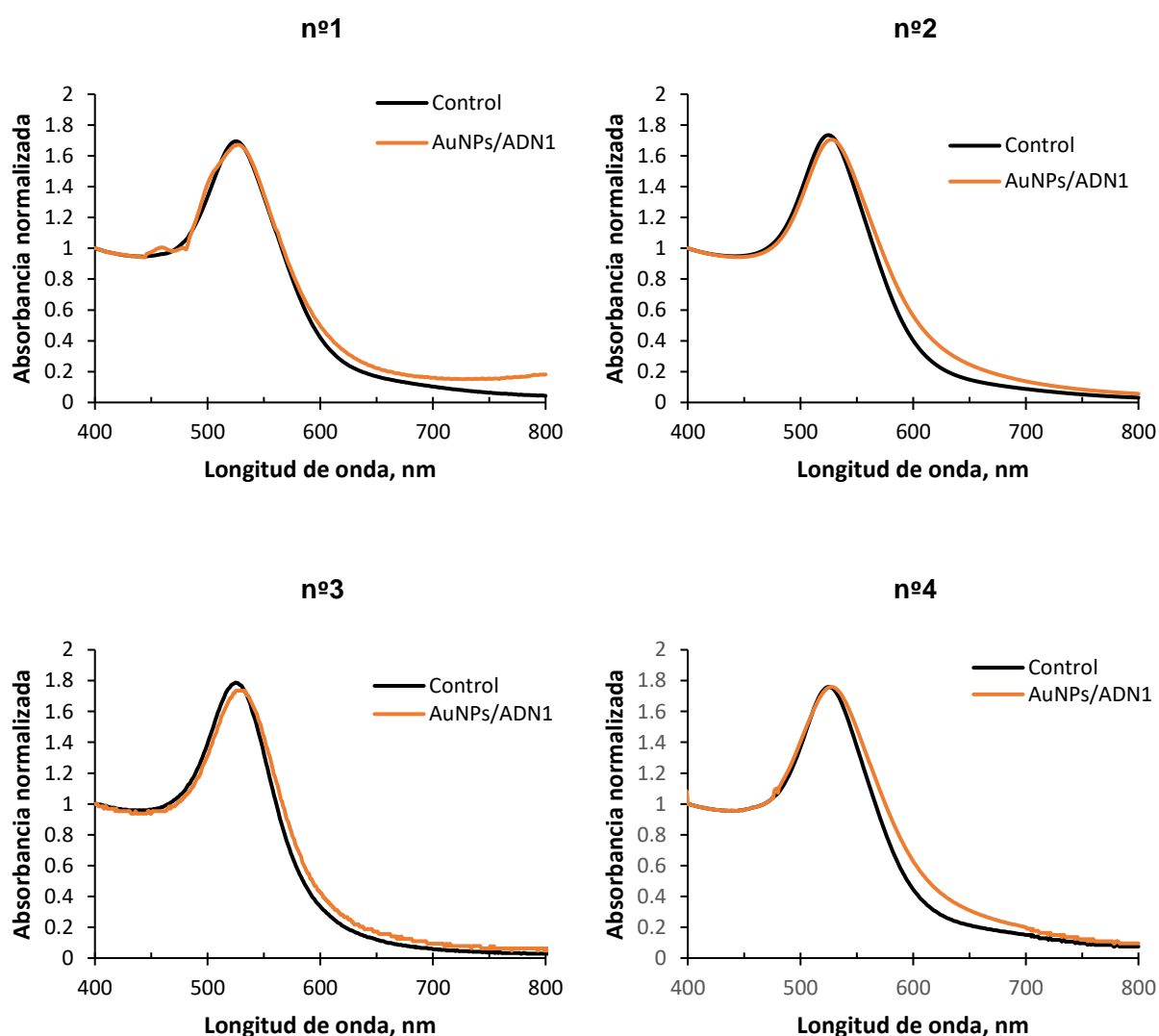
Protocolo	Ratio	Cf: AuNP, nM	Surfactante	Buffer de sal		Incubación final	Redispersión del Pellet	Resultado
Nº1	1153	4	-	Incubación: 16h. 2MNaCl+ 10mM PB Cf NaCl=0.1M	Tras cada adición 10s sonicación+ 30min incubación 22º	40h	10mM PB	Agregación
Nº2	1153	7.7	-	Incubación: 16h. 2MNaCl+ 10mM PB CfNaCl=0.09M	Tras cada adición 10s sonicación+ 10min incubación 22º	40h	10mM PB	Agregación
Nº 3	1180	0.6	SDS 10% + 100mM PB	Incubación: 20min 2MNaCl+ 10mM PB + 0,01% de SDS Cf NaCl=0.1M	Tras cada adición 10s sonicación+ 20min incubación 22º	12h	SDS 0.01%	Agregación
Nº4	4000	4	SDS 10% + 100mM PB	Incubación: 20min 2 M NaCl + 10 mM de PB + 0,01% de SDS Cf NaCl: 0.18M	Tras cada adición 10s sonicación+ 20min incubación 22º	12h	SDS 0.01%	OK
Nº5	4005	10	SDS 10% + 100mM PB	Incubación: 20min 2 M NaCl + 10 mM de PB + 0,01% de SDS Cf NaCl: 0.18M	Tras cada adición 10s sonicación+ 20min incubación 22º	12h	SDS 0.01%	OK

La adición de la sal se realizó lentamente para mantener la estabilidad de las nanopartículas, ya que la adición directa de concentraciones altas de sal provocó la agregación inmediata. Inicialmente, para una concentración final de sal de 0.1 M, incluso con adición lenta, la muestras se agregaron como se observa en la Figura 23.A, nº1.

Por ello, se decidió buscar alternativas que mejorasen la estabilidad del sistema. Se decidió seguir un protocolo basado en el trabajo de Sanromán-Iglesias et al. (364). En este método, para controlar la agregación por la sal, se incluyó la adición del surfactante SDS a la mezcla de las AuNPs-ADN y se añadió también al buffer de sal preparado: 2 M NaCl + 10 mM de PB + 0.01% de SDS. La sal se añadió lentamente en pequeñas adiciones hasta conseguir una concentración final de 0.18 M . Tras cada adición se sonicó la muestra y se incubó durante 10 min. Con este método se consiguió optimizar el tiempo consiguiendo tiempos de incubación menores.

Con el protocolo nº 3, la agregación final que se obtuvo, visible a simple vista y en el espectro visible, puede deberse a que hubiese una baja concentración de ADN unido a las nanopartículas, provocando su inestabilidad ante la adición de sal. Por ello, se decidió aumentar el ratio de las sondas de ADN por nanopartícula como se muestra en los protocolos nº 4 y 5 (Tabla 12). El ratio final fue de 4000/4005 hebras/AuNP. La concentración final de nanopartículas también se aumentó a 4 nM y 10 nM respectivamente para mejorar el paso posterior de hibridación. Esto se hizo en base a la hipótesis de que, si la concentración de nanopartículas no es suficiente a la hora de hacer la hibridación, es más difícil que se encuentren las nanopartículas lo suficientemente cerca para agregarse en mayor cantidad y así observar el cambio de color. Por tanto, el color de la solución de nanopartículas funcionalizadas (concentración de AuNPs) es un factor que se consideró importante para tener en cuenta. Ambos protocolos mostraron buenos resultados sin agregación de la muestra. El aumento del diámetro hidrodinámico fue de 9.56 nm y 12.50 nm y el desplazamiento en el pico de absorción fue de 2.11 nm y 2.33 nm para el protocolo nº 4 y nº 5 respectivamente (Figura 23.A, B).

El método de salt-aging requirió de más tiempo que el método del pH y de un exceso de ADN. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la mayoría de los procedimientos requieren un exceso de ADN ya que se estima que sólo el 30% del ADN que se añade se une a las nanopartículas de 13 nm y sólo el 5% en el caso de las nanopartículas de 50 nm (365).



		Diámetro hidrodinámico (ϕ_h), nm \pm DE	$\Delta\phi_h$, nm	λ_{max} , nm	$\Delta\lambda_{max}$, nm
Nº1	Control	32.78 \pm 0.37	-	525.13	-
	AuNP/ADN1	42.60 \pm 2.88	9.82	526.44	1.32
Nº3	Control	32.96 \pm 0.51	-	524.85	-
	AuNP/ADN1	43.18 \pm 4.63	10.22	527.64	2.79
Nº4	Control	33.11 \pm 0.80	-	525.12	-
	AuNP/ADN1	42.67 \pm 1.32	9.56	527.23	2.11
Nº5	Control	32.96 \pm 0.27	-	525.22	-
	AuNP/ADN1	45.46 \pm 0.61	12.50	527.55	2.33

Figura 23. A) Espectros visibles de las AuNPs con el ADN1 unido mediante el método de salt aging en las condiciones descritas en tabla 12. **B)** Valores del ϕ_h obtenido mediante DLS, posición e incremento del pico máximo de absorción obtenido a partir del espectro visible.

1.3 ESTRATEGIA DE DETECCIÓN COLORIMÉTRICA

1.3.1 Optimización del sistema colorimétrico

La estrategia colorimétrica se basó en la agregación de las AuNPs causada por el *target* al hibridarse con los dos conjuntos de AuNPs modificadas con el ADN1 y ADN2 , confirmando así, la presencia de *A.castellanii* por el cambio de color. Para obtener una respuesta colorimétrica satisfactoria, se optimizaron los parámetros de concentración de sal, AuNPs y *target*.

- **Concentración de sal**

La concentración de sal minimiza la repulsión electrostática entre las cadenas de ADN unidas a las AuNPs y en la solución, facilitando así la hibridación. Durante el proceso de hibridación, el aumento de la concentración de sal incrementa la cinética de la respuesta colorimétrica, sin embargo, la concentración de sal también puede causar la agregación de las AuNPs de manera no específica. Por ello, el parámetro de la concentración de sal es un factor importante que puede afectar indirectamente a la sensibilidad del sistema. Las pruebas de ajuste de la concentración de sal se llevaron a cabo utilizando una solución tampón compuesta por NaCl preparada en tampón PB (2 M NaCl en 10 mM PB, pH:7). Las concentraciones de sal probadas fueron 0.25 M, 0.3 M y 0.4 M (n=3). La respuesta obtenida se muestra en la Figura 24. Todas las muestras se probaron con una concentración constante de AuNP de 2 nM.

La muestra con concentración de sal de 0.4 M mostró un color púrpura, detectable a simple vista que indica la formación de agregados de AuNPs (Figura 24.A). La agregación de las nanopartículas con NaCl 0.4 M se confirma por los espectros UV-vis donde empieza a aumentar el lado derecho del pico LSPR mostrado en la Figura 24, B.

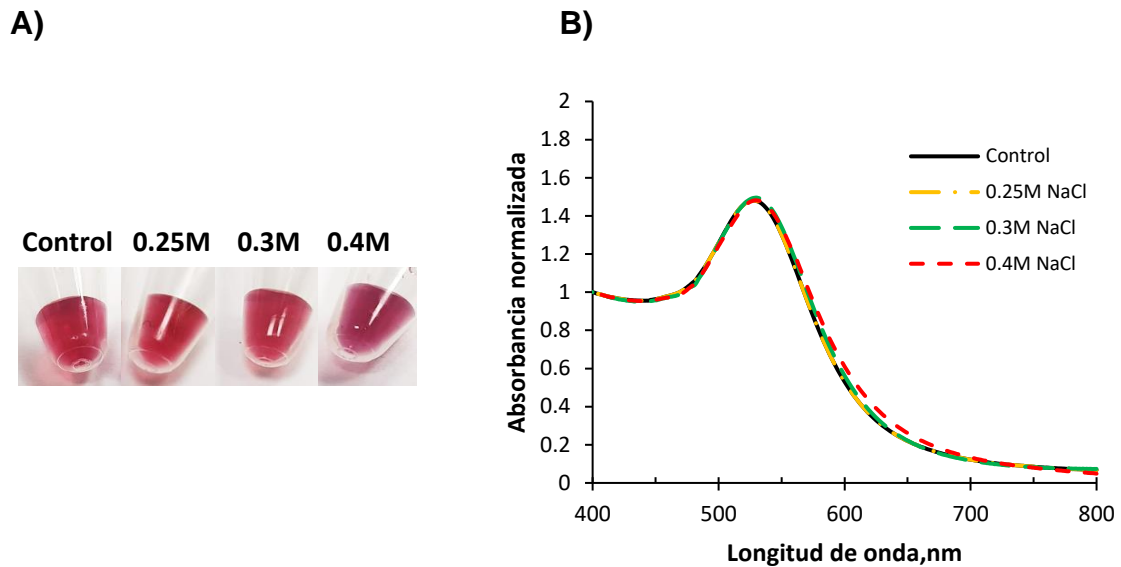


Figura 24. Efecto de diferentes concentraciones de sal (NaCl) sobre la estabilidad de las AuNPs funcionalizadas con ADN. **A)** Imagen digital de la respuesta colorimétrica. **B)** Espectro visible de las AuNPs con diferentes concentraciones de sal frente al control (sin sal).

El grado en que se forma la agregación se estimó por la relación Abs_{620}/Abs_{max} que corresponde a las dos regiones del espectro influenciadas por las muestras dispersas o agregadas (Figura 25). La concentración de sal de 0.4 M dio lugar al mayor grado de agregación respecto al control, con una diferencia estadísticamente significativa respecto al control ($p < 0.05$). Las concentraciones de sal de 0.3 M y 0.25 M preservaron la estabilidad coloidal de las nanopartículas, sin agregación, mostrando un color rojo y un nivel de agregación estable sin diferencias significativas en el grado de agregación respecto del control ($p > 0.05$). En base a estos resultados, para la realización de los experimentos se eligió una concentración final de NaCl de 0.25 M para evitar posibles agregaciones en caso de tener AuNPs más inestables que otras.

	Concentración de sal, M			
	0	0.25	0.3	0.4
Abs₆₂₀ / Abs_{max}	0.24 ± 0.00	0.24 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.29 ± 0.01
p-valor		0.83	0.67	< 0.05*

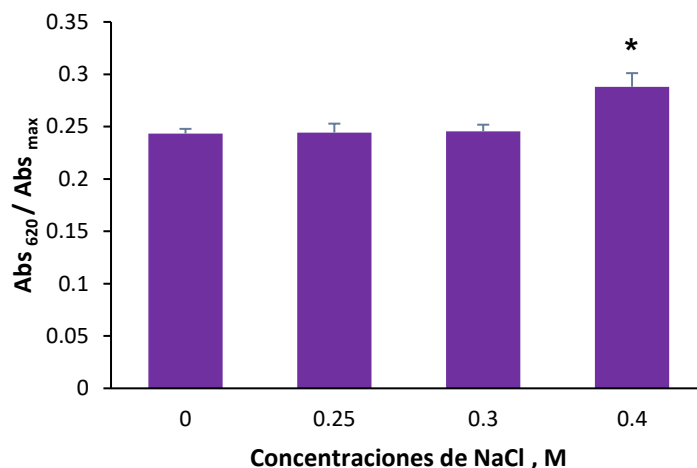


Figura 25. Estimación del grado de agregación (Abs_{620} / Abs_{max}) para diferentes concentraciones de sal. *P < 0.05, Prueba U de Mann-Whitney, comparación por pares con el control (0 M).

- **Concentración de Nanopartículas de oro**

La concentración de AuNPs es un parámetro importante que optimizar ya que facilita la observación del cambio de color producido por la agregación. Esto es debido a que la intensidad del color rojo de la solución es directamente proporcional a la concentración de AuNPs.

En primer lugar, se probó a bajar la concentración final de nanopartículas a 0.2 nM (10 veces menor que la usada en el ajuste de la concentración de sal). Con la

El grado de agregación de las nanopartículas en los ensayos colorimétricos depende de la concentración de AuNPs funcionalizadas, que debe ser suficiente para que, en presencia del *target*, se “encuentren” fácilmente, se produzca la hibridación y se induzca una respuesta óptica. En base a esto, se decidió aumentar la concentración final de nanopartículas de oro a 1 nM para cada conjunto de AuNPs/ADN1 y AuNPs/ADN2 para la misma concentración de *target* anterior de 0.01 μM y para una concentración superior de *target* de 0.05 μM . Como se muestra en la Figura 27, se aprecia un cambio de color notable entre la muestra control (sin *target*) y la muestra con *target* 0.05 μM . Para la concentración de *target* de 0.01 μM hay cambio de color ligero que no es tan evidente a la vista.

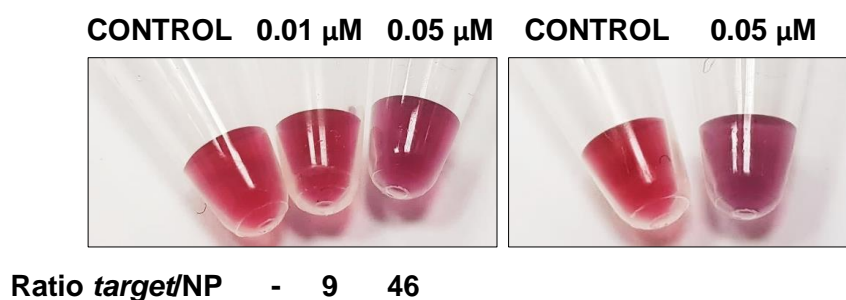


Figura 27. Imágenes de los cambios de color observados con concentraciones de *target* de 0.01 μM y 0.05 μM , para una concentración de AuNPs de 1 nM y concentración de sal de 0.25 M. **A)** Comparación de las dos concentraciones de *target* frente al control **B)** Comparación sólo de la concentración de *target* 0.05 μM frente al control.

Por tanto, una concentración de nanopartículas de 0.2 nM parece insuficiente y la concentración de target debería ser mayor de 0.01 μM para observar el cambio de color. Así, para ajustar la concentración de AuNPs se probaron diferentes concentraciones: 0.4; 0.8; 0.9 y 1 nM para un concentración de *target* seleccionada de 0.02 μM .

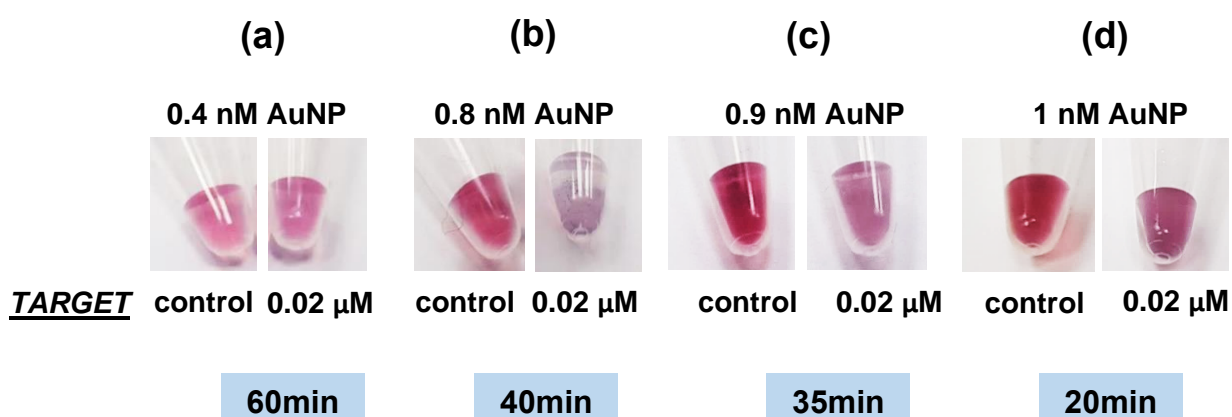


Figura 28. Efecto de la concentración de AuNPs en la respuesta colorimétrica: 0.4 nM (a), 0.8 nM (b), 0.9 nM (c) y 1 nM. Concentración de sal utilizada [NaCl]: 0.25M.

Se observó un cambio visible de la intensidad del color al aumentar las concentraciones. Sin embargo, el tiempo para lograr un cambio de color visible aumentó para las concentraciones más bajas. Para una concentración de 1nM el tiempo de respuesta era de unos 20 minutos y aumentó a 30 - 40 min y hasta 1 hora con concentraciones más bajas. Hasta una concentración mínima de 0.8 nM de AuNPs y 0.02 μM de *target* podemos obtener un cambio detectable a simple vista.

Una concentración de AuNPs/ADN de 1 nM se consideró la mejor opción para una respuesta colorimétrica visible rápida.

- **Concentración de *target***

Una vez seleccionada la concentración de nanopartículas de oro de 1 nM para cada conjunto de AuNP/ADN, que asegure que el cambio de color se pueda apreciar con facilidad, se probaron diferentes concentraciones de *target* para evaluar cuál es la concentración mínima necesaria para observar un cambio de color (Figura 29). Teóricamente, la concentración mínima de la sonda para inducir un cambio de color significativo es de 4 moléculas de ADN por partícula (364), por lo que se utilizó ese valor de referencia y se aumentó el ratio de *target* por AuNP para asegurar la formación de agregados.

Target, μM	0.005	0.01	0.02	0.05	0.1	0.2
Ratio Target/AuNP	4.6	9	18.5	16	92.5	182.5

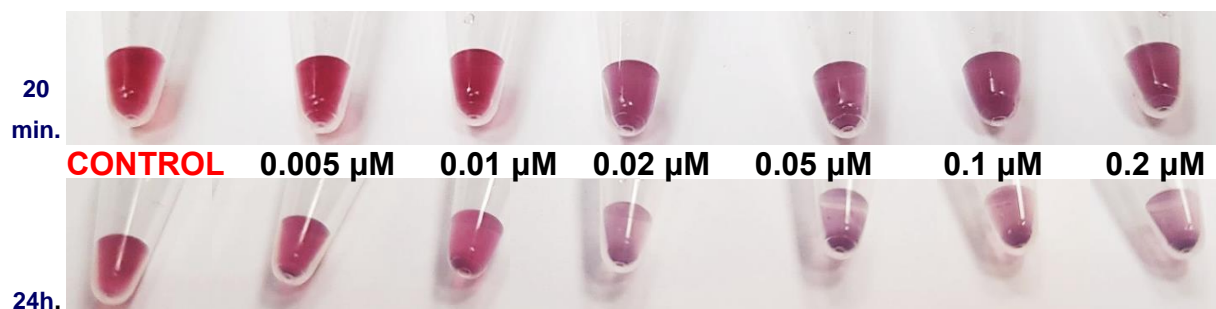


Figura 29. Resultados visuales obtenidos con diferentes concentraciones de *target* comparados con la muestra control (sin *target*) a los 20 min y tras 24 horas.

En la Figura 29 se muestra el cambio de color visible tras la adición de las diferentes concentraciones de *target*. Transcurridos 20 minutos tras añadir el *target*, la agregación se observó a simple vista para las concentraciones de 0.02 μM , 0.05 μM , 0.1 μM y 0.2 μM y transcurridas 24 horas el cambio de color era más significativo. Las muestras con concentraciones más bajas de 0.005 y 0.01 μM , no mostraron un cambio de color en comparación con el control a los 20 minutos, sin embargo, después de 24 horas, parece aparecer un ligero cambio de color en comparación con el control. En base a estos resultados se observa que la concentración de *target* mínima necesaria para obtener un cambio de color visible a corto plazo es 0.02 μM (1.12×10^{11} copias) que es considerado el límite de detección visual del sistema (del inglés, LoD).

1.3.2 Análisis cuantitativo del cambio colorimétrico

Como alternativa a la detección visual del cambio colorimétrico por la presencia del *target* se hizo el análisis de las imágenes tomadas en base a las coordenadas de color RGB (del inglés, Red, Blue, Green). Con esta estrategia se puede hacer el seguimiento de los cambios de color con más precisión y la cuantificación de las concentraciones de *target*.

La presencia del *target* provoca un cambio de color de rojo a morado-púrpura. La agregación de la muestra intensifica la absorbancia en la longitud de onda del azul (~ 620 nm) mientras que la extinción en la longitud de onda roja (~ 520 nm) se reduce como se observó en los espectros UV-vis. Por ello, la evaluación de la agregación se calculó en base a la relación entre los valores obtenidos para el rojo y el azul denominado como R/B (red and blue del inglés).

Se realizó un $n=3$ para cada concentración. Para obtener los valores RGB, se usó el programa Irfan view tomando valores de cinco puntos distintos de la muestra para cada color. A continuación, se calculó la media de RGB y luego la relación de los valores R/B.

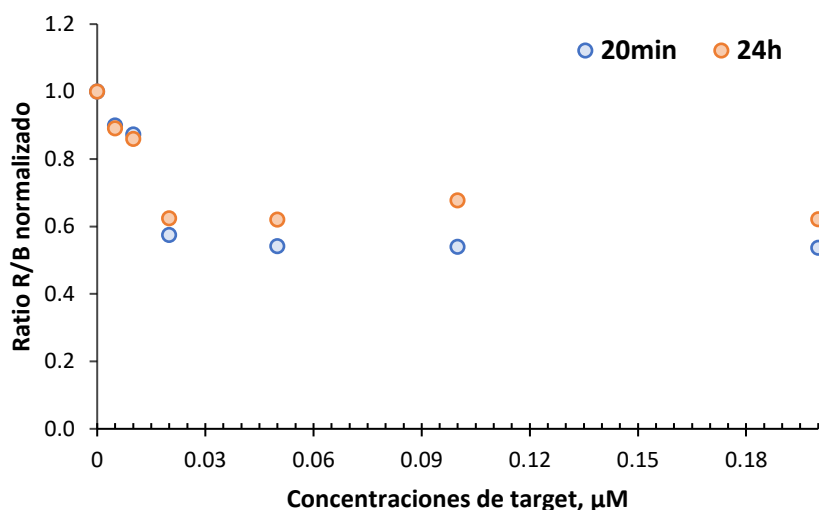


Figura 30. Respuesta colorimétrica analizada mediante los valores R/B para las diferentes concentraciones de *target* desde 0.005 a 0.2 μM . La concentración de AuNPs fue 1 nM y se mantuvo constante para cada conjunto de ADN-AuNP.

El aumento de la concentración del *target* induce la agregación de las AuNPs, lo que aumenta la contribución del componente azul de la muestra y se reduce ligeramente el componente rojo, por lo que la relación R/B disminuyó (Figura 29). A lo largo del tiempo, al aumentar la agregación, se observó la misma tendencia tanto para las 24 horas como para los 20 minutos.

Por otro lado, se realizó, además, la curva de calibración para concentraciones de *target* conocidas de 0 a 0.20 μM (Figura 32). Se observa que la concentración del *target* es inversamente proporcional a la relación R/B, a medida que se aumenta la concentración de *target* y hay más agregación en la muestra, la relación R/B disminuye. La concentración de *target* (x) frente a la relación R/B (y) muestra un comportamiento no lineal ajustado con una ecuación sigmoideal (ecuación 1) mediante el software Origin donde los parámetros de la curva son $A1=2.5293$, $A2=1.37643$, $x_0=0.01268$ y $p = 5.03216$. Se analizaron tres imágenes (n = 3) para comprobar la estabilidad del sistema. El LoD utilizando las coordenadas RGB se calculó en base a tres veces la desviación estándar (DE) del control, obteniendo un valor de 0.009 μM (5.03×10^{10} copias). En comparación con el LoD de 0.02 μM obtenido a simple vista, el enfoque RGB ofrece una sensibilidad dos veces mayor y reduce la subjetividad del usuario.

Ecuación 1:
$$Y = A2 + \frac{(A1 - A2)}{1 + (x/x_0)^p}$$

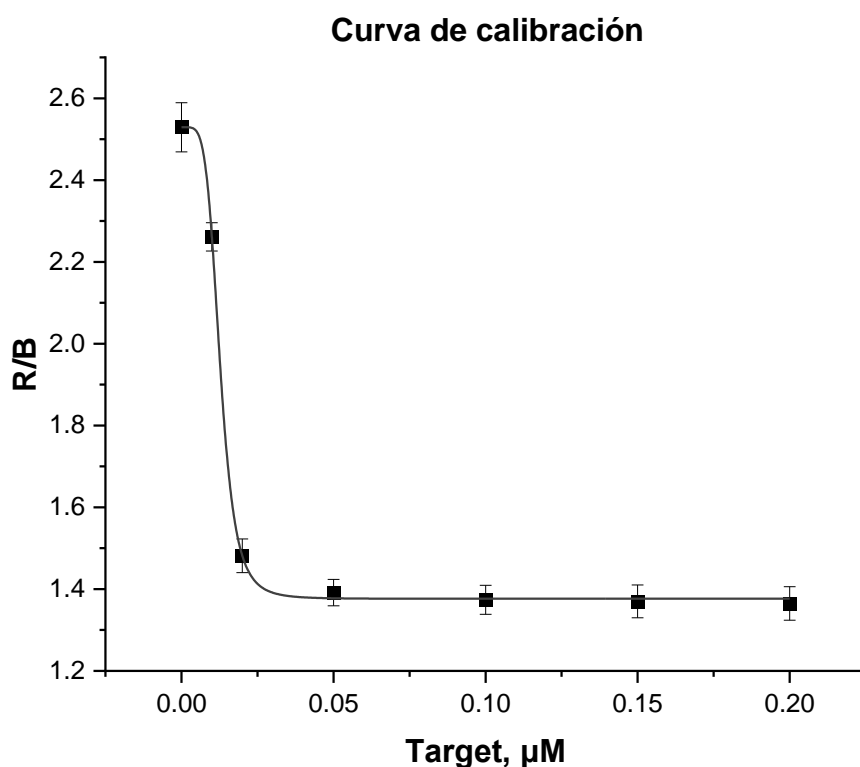


Figura 31. Curva de calibración de la respuesta colorimétrica de diferentes concentraciones de *target* basada en la relación R/B.

1.3.3 Pruebas con muestra reales de *Acanthamoeba castellanii*

El sistema de hibridación optimizado con el *target* sintético de *Acanthamoeba castellanii* se aplicó para la detección de *A. castellanii* en muestras reales. Para ello se utilizaron las muestras obtenidas de los cultivos de ameba realizados. La concentración final de las muestras de *Acanthamoeba* extraídas de los cultivos se ajustó a 5×10^5 amebas/ml. Debido a que las nanopartículas son sensibles a los cambios en el medio y para evitar su posible agregación inespecífica, los ácidos

nucleicos de las muestras se extrajeron del buffer RLT en el que fueron resuspendidas siguiendo el protocolo de extracción de ácidos nucleicos descrito anteriormente.

Los cultivos de *A.castellanii* se hicieron en presencia de *E.coli*, por lo que, aunque las muestras se obtuvieron de los cultivos cuando la ameba se había alimentado de *E.coli*, las muestras extraídas además de *Acanthamoeba*, presentan restos de *E.coli*. Como se comentó en la metodología, se realizó un estudio de similitud de secuencias con otras especies, entre ellas *E. coli*, para verificar que el sistema a desarrollar es específico para la detección de nuestro *target*, *A.castellanii*. No se encontró similitud con secuencia de *E.coli*, por lo que el sistema, teóricamente no detectaría la presencia de material genético de *E.coli*. De forma complementaria se realizó un control negativo con cultivo de *E.coli*. Para el mismo ratio, el sistema reaccionó en presencia de la ameba, agregándose como se muestra en la Figura 32. El pico de absorción disminuyó y se observó un aumento de la absorbancia en las longitudes de onda a partir de 600 nm (Figura 32.A). En la Figura 32.B se observa un cambio de color a morado visible a simple vista. Con la muestra de *E.coli*, el espectro muestra también un pequeño aumento en las absorbancias a partir de 600 nm manteniéndose el pico máximo de absorción. Este cambio puede ser debido a agregación inespecífica por cambios del medio, pero en comparación con el grado de agregación mucho mayor obtenido para la ameba, el sistema es específico de *A.castellanii*.

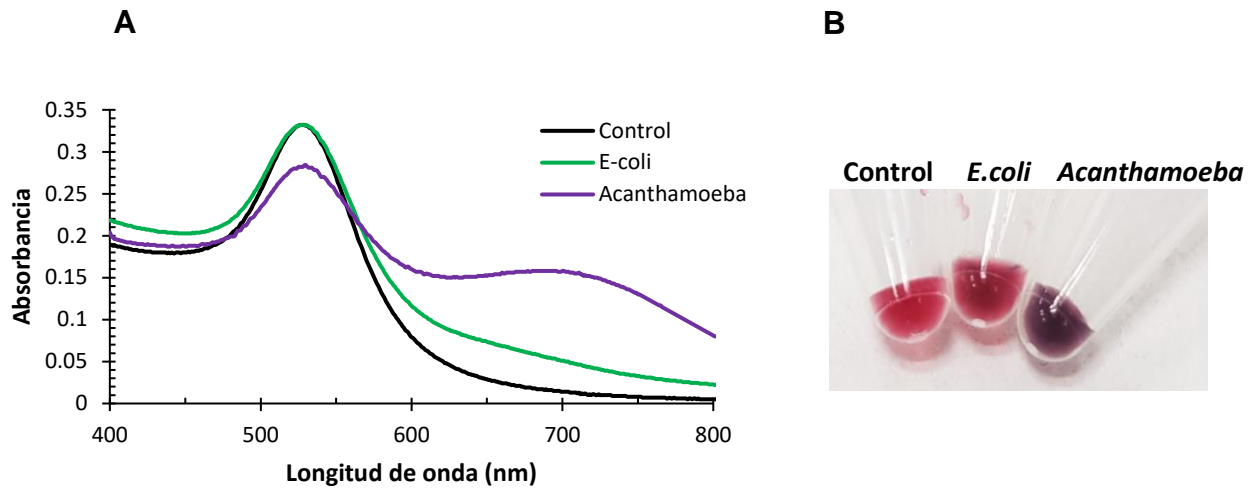


Figura 32. A. Espectro de absorción de las muestras con *E.coli* y con *Acanthamoeba* donde se observa mayor cambio al añadir *Acanthamoeba*. **B.** Cambio de color visible de cada muestra respecto al control.

Tras realizar el protocolo de extracción de ácidos nucleicos de las muestras de *A.castellanii* se cuantificó la cantidad de ácidos nucleicos mediante nanodrop (n=3), obteniendo un valor que oscilaba entre 400 y 500 ng/μL. A partir de una muestra de 485 ng/μL se realizaron diluciones para llevar a cabo las hibridaciones. Es importante señalar que el nanodrop proporciona un valor de concentración de ácidos nucleicos totales mientras que este sistema es específico para una secuencia diana concreta de *Acanthamoeba castellanii*. Por lo tanto, las concentraciones de las muestras reales pueden utilizarse como referencia, pero no pueden compararse directamente con las concentraciones alcanzadas con este sistema.

Los resultados se analizaron en base a la respuesta a simple vista, la evaluación del espectro visible y el análisis de las coordenadas del color (RGB).

En la Figura 33.A se observa un cambio de color a morado respecto a la muestra control para las concentraciones mayores de 28, 42 y 85 ng/ μ L (295, 776 y 1960 amebas/ μ L). Los resultados obtenidos mediante UV-vis mostraron un claro aumento de la agregación a longitudes de onda más largas para concentraciones crecientes de *A. castellanii*, que es visible para las 3 concentraciones más altas 28, 42 y 85 ng/ μ L (295, 776 y 1960 amebas/ μ L) (Figura 33.B). El grado de agregación también es claro en la Figura 34, que tiende a aumentar con el incremento de las concentraciones de ameba.

Según estos resultados, la concentración mínima de *Acanthamoeba castellanii* en una muestra real para observar un cambio visible es 28 ng/ μ L. Este valor corresponde con una cantidad de 295 amebas/ μ L, calculado a partir de la concentración inicial conocida de 5×10^5 amebas/ml. El LoD del sistema, obtenido a partir del *target* sintético es 0.2693 ng/ μ L (0.02 μ M), un valor cien veces inferior a la concentración mínima visible de 28 ng/ μ L. Esto puede explicarse teniendo en cuenta que el nanodrop determina la concentración total de ácidos nucleicos de la muestra sin distinguir las secuencias específicas de reconocimiento.

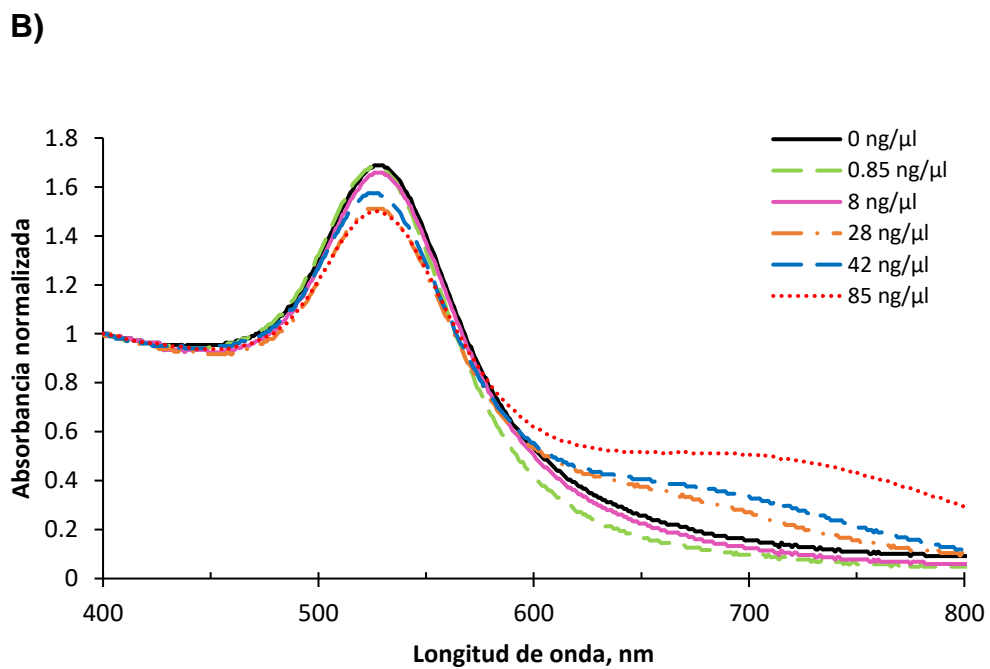
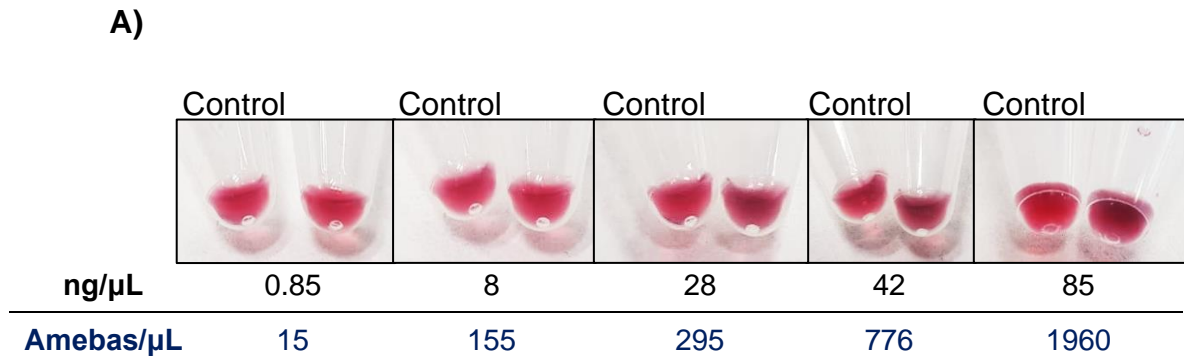


Figura 33. Respuesta colorimétrica obtenida para diferentes concentraciones de *A.castellanii* estimadas mediante nanodrop y cuantificadas por n^o de amebas. **A)** Imagen digital del cambio de color observado que aumenta con la concentración. **B)** Espectro visible de las muestras, a medida que aumenta la concentración, la absorbancia a longitudes de onda larga aumenta.

	Concentraciones <i>Acanthamoeba</i> , ng/ μ L				
	0	0.85	28	42	85
Abs_{620}/Abs_{max}	0.22 \pm 0.01	0.17 \pm 0.02	0.28 \pm 0.02	0.31 \pm 0.02	0.37 \pm 0.02
<i>p</i> -valor		< 0.05*	< 0.05*	< 0.05*	< 0.05*

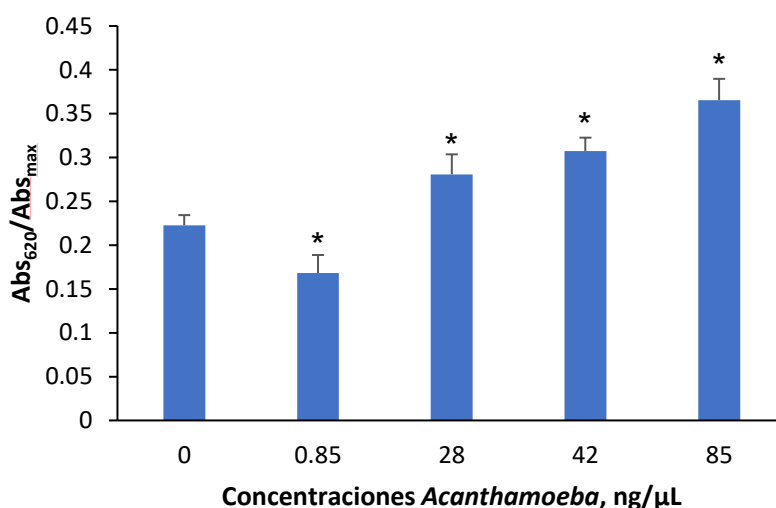


Figura 34. Estimación del grado de agregación mediante la relación Abs_{620}/Abs_{max} para diferentes concentraciones de *Acanthamoeba*. En la tabla se muestran los valores obtenidos con la media \pm DE. * $p < 0.05$, prueba U de Mann-Whitney, comparación por pares con el control (0 ng/ μ L). A medida que aumenta la concentración de ameba, el cociente Abs_{620}/Abs_{max} aumenta que indica un aumento de la agregación.

Las muestras reales de *A.castellanii* también se analizaron del mismo modo que las muestras con *target* sintético, con las coordenadas RGB y la relación R/B. Las relaciones R/B obtenidas se utilizaron para determinar las concentraciones desconocidas de las muestras reales mediante los parámetros de la curva de calibración de ajuste sigmoideal. En la tabla 13 se muestran los resultados obtenidos. Por tanto, una concentración de 295 amebas/ μL (28 ng/ μL) corresponde con una concentración de 0.014 μM , que coincide aproximadamente con el LoD visible del sistema de 0.02 μM .

Tabla 13. Concentraciones de las muestras de *A.castellanii*. En la primera columna se muestra las concentraciones de ácidos nucleicos estimadas mediante nanodrop y en la segunda columna se muestran las concentraciones calculadas a partir de valores R/B y curva de calibración (μM). El número de amebas/ μL se calculó a partir del recuento de cultivos.

Muestras reales	Valores R/B	Nanodrop	Curva de calibración	Cuantificación de cultivos
		Ac. Nucleicos, ng/ μL	Concentración de ADN, μM	Amebas/ μL
1	2.30	0.85	0.010	15
2	2.50	8.00	0.006	155
3	1.84	28.00	0.014	295
4	1.76	42.00	0.015	776
5	1.69	85.00	0.015	1960

2. FASE 2. EFICACIA DE LOS SISTEMAS DE LIMPIEZA DE LAS LENTES DE CONTACTO

En primer lugar, se usaron las nanopartículas de oro para la detección de la ameba residual en las muestras de las lentes de contacto que fueron contaminadas con *Acanthamoeba*. Para ello, se utilizaron primeramente las muestras del control positivo. Estas muestras son las lentes de contacto que se contaminaron con *Acanthamoeba* y a las que no se les hizo ningún tratamiento. Antes de su uso con las AuNPs, los ácidos nucleicos de las muestras se extrajeron mediante protocolo de purificación. Mediante el nanodrop se cuantificó la cantidad de material genético extraído de las muestras de lentes de contacto del control positivo (contaminadas con la ameba) y el control negativo (sin contaminar) para estimar cuál era la cantidad máxima y mínima que podríamos obtener de las muestras de lentes de contacto. Se obtuvo unos valores de 39.5 ng/μL y 20.2 ng/μL para el control positivo y negativo respectivamente. Esto nos indica que están dentro del límite visual del sistema.

Se utilizaron las nanopartículas de oro funcionalizadas previamente con los ADN1 y ADN2 y se mezclaron, en las condiciones que fueron optimizadas previamente, con las muestras extraídas de las lentes de contacto. Las muestras del control positivo, al no haber realizado ningún tratamiento de limpieza, cabe esperar obtener un resultado positivo de presencia de *Acanthamoeba* detectable por el cambio de color de la muestra. Sin embargo, no se obtuvo ningún cambio de color visible. Por esta razón, no se continuó con más muestras ya que si el control positivo, que es el que más contenido de ameba debe tener no se observa cambio de color, no se espera, por tanto, que con el resto de las muestras se produzca este cambio.

Por otro lado, el segundo método de detección que se eligió para poder comparar con la detección mediante AuNPs fue la PCR. Las qPCR realizadas se basaron en la detección de ARN de *A.castellanii*, a diferencia de las PCR cuantitativas que comúnmente se realizan para detección de ADN de *Acanthamoeba*. La detección del ARN nos indica la presencia de ameba viva en nuestras muestras, mientras que el ADN puede ser detectado tanto en ameba viva o muerta ya que tarda mucho más en degradarse que el ARN. Por ello, la detección de ARN nos da resultados más fiables a la hora de saber si una muestra puede ser potencialmente patógena, al detectar la presencia de ameba viable.

Los resultados obtenidos de las qPCR fueron interpretados en función de los valores del umbral de ciclos (**Ct**), del inglés, cycle threshold. Este valor indica el número de ciclos en el que la señal fluorescente alcanza el nivel que representa un incremento estadísticamente significativo respecto al nivel basal.

Para simplificar la representación de los resultados, los pasos de limpieza previos al uso de la solución única, la solución de povidona, el progent y el peróxido de hidrógeno se denominaron como se describe en la siguiente tabla 14.

Tabla 14. Resumen de los procedimientos de limpieza previos al uso de las soluciones de limpieza/conservación utilizados en el estudio.

	Uso de Limpiador	ACLARADO	
		Agua de grifo	NaCl 0.9%
Método 1	No	x	
Método 2	No		x
Método 3	Si	x	
Método 4	Si		x

Los resultados de las PCR cuantitativas obtenidos se expresaron, por un lado, como el porcentaje de positivos o negativos obtenidos y por otro, en función de los valores medios de Ct obtenidos para cada tratamiento.

2.1 RESULTADOS POSITIVOS/ NEGATIVOS

Se estableció un umbral de 34.10 Ct para el gen TPBF y de 30.21 Ct para el gen hsp70. Para ele222gir estos valores se tomó como referencia el valor de Ct más bajo obtenido en el control negativo realizado. Por tanto, resultados inferiores a estos valores umbrales se consideraron resultados positivos de la presencia de *A.castellanii*.

En las tablas 15,16,17 y 18 se muestra el tanto por ciento de resultados positivos y negativos obtenidos para cada tratamiento realizado y para cada gen analizado. El porcentaje calculado por tipo de lente de contacto se hizo con relación al total de muestras analizadas mediante PCR para cada tipo de lente.

Para evaluar la eficacia de los sistemas de limpieza frente *A.castellanii* se realizó el test chi-cuadrado y la prueba exacta de Fisher. Para ello, se compararon los resultados positivos y negativos obtenidos tras el uso de las soluciones de limpieza/ conservación y el control negativo. De esta manera, resultados iguales o sin diferencias estadísticamente significativas frente al control negativo indican la eficacia de los productos.

Con el tratamiento de las lentes con la **solución única** (Tabla 15) se obtuvo una variedad de resultados. El mayor porcentaje de positivos resultó de las lentes que habían sido aclaradas con agua de grifo (método 1) antes de su conservación en la solución única. Concretamente, un 85% de las lentes tratadas dieron un resultado

positivo para ambos genes. El 100% de las lentes de hidrogel e hidrogel de silicona (HiSi) tratadas con el método 1, dieron resultados positivos, mientras que de las lentes RPG tratadas se obtuvieron un 56% de PCR positivas. El uso de la solución única con aclarado previo con agua de grifo mostró diferencias significativas frente al control negativo para todos los casos ($p < 0.05$).

El método 2 hace referencia a las lentes aclaradas con solución salina antes de su conservación en la solución única. En este proceso, el 17% de las muestras dieron resultados positivos en la presencia de la ameba. Este porcentaje está relacionado con las LC de hidrogel e HiSi ya que el 100% de las lentes RPG dieron negativo para la presencia de ameba. Para el gen TPBF, el 25% de las lentes de hidrogel e hidrogel de silicona empleadas dieron positivo. Para el gen hsp70 se obtuvo un 31% y 19% de positivos respectivamente. Comparando estos resultados obtenidos con el control negativo, se obtuvo diferencias significativas frente al control negativo para la lente de hidrogel y el gen hsp70 ($p < 0.05$).

De las LC que fueron tratadas previamente con limpiador (método 3 y método 4) se obtuvo menor porcentaje de positivos. De las lentes tratadas con limpiador y aclaradas con agua de grifo (método 3) un 4% y un 15% dieron positivo para los genes hsp70 y TPBF respectivamente. El porcentaje de positivos se obtuvo en las lentes de hidrogel e HiSi. La comparación de estos resultados con el control negativo, mediante chi cuadrado, mostró diferencias significativas respecto al control negativo en las LC de hidrogel de silicona con el gen hsp70 y en las LC de hidrogel e hidrogel de silicona para el gen TPBF ($p < 0.05$).

De las lentes que fueron tratadas con limpiador y aclaradas con salina (método 4), sólo un 4% dio positivo en la presencia de ameba, para el gen TPBF, procedente

de las lentes de hidrogel. Este valor fue diferente estadísticamente respecto al control negativo ($p < 0.05$). Para el resto de las lentes, el uso de limpiador y aclarado con salina (método 4) mostraron mismos resultados que el control negativo.

Tabla 15. Resultados expresados en tanto por ciento del número de positivos y negativos obtenidos tras conservación de las LC en solución única multipropósito.

			SOLUCIÓN ÚNICA			
			TOTAL	Hidrogel	HiSi	RPG
Método 1	<i>hsp70</i>	Positivos	85%	100%	100%	56%
		Negativos	15%	0%	0%	44%
	<i>TPBF</i>	Positivos	85%	100%	100%	56%
		Negativos	15%	0%	0%	44%
Método 2	<i>hsp70</i>	Positivos	17%	31%	19%	0%
		Negativos	83%	69%	81%	100%
	<i>TPBF</i>	Positivos	17%	25%	25%	0%
		Negativos	83%	75%	75%	100%
Método 3	<i>hsp70</i>	Positivos	4%	0%	12.5%	0%
		Negativos	96%	100%	87.5%	100%
	<i>TPBF</i>	Positivos	15%	25%	19%	0%
		Negativos	85%	75%	81%	100%
Método 4	<i>hsp70</i>	Positivos	0%	0%	0%	0%
		Negativos	100%	100%	100%	100%
	<i>TPBF</i>	Positivos	4%	13%	0%	0%
		Negativos	96%	88%	100%	100%

Tras el tratamiento de las lentes con **povidona yodada** (Tabla 16), el 100% de los resultados obtenidos fueron negativos para las lentes que fueron tratadas previamente con limpiador (método 3 y 4) comportándose de manera igual al control negativo.

De las lentes de contacto que fueron aclaradas previamente con agua de grifo (método 1) un 17% para el gen hsp70 y un 19% para el gen TPBF dieron un resultado positivo en presencia de *Acanthamoeba*. El porcentaje de positivos fue mayor para las lentes de contacto de hidrogel seguido por las LC de hidrogel de silicona. De las lentes RPG tratadas, un 100% y un 94% dieron negativo en presencia de la ameba para el gen hsp70 y TPBF respectivamente. Esto nos lleva a suponer que la ameba podría unirse más a las lentes de hidrogel frente a los otros materiales. Sólo se encontraron diferencias significativas frente al control negativo para las lentes de hidrogel con ambos genes ($p < 0.05$).

De las lentes que fueron aclaradas previamente con solución salina (método 2), sólo un 2% dio positivo para el gen hsp70. Este positivo corresponde a las lentes de hidrogel convencional pero no se obtuvo diferencias estadísticamente significativas respecto al control negativo ($p > 0.05$). Con el resto de LC, la solución de povidona mostró comportamiento igual que el control negativo.

Tabla 16. Resultados expresados en tanto por ciento del número de positivos y negativos obtenidos tras tratamiento con solución de povidona.

			POVIDONA YODADA			
			TOTAL	Hidrogel	HiSi	RPG
Método 1	<i>hsp70</i>	Positivos	17%	38%	12.5%	0%
		Negativos	83%	63%	88%	100%
	<i>TPBF</i>	Positivos	19%	31%	19%	6%
		Negativos	81%	69%	81%	94%
Método 2	<i>hsp70</i>	Positivos	2%	6%	0%	0%
		Negativos	98%	94%	100%	100%
	<i>TPBF</i>	Positivos	0%	0%	0%	0%
		Negativos	100%	100%	100%	100%
Método 3	<i>hsp70</i>	Positivos	0%	0%	0%	0%
		Negativos	100%	100%	100%	100%
	<i>TPBF</i>	Positivos	0%	0%	0%	0%
		Negativos	100%	100%	100%	100%
Método 4	<i>hsp70</i>	Positivos	0%	0%	0%	0%
		Negativos	100%	100%	100%	100%
	<i>TPBF</i>	Positivos	0%	0%	0%	0%
		Negativos	100%	100%	100%	100%

Tras el tratamiento de las lentes de contacto con **peróxido de hidrógeno**, sólo un 2% de las lentes de contacto que fueron aclaradas previamente con agua de grifo (método 1) y solución salina (método 2) dieron un resultado positivo (presencia de *A.castellanii*) para el gen *hsp70* y *TPBF* respectivamente. Este resultado positivo se corresponde con las lentes de hidrogel y con las lentes de hidrogel de silicona respectivamente. El 100% del resto de muestras analizadas mediante PCR dieron negativo en presencia de *A.castellanii*.

El uso de la solución de peróxido de hidrógeno mostró resultados iguales o sin diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) frente al control negativo en todos los casos que demuestran su eficacia.

Tabla 17. Resultados expresados en tanto por ciento del número de positivos y negativos obtenidos tras tratamiento con solución peróxido de hidrógeno.

			PERÓXIDO DE HIDRÓGENO			
			TOTAL	Hidrogel	HiSi	RPG
Método 1	<i>hsp70</i>	Positivos	2%	6%	0%	0%
		Negativos	98%	94%	100%	100%
	<i>TPBF</i>	Positivos	0%	0%	0%	0%
		Negativos	100%	100%	100%	100%
Método 2	<i>hsp70</i>	Positivos	0%	0%	0%	0%
		Negativos	100%	100%	100%	100%
	<i>TPBF</i>	Positivos	2%	0%	6%	0%
		Negativos	98%	100%	94%	100%
Método 3	<i>hsp70</i>	Positivos	0%	0%	0%	0%
		Negativos	100%	100%	100%	100%
	<i>TPBF</i>	Positivos	0%	0%	0%	0%
		Negativos	100%	100%	100%	100%
Método 4	<i>hsp70</i>	Positivos	0%	0%	0%	0%
		Negativos	100%	100%	100%	100%
	<i>TPBF</i>	Positivos	0%	0%	0%	0%
		Negativos	100%	100%	100%	100%

Con la solución **Progent** (Tabla 18), sólo se obtuvo resultado positivo para el gen TPBF y hsp 70 en el 2% de las lentes tratadas con el método 2. Este valor positivo se obtuvo en las lentes de hidrogel e hidrogel de silicona respectivamente. El resto de LC tratadas con los diferentes métodos y analizadas mediante PCR para ambos genes dieron negativo en la presencia de *A.castellanii*. El uso de la solución de Progent mostró resultados iguales o sin diferencia estadística ($p > 0.05$) frente al control negativo en todos los casos.

Tabla 18. Resultados expresados en tanto por ciento del número de positivos y negativos obtenidos tras el tratamiento con la solución de limpieza Progent.

			PROGENT			
			TOTAL	Hidrogel	HiSi	RPG
Método 1	<i>hsp70</i>	Positivos	0%	0%	0%	0%
		Negativos	100%	100%	100%	100%
	<i>TPBF</i>	Positivos	0%	0%	0%	0%
		Negativos	100%	100%	100%	100%
Método 2	<i>hsp70</i>	Positivos	2%	6%	0%	0%
		Negativos	98%	94%	100%	100%
	<i>TPBF</i>	Positivos	2%	0%	6%	0%
		Negativos	98%	100%	94%	100%
Método 3	<i>hsp70</i>	Positivos	0%	0%	0%	0%
		Negativos	100%	100%	100%	100%
	<i>TPBF</i>	Positivos	0%	0%	0%	0%
		Negativos	100%	100%	100%	100%
Método 4	<i>hsp70</i>	Positivos	0%	0%	0%	0%
		Negativos	100%	100%	100%	100%
	<i>TPBF</i>	Positivos	0%	0%	0%	0%
		Negativos	100%	100%	100%	100%

Tras el tratamiento con **clorhexidina** al 0.02% se obtuvo un 46% y 69% de resultados positivos para los genes *hsp70* y *TPBF* respectivamente. Los resultados por tipo de material de lente son distintos entre los genes. En el caso del gen *hsp70*, el mayor porcentaje de positivos se obtuvo con las lentes RPG (un 75%), seguido de las lentes de hidrogel de silicona (38%) y las lentes de hidrogel convencional (25%). En el caso del gen *TPBF*, el mayor porcentaje de positivos se obtuvo con las lentes de hidrogel de silicona, un 88%, seguido de las lentes de hidrogel convencional (63%) y las lentes RPG (56%). Estos resultados, mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto al control negativo ($p < 0.05$) para todos los casos excepto para las lentes de hidrogel con el gen *hsp70*.

Tabla 19. Resultados expresados en tanto por ciento del número de positivos y negativos obtenidos tras tratamiento con clorhexidina 0.02%.

		CLORHEXIDINA			
		TOTAL	Hidrogel	HiSi	RPG
<i>hsp70</i>	Positivos	46%	25%	38%	75%
	Negativos	54%	75%	63%	25%
<i>TPBF</i>	Positivos	69%	63%	88%	56%
	Negativos	31%	38%	13%	44%

Por otro lado, se hizo un control complementario de aclarado de las LC sólo con solución salina (Tabla 20). El 100% de las lentes aclaradas sólo con solución salina dieron un resultado positivo de presencia de *A.castellanii* mostrando diferencia estadísticamente significativa respecto al control negativo ($p < 0.05$).

Además, se analizaron muestras de agua mediante PCR para detectar la posible presencia de *Acanthamoeba*. Por un lado, se analizó el agua de grifo utilizada en el estudio y por otro se eligió una marca conocida de agua mineral comercializada. Se obtuvieron resultados negativos de la presencia de *Acanthamoeba* para todas las muestras.

Tabla 20. Resultados expresados en tanto por ciento del número de positivos y negativos obtenidos tras aclarado de las LC sólo con solución salina.

		CONTROL SOLUCIÓN SALINA			
		TOTAL	Hidrogel	HiSi	RPG
<i>hsp70</i>	Positivos	100%	100%	100%	100%
	Negativos	0%	0%	0%	0%
<i>TPBF</i>	Positivos	100%	100%	100%	100%
	Negativos	0%	0%	0%	0%

2.2 VALORES DE CTs OBTENIDOS

Los resultados de las qPCR se analizaron también en función de la media de los valores de Ct obtenidos por cada tipo de lente y tipo de tratamiento realizado. Estos resultados se muestran en la Tabla 21, 22, 23 y 24, expresados como media \pm desviación estándar (DE). Valores más bajos de Ct indican que la cantidad de ARN en las muestras es mayor, es decir, mayor presencia de la ameba. Las PCR con resultado “*indeterminado*” (sin valor numérico de Ct) indican la ausencia de material genético de la ameba en la muestra analizada. Por ello, para estos casos, no está representada la barra del valor medio de Ct en las gráficas.

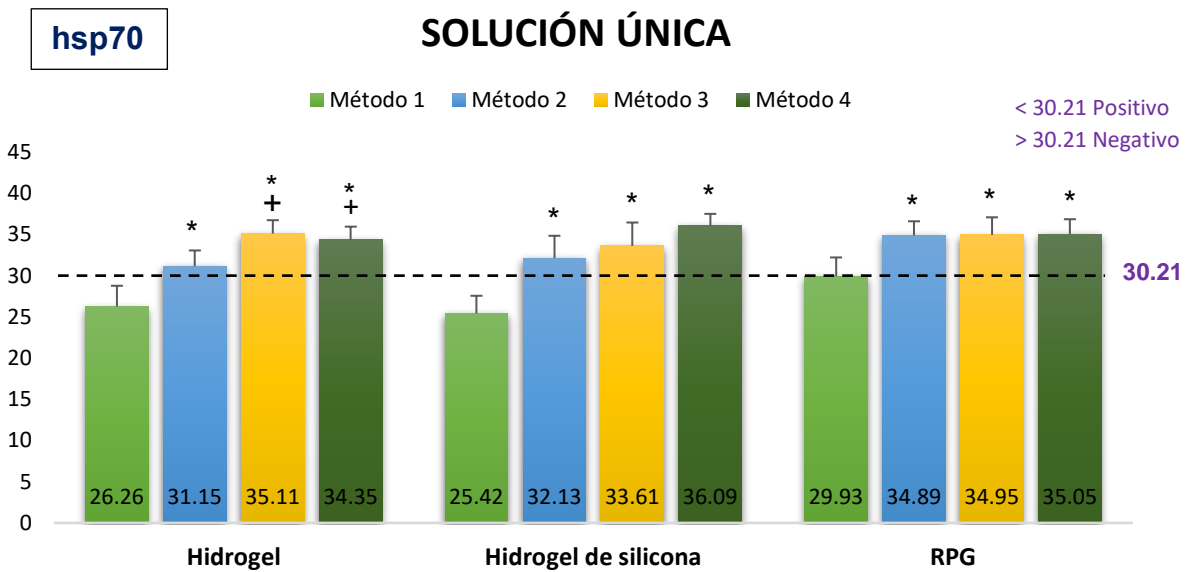
Para analizar si existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos previos de limpieza para cada solución de limpieza/conservación (solución única, Povidona, Peróxido de hidrógeno y Progent) se realizó la prueba U de Mann - Withney entre los valores de Ct obtenidos tras cada tratamiento.

- **Solución única**

Para el gen hsp70 (Figura 35.A), los valores de Ct más bajos obtenidos (menores de 30) con el uso de la solución única, corresponden a las lentes de contacto de hidrogel (Ct: 26.26), hidrogel de silicona (Ct: 25.42) y RPG (Ct: 29.93) que fueron aclaradas previamente con agua de grifo (método 1). Estos valores mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) frente a los valores de Ct obtenidos con el aclarado con solución salina (método 2) y el uso de limpiador (método 3 y 4) para todas las LC. Para la LC de hidrogel, además se encontró diferencias significativas entre los valores de Ct obtenidos con el aclarado previo con solución salina (método 2).

Para el gen TPBF (Figura 35.B), los valores de Ct más bajos obtenidos también corresponden a las LC que fueron aclaradas previamente con solución salina. Estos valores de 29.05; 28.93; 32.11 para las LC de hidrogel, hidrogel y RPG, fueron mayores que los obtenidos con el gen hsp70. Estos valores mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) frente a los valores de Ct obtenidos con el aclarado con solución salina (método 2) y el uso de limpiador (método 3 y 4) para todas las LC. Con el uso del limpiador + aclarado con solución salina no se obtuvo ningún valor de Ct ("indeterminado") para las LC de hidrogel de silicona y RPG que indica la no presencia de ameba. Con el uso del limpiador + aclarado con solución salina ocurrió lo mismo.

A)



B)

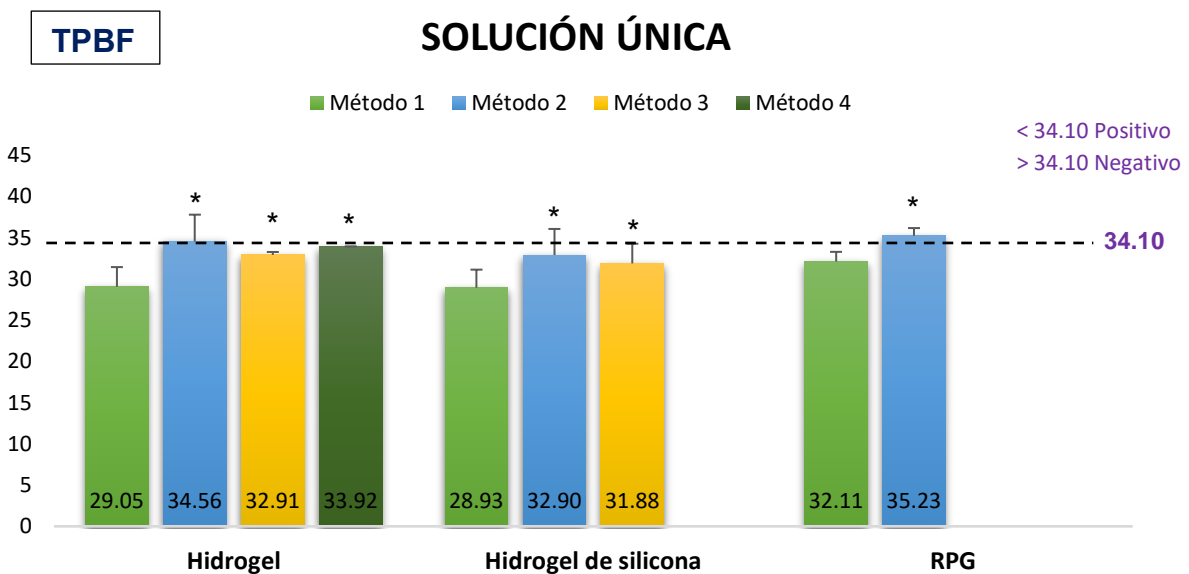


Figura 35. Valores medios de Ct obtenidos en la qPCR representados con su desviación estándar para el gen hsp 70 (A) y el gen TPBF (B). *+P < 0.05, test U de Mann-Withney para muestras independientes. *P < 0.05 respecto método 1; +P < 0.05 respecto método 2.

Tabla 21. Valores de Ct (media \pm DE) obtenidos en la qPCR para las LC que fueron tratadas con la solución única con los diferentes métodos de limpieza previos realizados. La comparación estadística se hizo entre cada uno de los métodos de limpieza previa realizados. *P < 0.05, test U de Mann-Withney para muestras independientes.

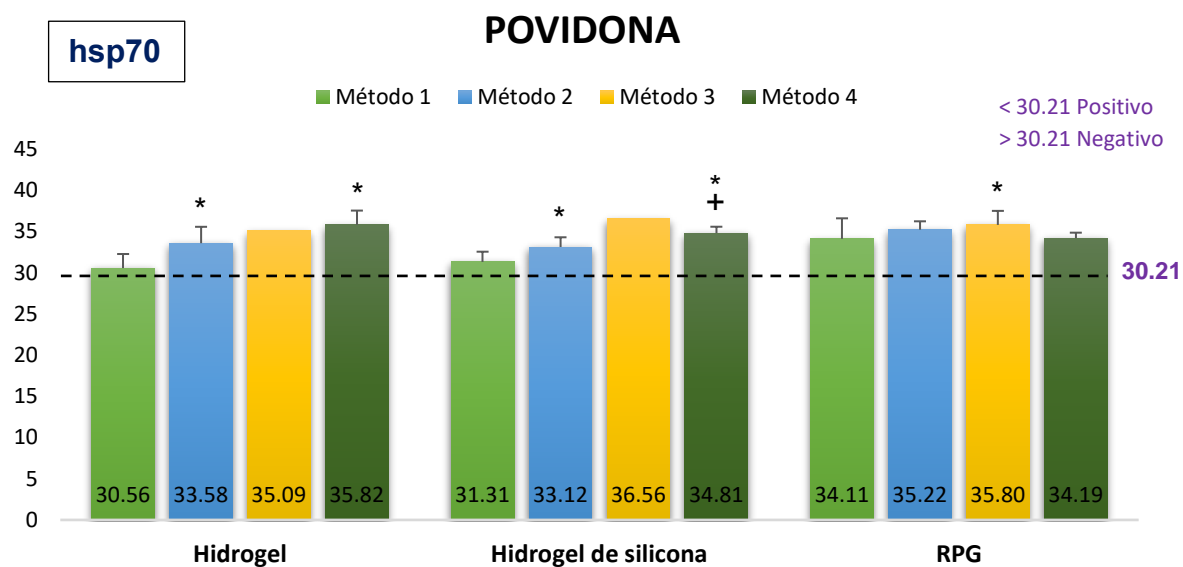
SOLUCIÓN ÚNICA						
	hsp70			TPBF		
	Hidrogel	HiSi	RPG	Hidrogel	HiSi	RPG
Método 1	26.26 \pm 2.51	25.42 \pm 2.14	29.93 \pm 2.28	29.05 \pm 2.38	28.93 \pm 2.20	32.11 \pm 1.18
Método 2	31.15 \pm 1.91	32.13 \pm 2.71	34.89 \pm 1.71	34.56 \pm 3.24	32.90 \pm 3.16	35.23 \pm 0.94
Método 3	35.11 \pm 1.62	33.61 \pm 2.84	34.95 \pm 2.13	32.91 \pm 0.36	31.88 \pm 2.39	-
Método 4	34.35 \pm 1.60	36.09 \pm 1.41	35.05 \pm 1.80	33.92 \pm 0.03	-	-
p-valores						
Método 1 vs 2	0*	0*	0*	0.001*	0.008*	0.034*
Método 1 vs 3	0*	0*	0.001*	0.002*	0.118	-
Método 1 vs 4	0*	0*	0.003*	0.025*	-	-
Método 2 vs 3	0*	0.051	0.684	0.203	0.732	-
Método 2 vs 4	0.005*	0*	0.955	0.667	-	-
Método 3 vs 4	0.495	0.056	0.808	0.064	-	-

- **Povidona yodada**

Para el gen hsp70 (Figura 36.A) los valores más bajos de Ct obtenidos para cada tipo de LC corresponde con aquellas que fueron tratadas previamente con el método 1. La povidona yodada mostró una eficacia mayor con el uso del limpiador frente al aclarado de las LC sólo con agua de grifo que se observa con diferencias estadísticamente significativa entre los métodos ($p < 0.05$). Así, el uso de la PY con el aclarado previo con agua de grifo (método 1) mostró una menor eficacia de limpieza al mostrar diferencias significativas ($p < 0.05$) frente al aclarado con solución salina (método 2) para las LC de hidrogel e hidrogel de silicona. También mostró diferencias significativas frente al uso de limpiador + aclarado con salina (método 4) para la LC de hidrogel e hidrogel de silicona y con el método 3 para las lentes RPG. En la limpieza de las lentes de hidrogel de silicona, el aclarado con salina (método 2) mostró menor eficacia de limpieza frente al uso de limpiador + aclarado con salina (método 4) ($p < 0.05$).

Para el gen TPBF, (Figura 36.B) no hubo diferencias significativas entre los diferentes métodos de limpieza previos realizados. Se obtuvo un resultado “indeterminado” (no presencia de ameba) para los siguiente métodos: el uso de limpiador + aclarado con agua de grifo (método 3) en todas las LC, con el uso de limpiador + aclarado con solución salina (método 4) en las LC de hidrogel e hidrogel de silicona y con el aclarado sólo con solución salina (método 2) para las LC de hidrogel e hidrogel de silicona.

A)



B)

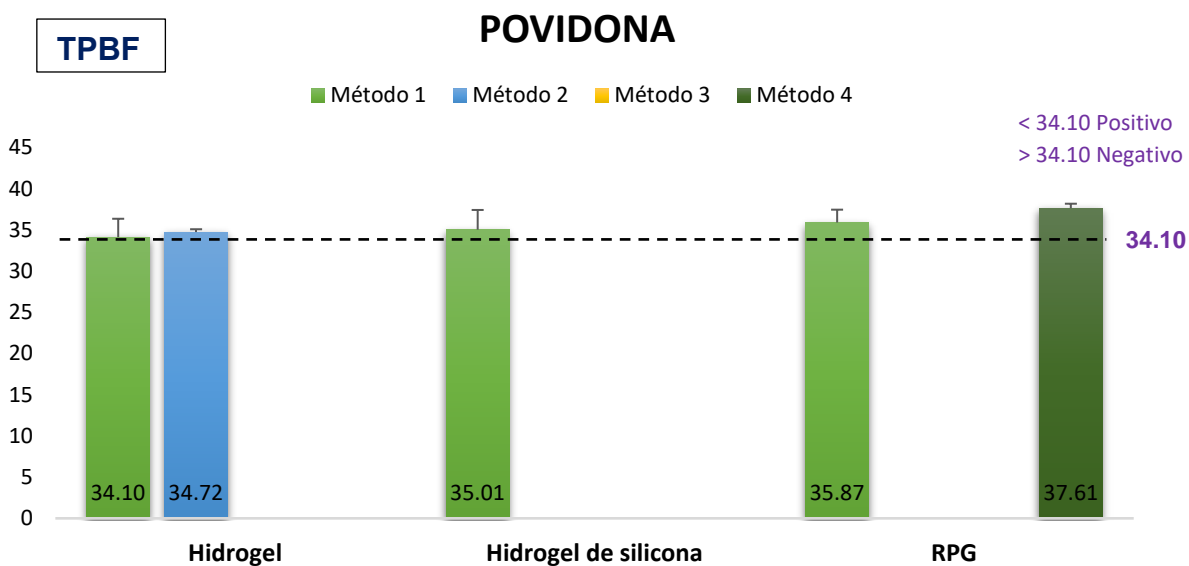


Figura 36. Valores medios de los CTs obtenidos en la qPCR representados con su desviación estándar para el gen hsp70 (A) y TPBF (B). **P < 0.05, test U de Mann-Withney para muestras independientes. *P < 0.05 respecto método 1; +P < 0.05 respecto método 2.

Tabla 22. Valores de Ct (media \pm DE) obtenidos en la qPCR para las LC que fueron tratadas con la solución con povidona yodada con cada método de limpieza previo realizado. La comparación estadística se hizo entre cada uno de los métodos de limpieza previo realizados. *P < 0.05, test U de Mann-Withney para muestras independientes.

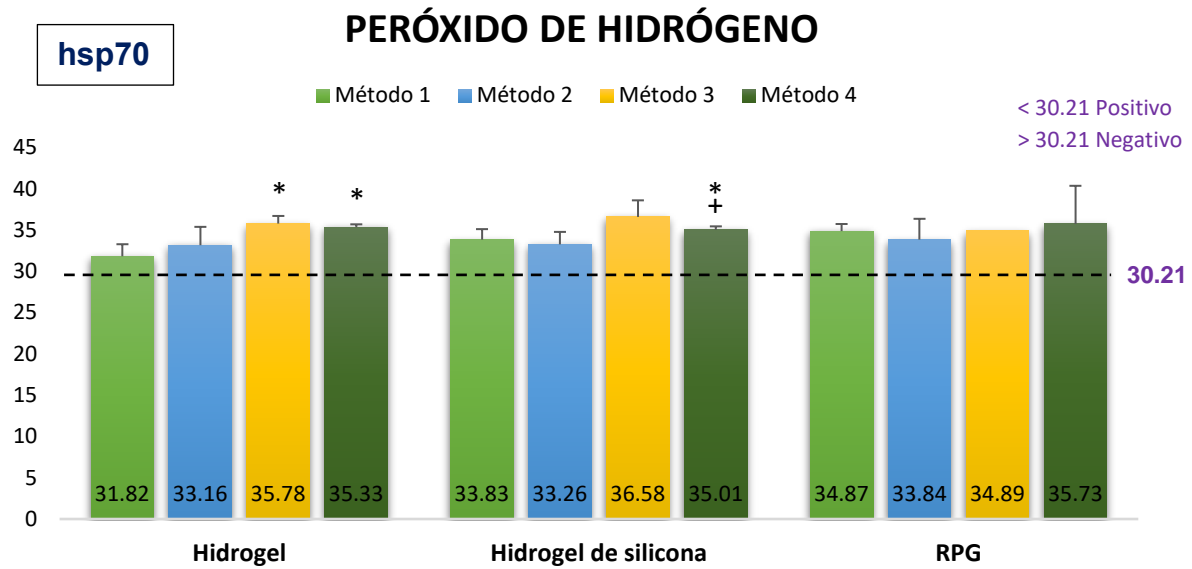
POVIDONA						
	hsp70			TPBF		
	H	HiSi	RPG	H	HiSi	RPG
Método 1	30.56 \pm 1.71	31.31 \pm 1.24	34.11 \pm 2.49	34.10 \pm 2.24	35.01 \pm 2.39	35.87 \pm 1.56
Método 2	33.58 \pm 1.99	33.12 \pm 1.18	35.22 \pm 1.01	34.72 \pm 0.34	-	-
Método 3	35.09	36.56	35.8	-	-	-
Método 4	35.82 \pm 1.72	34.81 \pm 0.77	34.19 \pm 0.67	-	-	37.61 \pm 0.55
p-valores						
Método 1 vs 2	0.001*	0.002*	0.08	0.283	-	-
Método 1 vs 3	0.102	0.102	0.037*	-	-	-
Método 1 vs 4	0.007*	0*	0.750	-	-	0.083
Método 2 vs 3	0.355	0.111	0.866	-	-	-
Método 2 vs 4	0.101	0.003*	0.069	-	-	-
Método 3 vs 4	0.655	0.117	0.059	-	-	-

- **Peróxido de hidrógeno**

Para el gen hsp70 (Figura 37.A), la eficacia mostrada fue alta (98% y 100%). Aunque la media de los valores de Ct supera el límite establecido de 30.21, analizando los Ct de manera individual si se encontraron algunos resultados positivos de la presencia de ameba. Así, se pueden observar diferencias entre algunos métodos de limpieza. Para las LC de hidrogel el valor de Ct obtenido tras el aclarado previo con agua de grifo (método 1) fue menor y estadísticamente diferente ($p < 0.05$) a los valores de Ct obtenidos tras el uso de previo de un limpiador (método 3 y 4). Para las LC de hidrogel de silicona, el uso de limpiador y aclarado con salina (método 4) mostró diferencias significativas frente al método 1 y 2.

Para el gen TPBF (Figura 37.B) también se obtuvieron mismos valores de eficacia. Por el contrario, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes métodos. Con el uso previo del limpiador (método 3 y 4) se obtuvo un valor “indeterminado” de Ct que indica la no presencia de ameba. Con el aclarado con agua de grifo tampoco se obtuvieron valores para las LC de hidrogel de silicona y RPG.

A)



B)

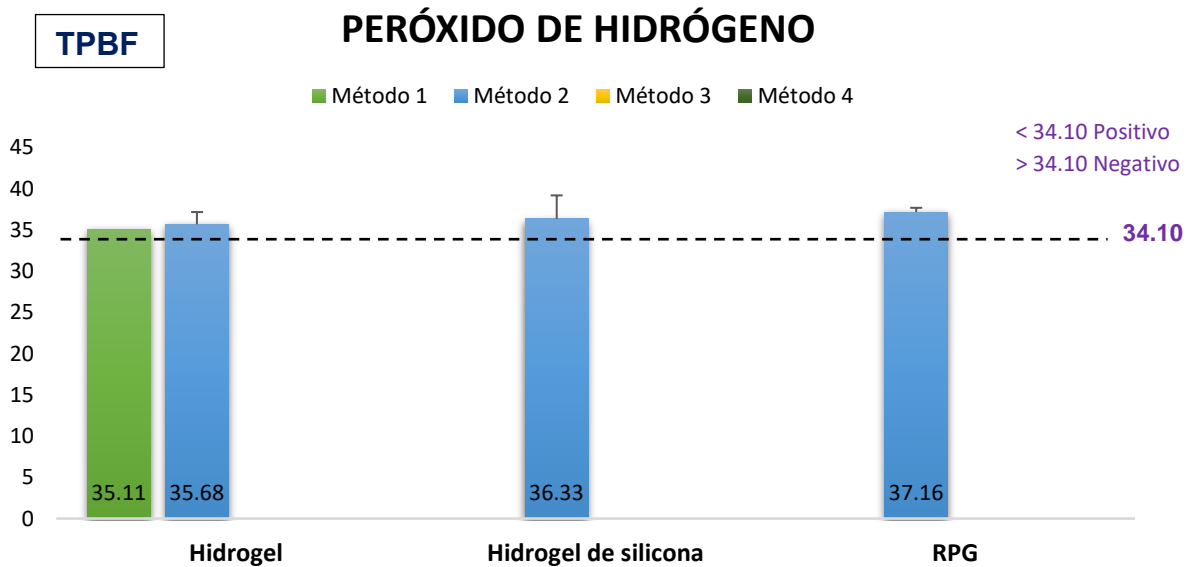


Figura 37. Valores medios de los CTs obtenidos en la PCR-cuantitativa representados con su desviación estándar. *+P < 0.05, test U de Mann-Withney para muestras independientes. *P < 0.05 respecto método 1; †P < 0.05 respecto método 2.

Tabla 23. Valores de Ct (media \pm DE) obtenidos en la qPCR para las LC que fueron tratadas con la solución de peróxido de hidrógeno con cada método de limpieza previo realizado. La comparación estadística se hizo entre cada uno de los métodos de limpieza previo realizados. *P < 0.05, test U de Mann-Withney para muestras independientes.

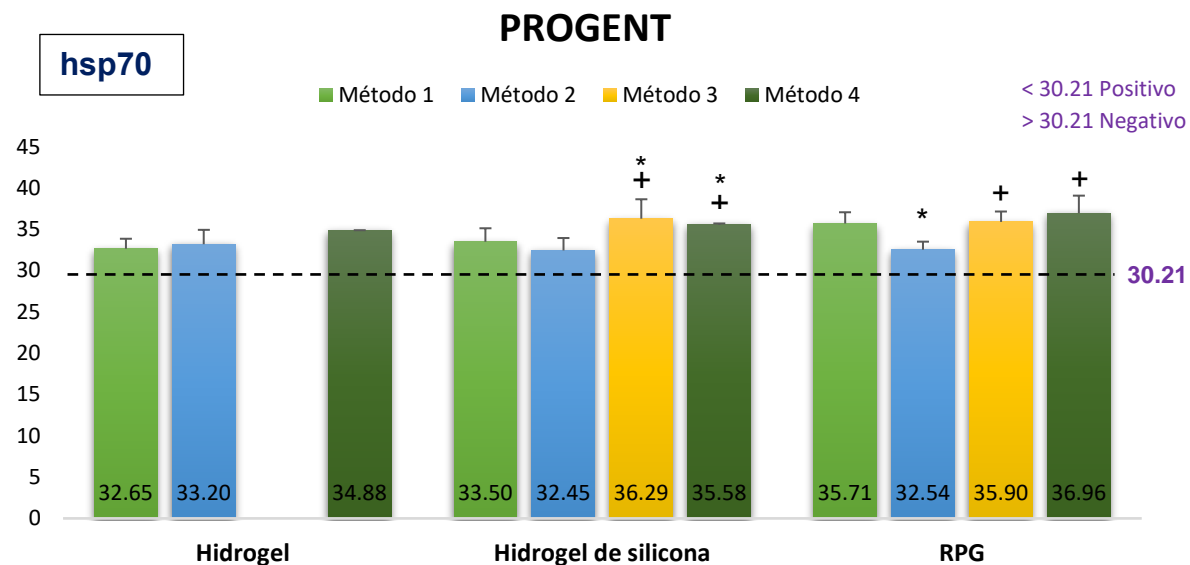
PERÓXIDO DE HIDRÓGENO						
	hsp70			TPBF		
	H	HiSi	RPG	H	HiSi	RPG
Método 1	31.82 \pm 1.46	33.83 \pm 1.28	34.87 \pm 0.86	35.11	-	-
Método 2	33.16 \pm 2.22	33.26 \pm 1.51	33.84 \pm 2.52	35.68 \pm 1.49	36.33 \pm 2.85	37.16 \pm 0.52
Método 3	35.78 \pm 0.92	36.58 \pm 2.01	34.89	-	-	-
Método 4	35.33 \pm 0.36	35.01 \pm 0.43	35.73 \pm 4.63	-	-	-
p-valores						
Método 1 vs 2	0.106	0.355	0.073	1	-	-
Método 1 vs 3	0.025*	0.062	0.817	-	-	-
Método 1 vs 4	0.025*	0*	1	-	-	-
Método 2 vs 3	0.057	0.068	0.385	-	-	-
Método 2 vs 4	0.081	0.002*	0.497	-	-	-
Método 3 vs 4	0.439	0.554	1	-	-	-

- **Progent**

Para el gen hsp70 (Figura 38.A) se encontraron sólo valores de Ct inferiores al límite de 30.21(resultados positivos) en el método 2. Entre las LC de hidrogel de silicona y RPG se encontraron algunas diferencias significativas entre los tratamiento previos realizados. Los valores obtenidos tras el uso del agua de grifo (método 1) para la limpieza de las LC de hidrogel de silicona mostró diferencias significativas frente al uso del limpiador (método 3 y 4). También hubo diferencias significativas del método 1 frente al método 2 para las lentes RPG. El aclarado de las lentes de hidrogel de silicona y RPG con solución salina mostró diferencia significativa respecto al uso del limpiador (método 3 y 4).

Para el gen TPBF (Figura 38.B), todos los valores de Ct obtenidos superaron el límite de 34.10 y se consideraron resultados negativos de la presencia de *Acanthamoeba*. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes métodos. Con el uso previo del limpiador (método 3 y 4) se obtuvo un valor “indeterminado” de Ct para todas las LC que indica la no presencia de ameba. Con el aclarado con agua de grifo el valor de Ct también fue indeterminado para las LC RPG.

A)



B)

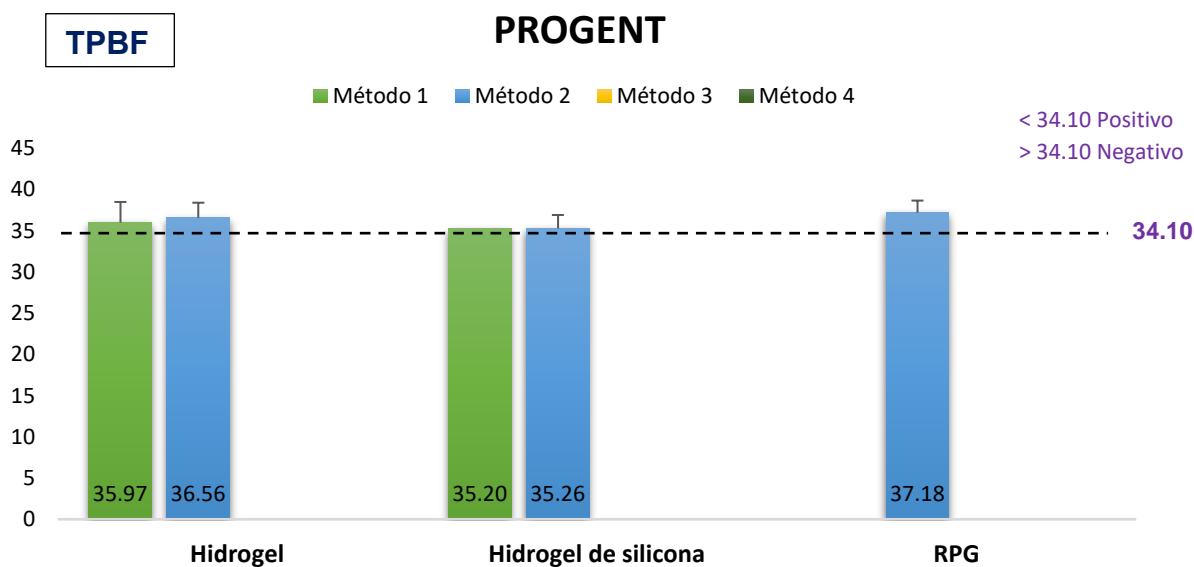


Figura 38. Valores medios de los CTs obtenidos en la PCR-cuantitativa representados con su desviación estándar. $^{*}P < 0.05$, test U de Mann-Withney para muestras independientes. $^{*}P < 0.05$ respecto método 1; $^{+}P < 0.05$ respecto método 2.

Tabla 24. Valores de Ct obtenidos en la qPCR para las LC que fueron tratadas con la solución con Progent con cada método de limpieza previo realizado. La comparación estadística se hizo entre cada uno de los métodos de limpieza previo realizados. *P < 0.05, test U de Mann-Withney para muestras independientes.

PROGENT						
	hsp70			TPBF		
	H	HiSi	RPG	H	HiSi	RPG
Método 1	32.65 ± 1.21	33.50 ± 1.63	35.71 ± 1.36	35.97 ± 2.51	35.20	-
Método 2	33.20 ± 1.74	32.45 ± 1.50	32.54 ± 0.97	36.56 ± 1.83	35.26 v 1.63	37.18 ± 1.47
Método 3	-	36.29 ± 2.36	35.90 ± 1.26	-	-	-
Método 4	34.88 ± 0.02	35.58 ± 0.14	36.96 ± 2.13	-	-	-
p-valores						
Método 1 vs 2	0.357	0.118	0*	0.564	0.655	-
Método 1 vs 3	-	0.038*	0.458	-	-	-
Método 1 vs 4	0.062	0.002*	0.137	-	-	-
Método 2 vs 3	-	0.03*	0.001*	-	-	-
Método 2 vs 4	0.204	0.001*	0.005*	-	-	-
Método 3 vs 4	-	0.425	0.522	-	-	-

V. DISCUSIÓN

1. FASE 1. SISTEMA DE DETECCIÓN CON AUNPs.

Las queratitis provocadas por *Acanthamoeba*, junto con las provocadas por *P.aeruginosa* son las más comunes asociadas al uso de LC y, aunque poco frecuente, es una patología agresiva que puede provocar la pérdida de la visión (366). El éxito en el tratamiento de la patología reside en la realización de un diagnóstico diferencial correcto y temprano.

Por ello, el objetivo de esta primera fase fue el desarrollo de una estrategia que permitiese la detección específica de *Acanthamoeba* de forma rápida y sencilla. Con este fin, en la presente tesis doctoral, se diseñó y desarrolló un sistema de detección colorimétrico y específico del ARNm de *A.castellanii* mediante nanopartículas de oro.

En esta tesis, por un lado, se han optimizado dos protocolos para la funcionalización de nanopartículas de oro de tamaño 25 nm de manera satisfactoria. Sin embargo, las nanopartículas empleadas, aun siguiendo mismo protocolo de síntesis, pueden ser más o menos inestables. Esto hace que los niveles de pH, sal, así como la ratio de ADN usado puedan necesitar pequeños ajustes durante el proceso.

Uno de los problemas encontrados durante el trabajo con nanopartículas fue su baja estabilidad. Así, ante cambios bruscos del medio, o en presencia de otras moléculas biológicas, se puede producir una agregación de las nanopartículas de manera no específica. Esto limita las condiciones del sistema a desarrollar. La idea de aplicación de este método de detección con nanopartículas era su utilización especialmente por usuarios de lentes de contacto. De tal manera que, en el caso de existir contaminación por la ameba en el estuche de las lentes, el sistema pudiese

detectarlo. No obstante, las soluciones de mantenimiento, compuestas por sales, provocarían la agregación no específica del sistema.

Con el sistema de detección colorimétrico, se obtuvo un LoD de 0.02 μM (1.12×10^{11} copias) para la detección de *A. castellanii* a simple vista. Estos resultados muestran una sensibilidad baja en la detección de la ameba. Hay que tener en cuenta que bastaría con que existiese la presencia de una sola ameba para que pudiese desarrollarse la queratitis por *Acanthamoeba*.

En la literatura científica, la mayoría de los estudios publicados que usan AuNPs para el desarrollo de sensores colorímetros en la detección de ADN, utilizan métodos de amplificación para aumentar la sensibilidad del sistema, obteniendo así, LoD inferiores (367-370). La amplificación asistida por mellado de endonucleasa (NEANA) ha mostrado alcanzar LoD de 10 pM (371), 1 pM (372). Elumalai et al. (373) encontraron que el uso de NEANA redujo el límite de detección de 100 nM a 8nM.

Sin embargo, en este trabajo no se utilizó ningún método de amplificación de ácidos nucleicos para evitar añadir complejidad al sistema. Existen algunos trabajos que, al igual que en esta tesis, utilizan sistemas basados en AuNPs para la detección colorimétrica del ADN de diferentes patógenos sin métodos de amplificación (367-370, 373). Así, Moitra et al. (335) obtuvieron un LoD de 0.18 ng/ μL en la detección de Sars-CoV en un tiempo de 10 minutos. Liandris et al. obtuvieron un LoD de 2 ng/ μL en la detección de *Mycobacterium* spp en un tiempo de 15 minutos (327). Estos resultados muestran un tiempo de respuesta y LoD similares al LoD de 0.02 μM (0.2693 ng/ μL) obtenido en este trabajo. Por otro lado, otros estudios han mostrado LoD mayores en la detección *E. coli* (54 ng) y *Salmonella* spp. (5×10^8 CFU) en tiempos de 30 min (328, 374).

Algunos autores encontraron una mejora de la sensibilidad de los sistemas de detección con el uso de nanopartículas de mayor tamaño (60nm) (364). Sin embargo, nanopartículas de tamaño mayor tienden a la agregación probablemente por tener fuerzas de Van der Waals mayores. Esto las hace más inestables, dificultando los procesos de funcionalización (375).

Actualmente, el principal método de detección de *Acanthamoeba* basado en la detección de ácidos nucleicos es la PCR. Esta técnica ha demostrado una buena sensibilidad en la detección de ADN de *Acanthamoeba*. Thompson et al. (376) informaron de un LoD de 11.3 copias de ADN /10 µL pudiendo detectar 0.7 quistes, y 2.3 trofozoítos por 10 µL de la solución de reacción. Sin embargo, la técnica de PCR requiere de equipos especiales y de personal cualificado y para obtener un diagnóstico puede tardar de 1/2 a 5 días si no se realiza en un centro especial o si se necesitan cultivos previos. Por esta razón, no es la primera opción para el diagnóstico de la queratitis por *Acanthamoeba* (216, 217).

Aunque el sistema de detección colorimétrico mediante AuNPs desarrollado haya mostrado inicialmente una sensibilidad baja para lo requerido en la detección de ameba, existen formas de mejora del sistema que anticipan resultados más prometedores. Así, las AuNPs abren la posibilidad de desarrollo de un sistema de detección de *A. castellanii* más sencillo, barato y rápido que las técnicas actuales. En este sentido, el sistema con AuNPs ofrece la posibilidad de detectar la presencia de *A. castellanii* por parte de los profesionales de la visión para un diagnóstico y tratamiento rápido y adecuado de la QA y por parte de los usuarios de lentes de contacto antes de que aparezcan los síntomas, evitando la infección o confirmando la patología.

2. FASE 2. EFICACIA DE LOS SISTEMAS DE LIMPIEZA

Desde su aparición, el uso de las lentes de contacto ha ido en aumento y sus aplicaciones han ido evolucionando desde la compensación óptica, lentes terapéuticas, sistemas de liberación de fármacos o como indicadores de la subida de presión intraocular o de la glucosa en sangre (377-380). Las malas condiciones de uso e higiene son el principal factor de riesgo que puede llevar al desarrollo de queratitis por *Acanthamoeba* (350). En este sentido, las soluciones de limpieza y mantenimiento juegan un papel fundamental en el mantenimiento de las lentes y en la protección frente a diferentes microorganismos.

Por ello, el objetivo de esta segunda fase fue valorar la eficacia de diferentes sistemas de limpieza de lentes de contacto utilizando como sistema de detección de la presencia de *Acanthamoeba*, el método colorimétrico desarrollado con las nanopartículas de oro y la qPCR.

El método de detección con las **nanopartículas de oro** en las muestras de las lentes de contacto se utilizó primeramente en las muestras del control positivo. El sistema de detección con AuNPs no detectó la presencia de ameba y no hubo ninguna respuesta colorimétrica. Esto puede ser debido a que la carga de ameba presente en la muestra estuviese por debajo del límite de detección del sistema. Sin embargo, la concentración estimada mediante nanodrop fue de 39.5 ng/μL, que entra dentro del límite de detección colorimétrico estimado de 28 ng/μL. Las muestras se limpiaron del buffer RLT mediante el protocolo de extracción de ácidos nucleicos, pudiendo perderse parte del material genético dificultando la detección por las AuNPs.

Las nanopartículas de oro detectaron la presencia de *A.castellanii* en muestras reales, pero no funcionaron en la detección con las muestras de lentes de contacto contaminadas. Otra limitación observada del sistema es que hay que provocar previamente la lisis de la ameba para que se libere el material genético y así pueda interactuar con las AuNPs provocando la agregación de estas. Para ello, se utilizó el buffer de lisis RLT. Sin embargo, dada también la sensibilidad de las AuNPs a las condiciones del medio, el buffer RLT fue eliminado haciendo el protocolo de purificación de ácidos nucleicos previo a la mezcla con las AuNPs.

Por otro lado, la detección de la presencia de ameba se hizo mediante la técnica de **PCR cuantitativa**, que es el único método de detección molecular de *Acanthamoeba* que actualmente se usa. La PCR se utiliza para el diagnóstico diferencial de las posibles queratitis por *Acanthamoeba* con una sensibilidad del 70-88%. Las PCR cuantitativas realizadas ofrecen un límite de detección de 0.8 amebas por cantidad total de muestra procesada. Thompson et al. (376) reportaron límites de detección de 11.3 copias de ADN /10 µL siendo capaces de detectar 0.7 quistes, y 2.3 trofozoítos por 10 µL de reacción. Según la literatura, el contenido de ADN en una célula de ameba es de 1 a 2 picogramos (381-383).

En este estudio se realizaron PCR basadas en la detección de ARN. La detección del ARN nos indica la presencia de ameba viva en las muestras analizadas, mientras que el ADN puede ser detectado tanto en ameba viva o muerta ya que tarda mucho más en degradarse que el ARN. Por ello, la detección de ARN nos da resultados más fiables a la hora de saber si una muestra puede ser potencialmente peligrosa, ya que nos indica que la ameba es viable y por tanto puede tener efecto patógeno. Los valores de Ct de referencia a partir de los cuales se consideró un

resultado positivo o negativo de la presencia de ameba, se tomaron en función del control negativo.

Los resultados obtenidos de las qPCR sirven para valorar la eficacia de los sistemas de limpieza / mantenimiento frente a *A.castellanii*. Acorde a los resultados, esta eficacia puede variar según diferentes factores. Así, la discusión de los resultados se realizó para los pasos previos de limpieza realizados (método 1, 2, 3 y 4); para cada tipo de solución de desinfección empleada, según el tipo de material de la LC y según el tipo de gen analizado en qPCR.

Los estudios existentes sobre la eficacia de tratamientos de desinfección y mantenimiento de las lentes de contacto analizan la presencia del patógeno realizando cultivos y cuantificando mediante microscopía la reducción del número de trofozoítos y quistes observados antes y después del tratamiento. En este estudio, el uso de la qPCR aporta una fiabilidad mayor a la hora de determinar la eficacia de los sistemas de limpieza ya que la PCR es una técnica más sensible a la presencia de la ameba. Así, las técnicas moleculares con alta sensibilidad pueden detectar un número reducido de amebas (menos de 1 ameba por microlitro) siendo más sensibles que el examen con microscopio para el diagnóstico de *Acanthamoeba* (384-386).

2.1 MÉTODOS DE LIMPIEZA PREVIOS

Previo al uso de las diferentes soluciones de limpieza /mantenimiento de las LC, se siguieron diferentes métodos de limpieza para simular las condiciones de máxima limpieza posible.

El uso de un **limpiador** (20% alcohol isopropílico) con su posterior aclarado mostró mayor eficacia en la limpieza de ameba en comparación con las LC que fueron

previamente aclaradas sólo. La mayor eficacia del uso del limpiador frente al aclarado sólo de las LC se observó principalmente cuando se usó la solución única. Esto nos indica que el uso de un limpiador como sistema de limpieza previo tiene mayor efectividad que el aclarado sólo de las lentes. En la literatura científica existen estudios que respaldan la eficacia de las soluciones basadas en alcohol isopropílico 20% frente a quistes de ameba (387, 388). Un factor importante a tener en cuenta es que el limpiador se utilizó frotando las lentes de contacto en la palma de la mano mientras que el aclarado se realizó por inmersión de la lente, por lo que podría ser el frotado de la LC lo que mejore esa eficacia. Así, la combinación del uso del alcohol isopropilo junto con el frotado de la lente, incrementa la efectividad de limpieza frente *Acanthamoeba*. El uso del limpiador con el aclarado posterior con solución salina o agua de grifo no mostró variaciones en la eficacia. Esto indica que todo el papel de limpieza lo realiza el limpiador junto con el frotado y la solución salina y el agua de grifo no influyen en la eficacia.

Por otro lado, aunque el agua de grifo no está aconsejada para la limpieza de las LC, se quiso analizar de qué manera puede influir en la eficacia de las soluciones de limpieza/ conservación. Contrario al aclarado con agua de grifo se eligió la solución salina que si es recomendada por profesionales. El aclarado con **agua de grifo** disminuyó la eficacia de limpieza frente a **la solución salina** obteniendo más resultados positivos. Además, los valores de Ct más altos obtenidos con solución salina indican una menor presencia de ameba y, por tanto, podría indicar una mayor efectividad del uso de la solución salina frente al agua de grifo. Esta diferencia entre ambos aclarados es notable especialmente en las lentes que se trataron después con la solución única y con la solución de povidona yodada.

Por otro lado, se quiso estudiar el efecto que del aclarado sólo de las LC con solución salina sin realizar tratamientos posterior. Así, este control, mostró un 100% de resultados positivos. Esto indica que el proceso de aclarado con solución salina no tuvo influencia en la “limpieza” de ameba. Siguiendo esa línea de pensamiento, entonces, la eficacia de limpieza obtenida para las LC que fueron aclaradas previamente con solución salina y tratadas después con las diferentes soluciones de limpieza, se debe sólo a la solución de limpieza usada y no al aclarado previo.

El análisis mediante qPCR del agua de grifo empleada mostró resultados negativos de la presencia de *Acanthamoeba*. Estos resultados nos llevan a pensar que la probabilidad de encontrar ameba en el agua del grifo era baja, aunque no son del todo representativos ya que, que una muestra de agua no esté contaminada no descarta la posibilidad de encontrar ameba en otra. Considerando los resultados negativos obtenidos cabría esperar haber encontrado en el estudio resultados más similares entre al aclarado del agua de grifo frente al aclarado con salina. Estas diferencias nos llevan a suponer varias ideas. Una explicación puede ser que haya habido alguna diferencia metodológica a la hora de hacer la limpieza, aunque se siguiese mismo protocolo. Por otro lado, aunque el aclarado con solución salina pueda no tener efecto sobre la ameba, el uso del agua de grifo para aclarar las lentes parece influir de manera negativa en la limpieza, obteniendo finalmente mayores resultados positivos. Por último, las diferencias de resultados encontradas entre el uso de agua grifo y la solución salina para el aclarado de las lentes puede ser debido a que la solución salina estuviese provocando un choque osmótico que destruyese los trofozoítos ayudando a su eliminación, aunque en el control que se hizo de la solución salina no se mostrase este posible efecto.

2.2 SOLUCIONES DE LIMPIEZA / MANTENIMIENTO

En este apartado se discuten los resultados obtenidos con cada tipo de solución de limpieza / mantenimiento empleada.

- **Solución única**

En este estudio, la solución única fue eficaz en la eliminación de *A.castellanii* cuando se usó el limpiador para todas las LC y cuando se realizó el aclarado previo con solución salina para las LC de hidrogel de silicona y RPG. Esto se observa con resultados sin diferencias estadísticamente significativas respecto al control negativo. El uso de la solución única con aclarado previo con agua de grifo mostró su ineficacia en la limpieza frente *A.castellanii*.

Sin embargo, que no existan diferencias significativas frente al control negativo no significa que no haya algún resultado positivo de la presencia de ameba. Esto tendría relevancia clínicamente ya que con que haya presencia de una ameba viable podría provocar la queratitis por *Acanthamoeba*. En este sentido, sólo se obtuvo un 100% de eficacia con el uso del limpiador + aclarado con salina seguido por un 96% para el uso de limpiador+ aclarado con agua de grifo.

El método de limpieza previo de las LC influyó de manera significativa en la eficacia de limpieza de la solución única. Así, la eficacia fue mayor cuando las lentes fueron tratadas previamente con limpiador frente al aclarado sólo. Entre el uso del limpiador + aclarado con solución salina y el uso de limpiador + aclarado con agua de grifo no hubo diferencias significativas en su eficacia. Aunque se haya demostrado la eficacia del alcohol isopropílico 20% (limpiador) frente ameba, también el frotado y

aclarado de las lentes previo al uso de las soluciones únicas ha demostrado aumentar la eficacia frente al aclarado sólo (389-393). Así, la combinación de limpiador junto con el correspondiente frotado muestra buenos resultados en la eficacia.

La eficacia de limpieza de la solución única disminuyó significativamente con el uso de agua de grifo para aclarar las LC en comparación con el resto de los métodos, obteniéndose un valor bajo de eficacia del 15%. Aunque el control realizado con el agua de grifo no diese resultados positivos en presencia de ameba, su uso influye de manera negativa. Por ello el uso del agua de grifo para aclarar, aunque se use la solución única después, estaría contraindicado. Por otro lado, el uso de la solución salina para aclarar mostró una mejor eficacia, del 83% respecto al uso del agua de grifo. Sin embargo, mostró más ineficacia que el uso de limpiador+ aclarado con agua de grifo para las LC de hidrogel y el uso de limpiador+ aclarado con salina para las LC de hidrogel e hidrogel de silicona.

La solución empleada en este estudio está compuesta por PHMB al 0.0001%, agente antibacteriano en el que basan la mayoría de las soluciones (394). En la literatura científica muchos estudios han encontrado una baja efectividad de estas soluciones frente a *Acanthamoeba* (266, 267, 274, 275). Los resultados obtenidos, llevan al planteamiento de si realmente la solución “única” está diseñada para emplearse de manera única o es necesario apoyar la limpieza con otros tratamientos. Los resultados de esta tesis llevan a la consideración de que se necesita una limpieza de las LC más profunda, ya sea con el frotado de las LC o con el uso de un limpiador para garantizar una mayor eficacia.

En comparación con el resto de las soluciones empleadas en el estudio, la solución única mostró una menor eficacia frente *A.castellanii*. Las soluciones únicas

(también conocidas como multipropósito), están creadas para que sirvan para la limpieza y conservación de las LC. El resto de las soluciones del estudio están más enfocadas en limpieza de las LC usando compuestos más agresivos a concentraciones mayores como el peróxido de hidrógeno, el hipoclorito de sodio o la povidona yodada. Esto nos lleva a la misma consideración anterior, de que las soluciones únicas no sean suficientes para la limpieza de las LC y estén más enfocadas en su conservación.

- **Povidona Yodada (PY)**

La povidona yodada se conoce por su capacidad antiséptica siendo empleada en heridas y antes de procedimientos quirúrgicos incluida la cirugía ocular a una concentración del 5% para reducir el riesgo de endoftalmitis. En este estudio, la solución de PY fue 100% eficaz en la eliminación de ameba con el uso de un limpiador previo para todos los casos y con el aclarado previo con solución salina para las LC de hidrogel de silicona y RPG. Estadísticamente hablando, el uso de la PY con el aclarado previo con agua de grifo sólo fue ineficaz en la eliminación de *A.castellanii* para las LC de hidrogel, por mostrar diferencias significativas frente al control negativo. Sin embargo, que no haya diferencias significativas frente al control negativo para el resto de las LC no significa que no haya presencia de algún resultado positivo y, por tanto, de ameba. Esto tendría importancia clínica ya que puede provocar QA. Así, sólo se encontró una eficacia del 100% (resultados iguales al control negativo) para las LC RPG.

Aunque se recomienda seguir las instrucciones de uso de los fabricantes y el uso de agua de grifo para la limpieza de las LC ha sido asociado con casos de QA,

Yamasaki et al. (291) encontraron que la eficacia de la solución de povidona yodada frente a trofozoítos de *A.castellanii* era la misma cuando se usaba el comprimido desinfectante tanto con la solución recomendada por el fabricante como con agua de grifo. En la presente tesis, sin embargo, a pesar de no encontrar diferencias significativas del aclarado de las LC con agua de grifo frente al control negativo para las LC de hidrogel y RPG, sí se observa una disminución de la eficacia de desinfección, por lo que el uso del agua de grifo previo al uso de PY no sería recomendable. Aun así, se obtuvieron valores de eficacia del 83%.

En la literatura científica, el uso de solución de povidona yodada ha mostrado su eficacia in vitro frente a quistes y trofozoítos de *Acanthamoeba* (291, 395). Así, para la misma concentración de PY que este estudio, 0.05%, se ha demostrado una eficacia en la eliminación de trofozoítos del 90%, >99.9% y en la eliminación de quistes del 85%, 90%-99.9% (291, 395). En esta tesis la eficacia de la solución de PY fue del 98% (100% con uso de limpiador) que se redujo al 83% con el aclarado con agua de grifo. Un factor a tener en cuenta es que los estudios in vitro mencionados están realizados sin LC, pudiendo variar su eficacia con su uso en las LC. Así, Walters et al (396) encontraron que la buena eficacia mostrada por la solución de PY en los experimentos sin LC, se reducía drásticamente en los ensayos con diferentes tipos de LC. Por el contrario, la solución con peróxido de hidrogeno mostró misma eficacia en los ensayos con y sin LC, siendo significativamente mayor que la PY en todos los casos. En la presente tesis, el uso del peróxido de hidrógeno mostró mejor eficacia que la PY cuando las LC fueron aclaradas previamente con agua de grifo.

Como conclusión el uso de la solución de povidona yodada mostró una alta eficacia frente *A.castellanii* siendo mayor que la solución única, pero menor que la solución de peróxido de hidrógeno 3% y Progent. El uso de un limpiador previo

asegura niveles de eficacia del 100% mientras que el aclarado sólo con agua de grifo reduce la eficacia al 83%.

- **Peróxido de hidrógeno**

En este estudio, se puede concluir, estadísticamente hablando, que la solución de peróxido de hidrógeno al 3% fue eficaz frente *A.castellanii* al no mostrar diferencias significativas frente al control negativo para ningún caso. Sin embargo, que no existan diferencias significativas frente al control negativo no significa que no haya presencia de algún resultado positivo. Esto tendría relevancia clínicamente ya que con que haya presencia de una ameba podría provocar la queratitis por *Acanthamoeba*. En base a ello, la solución de peróxido de hidrógeno se comportó igual al control negativo mostrando así una eficacia del 100% frente *A.castellanii* para todas las LC excepto para las lentes de hidrogel aclaradas previamente con agua de grifo que mostró diferencias frente al control negativo (aunque no significativas), por lo que una eficacia del 100% en este caso no se confirma.

La realización de los tratamientos previos de limpieza con el uso de un limpiador por un lado y con el aclarado sólo de las LC por otro, resultó en una eficacia del 100% y el 98% respectivamente. En base a los valores de Ct, el aclarado con agua de grifo mostró una disminución de la capacidad de limpieza respecto al uso de limpiador para las LC de hidrogel e hidrogel de silicona. Con el aclarado sólo con solución salina se obtuvo menor eficacia de limpieza que con el uso de limpiador+ aclarado con salina para la LC de hidrogel de silicona. La eficacia de la solución de peróxido de hidrógeno no mostró diferencias entre aclarar las LC con solución salina o con agua de grifo.

Como conclusión, el uso de agua de grifo o solución salina para aclarar las LC antes del uso de la solución de peróxido no cambia la eficacia del producto. Sin embargo, el uso de un limpiador mejora la eficacia del peróxido de hidrógeno frente al aclarado sólo de las LC. A pesar de ello, la solución de peróxido ha mostrado garantizar una efectividad alta frente *A.castellanii* del 100% y el 98% que lleva a pensar que el peróxido de hidrógeno tiene mucho poder desinfectante, siendo efectivo por sí sólo sin necesidad de tratamientos previos.

En las instrucciones de limpieza para el uso de las soluciones de peróxido de hidrógeno no está incluido el frotado y tratamiento de las lentes con otros productos previamente. Sin embargo, un estudio realizado por Cho et al. (397) señala que el uso de soluciones de peróxido de hidrógeno y povidona yodada sin un frotado previo con limpiador no elimina los depósitos persistentes de las lentes de contacto de ortoqueratología, por lo que podría ocurrir lo mismo en caso de adhesión de la ameba a la superficie de la lente y ser la razón de esa pequeña diferencia de positivos entre el uso del limpiador y el aclarado sólo de las LC.

En este estudio, la solución de peróxido de hidrógeno (de un solo paso) empleada utiliza un comprimido como catalizador y se recomienda dejar las LC con la solución de peróxido de hidrógeno un tiempo mínimo de 2 horas antes de su uso. Otras soluciones de peróxido de hidrógeno de un solo paso utilizan discos de platino como catalizadores y recomiendan otros tiempos para el proceso de neutralización. Estas diferencias en la metodología pueden llevar a resultados diferentes entre soluciones. En los sistemas de peróxido de un solo paso, el comprimido neutralizador se añade al mismo tiempo que la solución, esto hace que el tiempo de exposición al peróxido varíe según el tiempo que tarde en neutralizar. Así, cabe pensar que cuanto más progresiva

y larga en el tiempo sea la neutralización, más exposición al peróxido y por tanto mayor eficacia. Según la literatura científica la solución de peróxido de hidrógeno ha demostrado su efectividad frente a quistes de *Acanthamoeba* (T4) en un tiempo de exposición de 4 horas y 6 horas, aunque para trofozoítos, algunos concluyen que el tiempo necesario es menor (150, 158, 267, 398-401). En este estudio un tiempo de exposición de 2 horas mostró buenos resultados de eficacia frente *A.castellanii*. La qPCR empleada en este estudio para la valoración de la eficacia, detecta la presencia de material genético de ameba, por lo que no se puede distinguir la presencia de quistes o trofozoítos.

La solución de peróxido de hidrógeno mostró mayor eficacia frente *A.castellanii* que la solución única para todos los casos, resultados que son ampliamente respaldados en la literatura científica (267, 274, 396). En comparación con la solución de povidona yodada sólo mostró tener mayor eficacia de limpieza cuando la PY se usó el agua de grifo para el aclarado previo.

- **Progent**

El tratamiento con Progent, al igual que el peróxido de hidrógeno mostró una eficacia prácticamente del 100%. El uso del limpiador resultó en un 100% de eficacia contra *A.castellanii* frente al 98% que se obtuvo con el aclarado previo de las LC. El uso de un limpiador previo mostró mayor eficacia final en la limpieza frente *A. castellanii* en comparación con el aclarado sólo de las LC con solución salina para las LC de hidrogel de silicona y RPG. Respecto al aclarado previo con agua de grifo, el uso de limpiador mostró mayor eficacia en la limpieza de las LC de hidrogel de silicona.

El uso de la solución salina frente al agua de grifo para aclarar las lentes disminuyó la eficacia del sistema de limpieza frente *A.castellanii* para las LC de RPG.

El hipoclorito de sodio, componente activo del Progent, está indicado para la limpieza de proteínas de lentes RPG por ello, hay pocos estudios en relación con su eficacia frente a *Acanthamoeba*. En línea con lo resultados obtenidos, Coulon et al. (402) demostraron que el hipoclorito de sodio al 2.5% logró la eliminación completa de varias cepas de *A. castellanii* y *A.polyphaga*. Otro estudio in vitro de Vaerewijck et al. (403) encontraron que alrededor del 85% de los trofozoítos de *A. polyphaga* fueron dañados tras el contacto con hipoclorito de sodio de 50 mg de cloro/ litro durante 15 minutos.

En conclusión, en este estudio, la solución de Progent se comportó igual al control negativo mostrando así su eficacia frente *A.castellanii* para todos los casos. Sólo para las lentes de hidrogel aclaradas previamente con agua de grifo se obtuvieron diferencias frente al control negativo, por lo que su eficacia del 100% en este caso no se confirma. La eficacia del tratamiento de las LC con Progent no se ve influida por el aclarado con de agua de grifo o solución salina o el uso de limpiadores previos.

- **Clorhexidina**

El uso de clorhexidina 0.02% mostró una eficacia en la limpieza de ameba del 54% y 31% para el gen hsp70 y TPBF respectivamente. Actualmente, la clorhexidina en concentraciones de 0.02% se emplea para el tratamiento de la queratitis amebiana por lo que cabría esperar que los resultados de eficacia obtenidos en este trabajo hubiesen sido mejores.

En este estudio, las LC contaminadas con *A.castellanii* se dejaron 24 horas con la solución de clorhexidina 0.02%. Sin embargo, la literatura científica muestra que la eficacia in vitro de la clorhexidina 0.02% frente *A.castellanii* aumenta con el tiempo. Kadry et al.(404) encontraron una eficacia del 59% a las 24 h llegando al 76.3% a las 72 horas. Por otro lado, Padzik et al. (405) encontraron valores de eficacia menores, siendo del 16% a las 24 h y aumentando hasta un 60.4% a las 96 horas, momento en el que la eficacia frente a la ameba empezó a ser significativa. Además, también encontraron que la solución de povidona yodada al 0.5% mostró una eficacia mayor y más rápida en el tiempo que la clorhexidina. En la presente tesis, los resultados de eficacia obtenidos del 53% y 31% llaman la atención al ser comparados con los obtenidos con el resto de las soluciones de tratamiento cuya eficacia, en términos generales, fue mayor. Sin embargo, estos resultados están en la línea con los obtenidos en la literatura, y nos lleva a concluir, además, que si las LC se hubiesen dejado un tiempo mayor de 24 horas la eficacia obtenida hubiera sido mejor.

Por otro lado, en cuanto al uso de la clorhexidina 0.02% in vivo, muchos estudios concluyen que su uso en monoterapia de la QA es insuficiente y su eficacia es mayor cuando se usa en combinación con otros agentes (238, 406). Esto también nos puede llevar a interpretar que realmente la eficacia de la clorhexidina por sí sola no es del 100% como se puede llegar a pensar y los resultados de eficacia obtenidos en este estudio se ajustan más a la realidad. Así, su uso como control negativo en estudios comparativos no representaría una eficacia del 100%, pudiendo sobreestimar entonces la eficacia de otros tratamientos que se comparen.

2.3 MATERIAL DE LALENTE DE CONTACTO

En los resultados obtenidos de la PCR cuantitativa se encontraron algunas diferencias entre el tipo de material de las lentes. Entre los materiales de lentes usados, las lentes RPG fueron las que mostraron menor porcentaje de resultados positivos. Sólo se obtuvieron valores positivos en las lentes RPG que fueron aclaradas previamente con agua de grifo y conservadas en solución única multipropósito y povidona yodada. En el caso de la solución única, del 85% de resultados positivos obtenidos, sólo el 19% estuvo asociado a las lentes RPG y el 66% restante a las lentes de contacto blandas. Con la solución de povidona yodada, del 19% positivos obtenidos sólo el 2% fue debido a las lentes RPG. Observando los valores de Ct obtenidos al hacer PCR, las lentes RPG mostraron valores más elevados en comparación con los otros materiales para todos los casos lo que indica que la presencia de *A.castellanii* era menor. Esto puede ser debido, por un lado, a una buena efectividad de las soluciones de tratamiento que disminuyese la cantidad de ameba y por otro lado, también puede indicar que la ameba se adhiere mejor a las lentes blandas que al material RPG. Estudios previos confirman que *Acanthamoeba* tiene mayor afinidad por materiales de mayor contenido en agua (142, 144, 145). Así, el uso de lentes de contacto RPG parece conllevar menor riesgo de queratitis microbiana en comparación con el uso de lentes de hidrogel o de hidrogel de silicona (407). A pesar de ello, una de las preocupaciones asociadas al uso de las lentes RPG especialmente en usuarios de ortoqueratología, sigue siendo el riesgo de queratitis amebiana. Una de las posibles explicaciones es que las lentes de ortoqueratología ejercen una presión en el epitelio corneal provocando un adelgazamiento que altera su función de barrera e incrementa la probabilidad de infiltración corneal patógena (408, 409). Por otro lado, la tinción corneal es el efecto adverso más común en los usuarios de ortoqueratología (410,

411) pudiendo estar relacionado con esa alteración de la función barrera de la córnea, aunque no hay estudios al respecto. Por el contrario, en un estudio realizado por Yeh et al.(412) no se encontró alteración de la permeabilidad epitelial tras 30 días de uso de las lentes de ortoqueratología.

Otro posible factor de riesgo puede estar relacionado con los malos hábitos de higiene de las lentes RPG. Li et al. (413) encontraron que aproximadamente el 87.8% de los pacientes que utilizaban lentes de ortoqueratología en ese estudio aclaraban sus lentes con agua del grifo. Ya sea por comodidad, por decisión propia o por malos consejos de limpieza recibidos, los usuarios de lentes RPG son más propensos que los usuarios de lentes blandas a usar agua de grifo para aclarar o guardar las lentes y sigue considerándose uno de los factores de riesgo más comunes para el desarrollo de la QA (135, 414). Algunos sistemas de limpieza de las lentes de contacto RPG han incluido alguna vez en sus indicaciones el uso de agua del grifo para eliminar el limpiador de lentes (415) por lo que no es de extrañar que los usuarios de lentes RPG aclaren sus lentes con agua de grifo.

Entre las lentes de contacto blandas utilizadas en este estudio, los valores de Ct, así como el porcentaje de positivos y negativos obtenidos, fueron similares. Así, no se encontraron diferencias de limpieza entre los dos materiales para cada tratamiento. Estudios previos han mostrado una mayor adhesión de *Acanthamoeba* a las lentes de hidrogel de silicona de primera generación en comparación con las lentes de hidrogel (HEMA) o con las lentes de hidrogel de silicona de segunda o tercera generación (152, 153). Esto parece estar relacionado con las características de la superficie. Las lentes de hidrogel de silicona tienen un tratamiento superficial con plasma para reducir su hidrofobicidad. Además, entre las lentes de hidrogel de silicona, las de primera generación tienen una superficie más rugosa que permite la fijación de los trofozoítos

en comparación con las de segunda y tercera generación que tienen una superficie relativamente lisa (149) (151, 416). En este estudio se usó el material Comfilcon A como hidrogel de silicona, considerado de tercera generación y Ocufilecon D como hidrogel convencional. Giraldez et al. (416, 417) observaron mediante microscopía de fuerza atómica que el material Comfilcon A presenta una superficie de lente más lisa que las de segunda generación y que lentes de hidrogel Ocufilecon B. En base a esto, cabría esperar que inicialmente la ameba se uniese más al material de Ocufilecon D y por tanto los valores de Ct obtenidos fuesen más bajos en comparación con las lentes de hidrogel de silicona Comfilcon A, sin embargo, en este estudio no se obtuvieron diferencias significativas entre ambos materiales.

2.4 TIPO DE GEN USADO EN LA qPCR

Ambos genes han mostrado ser válidos para detección de *Acanthamoeba*, aunque muestran diferencias en su sensibilidad. Así, el gen hsp70 mostró mayor sensibilidad obteniendo más variabilidad de resultados frente al TPBF que dio muchos más valores indeterminados. Por otro lado, el gen hsp70 también dio lugar a más falsos positivos observados en el control negativo realizado.

Si observamos los resultados de la PCR cuantitativa según el tipo de gen analizado, se obtuvo, en general, mayor porcentaje de positivos para el gen hsp70 comparado con el TPBF. Abedkhozasteh et al. (418) encontraron una sobreexpresión del gen hsp70 en los trofozoítos. En base a esto, en los casos donde hubo más positivos para el gen hsp70 comparado con TPBF podría ser debido a una presencia mayor inicial de *Acanthamoeba* en estado de trofozoíto.

A continuación, de manera resumida se comentan algunas consideraciones generales a tener en cuenta a la hora de comparar los resultados obtenidos entre estudios existentes.

Aunque existen numerosos estudios para evaluar la eficacia frente *Acanthamoeba* de diferentes soluciones desinfectantes de LC, la variedad en la metodología dificulta la comparación entre ellos y puede llevar, en algunas ocasiones a conclusiones contradictorias. Esto es debido a que no hay un protocolo estandarizado para evaluar la eficacia de los productos de limpieza / mantenimiento de las LC frente a *Acanthamoeba*. Actualmente, existe la norma la norma ISO 14729, que unifica el método de valoración e interpretación de la eficacia de los productos de desinfección de las LC sin usar en los experimentos ni LC ni estuches (419) y la norma ISO 18259 (420) para la metodología con LC. Sin embargo, las directrices de estas normas exigen que se realicen pruebas de eficacia de los productos contra microorganismos específicos, pero no incluyen *Acanthamoeba*. Por otro lado, existe la norma ISO 19045:2015 que especifica un método para evaluar el potencial de los productos de desinfección de LC para inducir enquistamiento de las especies de *Acanthamoeba*.

Por ello, dada la falta de un protocolo estándar, a continuación, se comentan algunos factores que influyen en la obtención de diferentes conclusiones y que conviene tener en cuenta. Primero, el tipo de cepa de *Acanthamoeba* utilizada, ya que según su virulencia puede ser más o menos resistente a la solución de limpieza. La presencia de quistes o trofozoítos en la muestra, aunque la mayoría de los estudios, sabiendo que los quistes son más resistentes que los trofozoítos, analizan los resultados por separado, el grado de madurez de los quistes también influye en el proceso de eliminación. En este estudio, se detectó la presencia de material genético

de la ameba mediante qPCR, por ello, no podemos confirmar si la presencia de ameba se debe a la existencia de quistes o trofozoítos.

Las diferencias en las metodologías entre estudios, como la realización de los experimentos con LC o sin ellas, o el uso de distintos métodos para valorar la eficacia de las soluciones. Los métodos más usados para valorar la eficacia de limpieza son la realización de cultivo y el contaje de células viables. La norma ISO 14729 establece que las concentraciones iniciales de bacterias y hongos tras el uso de la solución de limpieza estudiada deben reducirse como mínimo un 99.9% y un 90% respectivamente, por lo que algunos estudios toman esos valores como referencia para *Acanthamoeba* también. En este estudio, mostraron una eficacia entre el 98%-100% la solución Progent, Povidona y Peróxido de Hidrógeno. La solución única sólo entra en ese rango de eficacia (96%) con el uso del limpiador previo.

3. LIMITACIONES Y PERSPECTIVA DE FUTURO

Como se ha comentado a lo largo de la tesis, la principal limitación de este trabajo se ha encontrado en la creación del sistema de detección con las nanopartículas de oro. La inestabilidad de las nanopartículas de oro hizo que su funcionalización y posterior detección del *target* requiriese de mucho tiempo. En base a esto y dada la sensibilidad del sistema resultante hace que se planteen futuros cambios en el desarrollo de este sistema. Uno de los estudios que se plantean es la utilización de métodos de amplificación de la señal, como el uso de la enzima endonucleasa, para la disminución del límite de detección. En este estudio no se usaron métodos de amplificación principalmente con el objetivo de desarrollar un sistema de detección lo más sencillo posible. También se podría valorar cambiar el sistema de detección en solución por hibridación en superficie para crear un ensayo en formato de flujo lateral.

En cuanto al estudio de la eficacia frente *A.castellanii* de las soluciones de limpieza, la metodología se ha diseñado simulando las mejores condiciones de limpieza. Sin embargo, la realidad es que no todos los usuarios de LC frotan las LC, o las aclaran previamente, por lo que otras condiciones de limpieza también podrían haberse incluido.

Otra vía de investigación abierta es la posible creación de otro sistema para detección de *Pseudomona Aeuruginosa* principal causante de las queratitis bacterianas.

VI. CONCLUSIONES

*

CONCLUSIONS

CONCLUSIONES

1. En la presente tesis se ha desarrollado un método para la detección de *Acanthamoeba* mediante el uso de nanopartículas de oro. Esta estrategia detecta de forma específica *A. castellanii* mediante una respuesta colorimétrica visible en pocos minutos. Así se ofrece un método alternativo a las técnicas actuales para la detección de manera sencilla y rápida.
 - 1.1. El análisis del cambio de color mediante las coordenadas RGB reduce el LoD 2.22 veces, permitiendo la detección de cantidades menores de *A. castellanii*.
2. El sistema de detección con AuNPs desarrollado no detectó la presencia de ameba tras el uso de sistemas de limpieza de LC frente a la realización de la PCR cuantitativa.
3. Dada la inestabilidad de las nanopartículas de oro y el LoD alto conseguido se limita su aplicación a nivel práctico siendo necesaria la búsqueda de estrategias de mejora del sistema.
4. Las sondas diseñadas en el estudio son válidas para la detección de *Acanthamoeba*. De este modo, la qPCR para la detección de ARN de *A. castellanii* a diferencia de las PCR tradicionales de detección de ADN, ofrecen un método más fiable para valorar si una muestra contiene *A. castellanii* viable y por tanto ser potencialmente patógena.

5. La valoración de la eficacia de los sistemas de limpieza / mantenimiento de las lentes de contacto mediante qPCR ofrece valores más fiables que los métodos de microscopía empleados actualmente.

6. Todas las soluciones de limpieza/ mantenimiento empleadas en el estudio mostraron tener algún tipo de efecto frente *Acanthamoeba*.
 - 6.1. La solución única-multipropósito mostró menos eficacia que la solución de peróxido de hidrógeno 3%, Progent y Povidona yodada.
 - 6.2. El uso de un limpiador como tratamiento previo de limpieza mejora la eficacia frente *A.castellanii* especialmente de la solución única-multipropósito.

CONCLUSIONS

1. A new method for *Acanthamoeba* detection using gold nanoparticles was developed in this thesis. This strategy is specific to detect *A. castellanii* using a visible colorimetric response in a few minutes, providing an easy and fast method comparing with the current techniques.
 - 1.1. The analysis of RGB coordinates, decreases the limit of detection 2.22-fold allowing to detect lower *A.castellanii* concentrations.
2. Unlike to the quantitative PCR technique, the AuNPs-based method did not detect amoeba after the use of contact lenses disinfection products.
3. According to the high LoD achieved by the method and the instability of the gold nanoparticles, the clinical application of the system is limited, being necessary to study more strategies to improve the system.
4. The designed probes are applicable for *Acanthamoeba detection*. Thus, qPCR based on *A.castellanii* RNA detection provides a more reliable technique to detect viable in a sample in compare with the traditional PCR technique for DNA detection.
5. The assessment of the efficacy in the cleaning/maintenance systems for contact lenses by qPCR provides more accurate results than currently used microscopy methods.
6. All the cleaning solutions analized in this study, all the cleaning solutions showed some effect against *A.castellanii*.

- 6.1. The multi-purpose solution showed less efficacy than the 3% hydrogen peroxide solution, Progent, and Povidone-iodine solutions.
- 6.2. A cleaning step before the use of other disinfectant solutions improves the cleaning of contact lenses, especially when the multi-purpose solution is used.

VII. REFERENCIAS

REFERENCIAS

1. Gipson IK. The ocular surface: the challenge to enable and protect vision: the Friedenwald lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(10):4390; 1-8.
 2. DelMonte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. *J Cataract Refract Surg.* 2011;37(3):588-98.
 3. Montés-Micó R. Role of the tear film in the optical quality of the human eye. *J Cataract Refract Surg.* 2007;33(9):1631-5.
 4. Zhou L, Huang LQ, Beuerman RW, Grigg ME, Li SF, Chew FT, et al. Proteomic analysis of human tears: defensin expression after ocular surface surgery. *J Proteome Res.* 2004;3(3):410-6.
 5. Tutt R, Bradley A, Begley C, Thibos LN. Optical and visual impact of tear break-up in human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(13):4117-23.
 6. Wolff E. The muco-cutaneous junction of the lidmargin and the distribution of the tear fluid. *Trans Ophthalmol Soc UK.* 1946;66:291-308.
 7. Pflugfelder SC, Stern ME. Biological functions of tear film. *Experimental eye research.* 2020;197:108115-.
 8. Gipson IK, Spurr-Michaud S, Tisdale A, Menon BB. Comparison of the transmembrane mucins MUC1 and MUC16 in epithelial barrier function. *PLoS One.* 2014;9(6):e100393.
 9. Pflugfelder SC, Liu Z, Monroy D, Li DQ, Carvajal ME, Price-Schiavi SA, et al. Detection of sialomucin complex (MUC4) in human ocular surface epithelium and tear fluid. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(6):1316-26.
 10. Spurr-Michaud S, Argüeso P, Gipson I. Assay of mucins in human tear fluid. *Experimental eye research.* 2007;84(5):939-50.
 11. Gipson IK, Argüeso P. Role of mucins in the function of the corneal and conjunctival epithelia. *Int Rev Cytol.* 2003;231:1-49.
 12. Jumblatt MM, McKenzie RW, Steele PS, Emberts CG, Jumblatt JE. MUC7 expression in the human lacrimal gland and conjunctiva. *Cornea.* 2003;22(1):41-5.
 13. Liu B, Rayment SA, Gyurko C, Oppenheim FG, Offner GD, Troxler RF. The recombinant N-terminal region of human salivary mucin MG2 (MUC7) contains a binding domain for oral Streptococci and exhibits candidacidal activity. *Biochem J.* 2000;345 Pt 3(Pt 3):557-64.
 14. Bron AJ, Tiffany JM, Gouveia SM, Yokoi N, Voon LW. Functional aspects of the tear film lipid layer. *Exp Eye Res.* 2004;78(3):347-60.
 15. Georgiev GA, Eftimov P, Yokoi N. Structure-function relationship of tear film lipid layer: A contemporary perspective. *Exp Eye Res.* 2017;163:17-28.
 16. Shumway CL, Motlagh M, Wade M. *Anatomy, Head and Neck, Eye Conjunctiva.* StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.; 2022.
17. García-Posadas L, Contreras-Ruiz L, Soriano-Romaní L, Dartt DA, Diebold Y. Conjunctival Goblet Cell Function: Effect of Contact Lens Wear and Cytokines. *Eye Contact Lens.* 2016;42(2):83-90.
 18. Swamynathan SK, Wells A. Conjunctival goblet cells: Ocular surface functions, disorders that affect them, and the potential for their regeneration. *Ocul Surf.* 2020;18(1):19-26.
 19. Eghrari AO, Riazuddin SA, Gottsch JD. Overview of the Cornea: Structure, Function, and Development. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2015;134:7-23.
 20. Oliveira-Soto L, Efron N. Morphology of corneal nerves using confocal microscopy. *Cornea.* 2001;20(4):374-84.
 21. Marfurt CF, Kingsley RE, Echtenkamp SE. Sensory and sympathetic innervation of the mammalian cornea. A retrograde tracing study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1989;30(3):461-72.
 22. Hanna C, Bicknell DS, O'Brien JE. Cell turnover in the adult human eye. *Arch Ophthalmol.* 1961;65:695-8.

23. Sridhar MS. Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian J Ophthalmol.* 2018;66(2):190-4.
24. Hay ED. Development of the vertebrate cornea. *Int Rev Cytol.* 1980;63:263-322.
25. Jacobsen IE, Jensen OA, Prause JU. Structure and composition of Bowman's membrane. Study by frozen resin cracking. *Acta Ophthalmol (Copenh).* 1984;62(1):39-53.
26. Lagali N, Germundsson J, Fagerholm P. The role of Bowman's layer in corneal regeneration after phototherapeutic keratectomy: a prospective study using in vivo confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(9):4192-8.
27. Marino GK, Santhiago MR, Santhanam A, Torricelli AAM, Wilson SE. Regeneration of Defective Epithelial Basement Membrane and Restoration of Corneal Transparency After Photorefractive Keratectomy. *J Refract Surg.* 2017;33(5):337-46.
28. Wilson SE. Bowman's layer in the cornea- structure and function and regeneration. *Exp Eye Res.* 2020;195:108033.
29. Hassell JR, Birk DE. The molecular basis of corneal transparency. *Exp Eye Res.* 2010;91(3):326-35.
30. Boote C, Dennis S, Newton RH, Puri H, Meek KM. Collagen fibrils appear more closely packed in the prepupillary cornea: optical and biomechanical implications. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(7):2941-8.
31. Meek KM, Boote C. The organization of collagen in the corneal stroma. *Exp Eye Res.* 2004;78(3):503-12.
32. Formisano N, van der Putten C, Grant R, Sahin G, Truckenmüller RK, Bouten CVC, et al. Mechanical Properties of Bioengineered Corneal Stroma. *Adv Healthc Mater.* 2021:e2100972.
33. Dua HS, Faraj LA, Said DG, Gray T, Lowe J. Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). *Ophthalmology.* 2013;120(9):1778-85.
34. de Oliveira RC, Wilson SE. Descemet's membrane development, structure, function and regeneration. *Exp Eye Res.* 2020;197:108090.
35. Wilson SE, Torricelli AAM, Marino GK. Corneal epithelial basement membrane: Structure, function and regeneration. *Exp Eye Res.* 2020;194:108002.
36. Gordon SR. Fibronectin antibody labels corneal stromal collagen fibrils in situ along their length and circumference and demonstrates distinct staining along the cell and stromal interfaces of Descemet's membrane. *Curr Eye Res.* 2014;39(3):312-6.
37. Shuttleworth CA. Type VIII collagen. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997;29(10):1145-8.
38. Saikia P, Medeiros CS, Thangavadivel S, Wilson SE. Basement membranes in the cornea and other organs that commonly develop fibrosis. *Cell Tissue Res.* 2018;374(3):439-53.
39. Senoo T, Joyce NC. Cell Cycle Kinetics in Corneal Endothelium from Old and Young Donors. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2000;41(3):660-7.
40. Nucci P, Brancato R, Mets MB, Shevell SK. Normal endothelial cell density range in childhood. *Arch Ophthalmol.* 1990;108(2):247-8.
41. Yee RW, Matsuda M, Schultz RO, Edelhauser HF. Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. *Curr Eye Res.* 1985;4(6):671-8.
42. Bourne WM. Biology of the corneal endothelium in health and disease. *Eye (Lond).* 2003;17(8):912-8.
43. Gambato C, Longhin E, Catania AG, Lazzarini D, Parrozzani R, Midena E. Aging and corneal layers: an in vivo corneal confocal microscopy study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2015;253(2):267-75.
44. Geroski DH, Matsuda M, Yee RW, Edelhauser HF. Pump function of the human corneal endothelium. Effects of age and cornea guttata. *Ophthalmology.* 1985;92(6):759-63.
45. Gupta PK, Berdahl JP, Chan CC, Rocha KM, Yeu E, Ayres B, et al. The corneal endothelium: clinical review of endothelial cell health and function. *J Cataract Refract Surg.* 2021;47(9):1218-26.
46. Meeney A, Mudhar HS. Histopathological reporting of corneal pathology by a biomedical scientist: the Sheffield Experience. *Eye (London, England).* 2013;27(2):272-6.

47. Flaxman SR, Bourne RRA, Resnikoff S, Ackland P, Braithwaite T, Cicinelli MV, et al. Global causes of blindness and distance vision impairment 1990-2020: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health*. 2017;5(12):e1221-e34.
48. Whitcher JP, Srinivasan M, Upadhyay MP. Corneal blindness: a global perspective. *Bull World Health Organ*. 2001;79(3):214-21.
49. Ung L, Bispo PJM, Shanbhag SS, Gilmore MS, Chodosh J. The persistent dilemma of microbial keratitis: Global burden, diagnosis, and antimicrobial resistance. *Survey of Ophthalmology*. 2019;64(3):255-71.
50. Green M, Apel A, Stapleton F. Risk factors and causative organisms in microbial keratitis. *Cornea*. 2008;27(1):22-7.
51. Khoo P, Cabrera-Aguas MP, Nguyen V, Lahra MM, Watson SL. Microbial keratitis in Sydney, Australia: risk factors, patient outcomes, and seasonal variation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2020;258(8):1745-55.
52. Dart JK, Stapleton F, Minassian D. Contact lenses and other risk factors in microbial keratitis. *Lancet*. 1991;338(8768):650-3.
53. Stapleton F, Keay L, Edwards K, Naduvilath T, Dart JK, Brian G, et al. The incidence of contact lens-related microbial keratitis in Australia. *Ophthalmology*. 2008;115(10):1655-62.
54. Watson S, Cabrera-Aguas M, Khoo P. Common eye infections. *Australian prescriber*. 2018;41(3):67-72.
55. Verma S, Singh A, Varshney A, Chandru RA, Acharya M, Rajput J, et al. Infectious Keratitis: An Update on Role of Epigenetics. *Frontiers in immunology*. 2021;12:765890-.
56. Hilliam Y, Kaye S, Winstanley C. *Pseudomonas aeruginosa* and microbial keratitis. *J Med Microbiol*. 2020;69(1):3-13.
57. Xie L, Zhong W, Shi W, Sun S. Spectrum of fungal keratitis in north China. *Ophthalmology*. 2006;113(11):1943-8.
58. Leck AK, Thomas PA, Hagan M, Kaliyamurthy J, Ackuaku E, John M, et al. Aetiology of suppurative corneal ulcers in Ghana and south India, and epidemiology of fungal keratitis. *Br J Ophthalmol*. 2002;86(11):1211-5.
59. Thomas PA, Kaliyamurthy J. Mycotic keratitis: epidemiology, diagnosis and management. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(3):210-20.
60. Cabrera-Aguas M, Khoo P, Watson SL. Infectious keratitis: A review. *Clin Exp Ophthalmol*. 2022.
61. Cao J, Yang Y, Yang W, Wu R, Xiao X, Yuan J, et al. Prevalence of infectious keratitis in Central China. *BMC ophthalmology*. 2014;14(1):1-6.
62. Song X, Xie L, Tan X, Wang Z, Yang Y, Yuan Y, et al. A multi-center, cross-sectional study on the burden of infectious keratitis in China. *PLoS One*. 2014;9(12):e113843.
63. Cariello AJ, Passos RM, Yu MC, Hofling-Lima AL. Microbial keratitis at a referral center in Brazil. *Int Ophthalmol*. 2011;31(3):197-204.
64. Nouredin GS, Sasaki S, Butler AL, Tilley P, Roscoe D, Lyons CJ, et al. Paediatric infectious keratitis at tertiary referral centres in Vancouver, Canada. *Br J Ophthalmol*. 2016;100(12):1714-8.
65. Wong VW, Lai TY, Chi SC, Lam DS. Pediatric ocular surface infections: a 5-year review of demographics, clinical features, risk factors, microbiological results, and treatment. *Cornea*. 2011;30(9):995-1002.
66. Kot K, Lanocha-Arendarczyk NA, Kosik-Bogacka DI. Amoebas from the genus *Acanthamoeba* and their pathogenic properties. *Ann Parasitol*. 2018;64(4):299-308.
67. Puschkarew BM. Über die Verbreitung der Süßwasser-Protozoen durch die Luft: Lippert; 1913.
68. Page FC. Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. *J Protozool*. 1967;14(4):709-24.
69. Castellani A. An amoeba found in culture of yeast: preliminary note. *J Trop Med Hyg*. 1930;33:160.
70. Douglas M. Notes on the classification of the amoeba found by Castellani in cultures of a yeast-like fungus. *J Trop Med London*. 1930;33(33):258-9.

71. Volkonsky M. *Hartmannella castellani* Douglas et classification des Hartmannelles. *Arc Zoolog Exp Gen.* 1931;72:317-9.
72. Culbertson CG, Smith JW, Minner JR. *Acanthamoeba*: observations on animal pathogenicity. *Science.* 1958;127(3313):1506.
73. Adl SM, Simpson AG, Lane CE, Lukeš J, Bass D, Bowser SS, et al. The revised classification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol.* 2012;59(5):429-93.
74. Pussard M, Pons R. Morphologies of the cystic wall and taxonomy of the genus *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica (Paris).* 1977;13:557-610.
75. Pussard M. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica.* 1977;13:557-98.
76. Lorenzo-Morales J, Khan NA, Walochnik J. An update on *Acanthamoeba keratitis*: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite (Paris, France).* 2015;22:10-.
77. Gast RJ, Ledee DR, Fuerst PA, Byers TJ. Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: four nuclear 18S rDNA sequence types. *J Eukaryot Microbiol.* 1996;43(6):498-504.
78. Stothard DR, Schroeder-Diedrich JM, Awwad MH, Gast RJ, Ledee DR, Rodriguez-Zaragoza S, et al. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *J Eukaryot Microbiol.* 1998;45(1):45-54.
79. Qvarnstrom Y, Nerad TA, Visvesvara GS. Characterization of a new pathogenic *Acanthamoeba* Species, *A. byersi* n. sp., isolated from a human with fatal amoebic encephalitis. *J Eukaryot Microbiol.* 2013;60(6):626-33.
80. Magnet A, Henriques-Gil N, Galván-Díaz AL, Izquierdo F, Fenoy S, del Aguila C. Novel *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type from an environmental isolate. *Parasitol Res.* 2014;113(8):2845-50.
81. Fuerst PA, Booton GC, Crary M. Phylogenetic analysis and the evolution of the 18S rRNA gene typing system of *Acanthamoeba*. *J Eukaryot Microbiol.* 2015;62(1):69-84.
82. Corsaro D, Venditti D. Phylogenetic evidence for a new genotype of *Acanthamoeba* (Amoebozoa, Acanthamoebida). *Parasitol Res.* 2010;107(1):233-8.
83. Hewett M, Robinson BS, Monis P, Saint C. Identification of a New *Acanthamoeba* 18S rRNA Gene Sequence Type, Corresponding to the Species *Acanthamoeba jacobsi* Sawyer, Nerad and Visvesvara, 1992 (Lobosea: Acanthamoebidae). *Acta Protozoologica.* 2003;42:325-9.
84. Horn M, Fritsche TR, Gautom RK, Schleifer KH, Wagner M. Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter caryophilus*. *Environ Microbiol.* 1999;1(4):357-67.
85. Nuprasert W, Putaporntip C, Pariyakanok L, Jongwutiwes S. Identification of a novel t17 genotype of *acanthamoeba* from environmental isolates and t10 genotype causing keratitis in Thailand. *J Clin Microbiol.* 2010;48(12):4636-40.
86. Fuerst PA, Booton GC. Species, Sequence Types and Alleles: Dissecting Genetic Variation in *Acanthamoeba*. *Pathogens.* 2020;9(7).
87. Putaporntip C, Kuamsab N, Nuprasert W, Rojrung R, Pattanawong U, Tia T, et al. Analysis of *Acanthamoeba* genotypes from public freshwater sources in Thailand reveals a new genotype, T23 *Acanthamoeba bangkokensis* sp. nov. *Scientific Reports.* 2021;11(1):17290.
88. Maciver SK, Asif M, Simmen MW, Lorenzo-Morales J. A systematic analysis of *Acanthamoeba* genotype frequency correlated with source and pathogenicity: T4 is confirmed as a pathogen-rich genotype. *Eur J Protistol.* 2013;49(2):217-21.
89. Bowers B, Korn ED. The fine structure of *Acanthamoeba castellanii*. I. The trophozoite. *J Cell Biol.* 1968;39(1):95-111.
90. Bowers B, Korn ED. Cytochemical identification of phosphatase activity in the contractile vacuole of *Acanthamoeba castellanii*. *J Cell Biol.* 1973;59(3):784-91.
91. Pal RA. The Osmoregulatory System of the Amoeba, *Acanthamoeba Castellanii*. *Journal of Experimental Biology.* 1972;57(1):55.
92. Lloyd D, Mellor H, Williams JL. Oxygen affinity of the respiratory chain of *Acanthamoeba castellanii*. *Biochem J.* 1983;214(1):47-51.

93. Turner NA, Biagini GA, Lloyd D. Anaerobiosis-induced differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiology Letters*. 1997;157(1):149-53.
94. Bowers B. Comparison of pinocytosis and phagocytosis in *Acanthamoeba castellanii*. *Exp Cell Res*. 1977;110(2):409-17.
95. Byers TJ. Growth, Reproduction, and Differentiation in *Acanthamoeba*. In: Bourne GH, Danielli JF, Jeon KW, editors. *International Review of Cytology*. 61: Academic Press; 1979. p. 283-338.
96. Bowers B, Korn ED. The fine structure of *Acanthamoeba castellanii* (Neff strain). II. Encystment. *J Cell Biol*. 1969;41(3):786-805.
97. Fouque E, Trouilhé MC, Thomas V, Hartemann P, Rodier MH, Héchard Y. Cellular, biochemical, and molecular changes during encystment of free-living amoebae. *Eukaryot Cell*. 2012;11(4):382-7.
98. Mazur T, Hadaś E, Iwanicka I. The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. *Trop Med Parasitol*. 1995;46(2):106-8.
99. Sriram R, Shoff M, Booton G, Fuerst P, Visvesvara GS. Survival of *Acanthamoeba* cysts after desiccation for more than 20 years. *Journal of clinical microbiology*. 2008;46(12):4045-8.
100. Krishna Murti CR, Shukla OP. Differentiation of pathogenic amoebae: encystation and excystation of *Acanthamoeba culbertsoni* — A model. *Journal of Biosciences*. 1984;6(4):475-89.
101. Carnt N, Stapleton F. Strategies for the prevention of contact lens-related *Acanthamoeba* keratitis: a review. *Ophthalmic Physiol Opt*. 2016;36(2):77-92.
102. (CDC) LloPHCCfDCaP. [Available from: <https://www.cdc.gov/dpdx/freelivingamebic/index.html>.
103. de Lacerda AG, Lira M. *Acanthamoeba* keratitis: A review of biology, pathophysiology and epidemiology. *Ophthalmic and Physiological Optics*. 2021;41(1):116-35.
104. Siddiqui R, Khan NA. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites & Vectors*. 2012;5(1):6.
105. Khan NA. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev*. 2006;30(4):564-95.
106. Marciano-Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16(2):273-307.
107. Rohr U, Weber S, Michel R, Selenka F, Wilhelm M. Comparison of free-living amoebae in hot water systems of hospitals with isolates from moist sanitary areas by identifying genera and determining temperature tolerance. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64(5):1822-4.
108. Sawyer TK, Visvesvara GS, Harke BA. Pathogenic amoebas from brackish and ocean sediments, with a description of *Acanthamoeba hatchetti*, n. sp. *Science*. 1977;196(4296):1324.
109. Brown TJ, Cursons RT, Keys EA. Amoebae from antarctic soil and water. *Appl Environ Microbiol*. 1982;44(2):491-3.
110. Visvesvara GS. Infections with free-living amebae. *Handb Clin Neurol*. 2013;114:153-68.
111. Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007;50(1):1-26.
112. Naginton J, Watson PG, Playfair TJ, McGill J, Jones BR, Steele AD. Amoebic infection of the eye. *Lancet*. 1974;2(7896):1537-40.
113. Samples JR, Binder PS, Luibel FJ, Font RL, Visvesvara GS, Peter CR. *Acanthamoeba* keratitis possibly acquired from a hot tub. *Arch Ophthalmol*. 1984;102(5):707-10.
114. Lorenzo-Morales J, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Arnalich-Montiel F, Piñero JE, Valladares B. *Acanthamoeba* keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide? *Trends Parasitol*. 2013;29(4):181-7.
115. Carvalho FR, Foronda AS, Mannis MJ, Höfling-Lima AL, Belfort R, Jr., de Freitas D. Twenty years of *acanthamoeba* keratitis. *Cornea*. 2009;28(5):516-9.
116. Agi J, Rocchetti TT, Yu MCZ, Farah ML, Ramos F, Freitas D, et al. Three Decades of Contact Lens-associated Microbial Keratitis in a Referral Hospital in São Paulo, Brazil. *Arq Bras Oftalmol*. 2021.
117. Radford CF, Minassian DC, Dart JK. *Acanthamoeba* keratitis in England and Wales: incidence, outcome, and risk factors. *Br J Ophthalmol*. 2002;86(5):536-42.

118. Tu EY. Acanthamoeba keratitis: a new normal. *American journal of ophthalmology*. 2014;158(3):417-9.
119. Yoder JS, Verani J, Heidman N, Hoppe-Bauer J, Alfonso EC, Miller D, et al. Acanthamoeba keratitis: the persistence of cases following a multistate outbreak. *Ophthalmic epidemiology*. 2012;19(4):221-5.
120. Seal DV. Acanthamoeba keratitis update-incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment. *Eye (Lond)*. 2003;17(8):893-905.
121. Chan TC, Li EY, Wong VW, Jhanji V. Orthokeratology-associated infectious keratitis in a tertiary care eye hospital in Hong Kong. *Am J Ophthalmol*. 2014;158(6):1130-5.e2.
122. Garg P, Kalra P, Joseph J. Non-contact lens related Acanthamoeba keratitis. *Indian J Ophthalmol*. 2017;65(11):1079-86.
123. Radford CF, Bacon AS, Dart JK, Minassian DC. Risk factors for acanthamoeba keratitis in contact lens users: a case-control study. *Bmj*. 1995;310(6994):1567-70.
124. Taher EE, Méabed EMH, Abdallah I, Abdel Wahed WY. Acanthamoeba keratitis in noncompliant soft contact lenses users: Genotyping and risk factors, a study from Cairo, Egypt. *J Infect Public Health*. 2018;11(3):377-83.
125. Gray TB, Cursons RT, Sherwan JF, Rose PR. Acanthamoeba, bacterial, and fungal contamination of contact lens storage cases. *Br J Ophthalmol*. 1995;79(6):601-5.
126. Brown AC, Ross J, Jones DB, Collier SA, Ayers TL, Hoekstra RM, et al. Risk Factors for Acanthamoeba Keratitis-A Multistate Case-Control Study, 2008-2011. *Eye Contact Lens*. 2018;44 Suppl 1:S173-s8.
127. Ibrahim YW, Boase DL, Cree IA. Factors Affecting the Epidemiology of Acanthamoeba Keratitis. *Ophthalmic Epidemiology*. 2007;14(2):53-60.
128. Jiang C, Sun X, Wang Z, Zhang Y. Acanthamoeba keratitis: clinical characteristics and management. *Ocul Surf*. 2015;13(2):164-8.
129. Sharma S, Garg P, Rao GN. Patient characteristics, diagnosis, and treatment of non-contact lens related Acanthamoeba keratitis. *Br J Ophthalmol*. 2000;84(10):1103-8.
130. Jain R, Garg P, Motukupally SR, Geary MB. Clinico-Microbiological Review of Non-Contact-Lens-Associated Acanthamoeba Keratitis. *Seminars in Ophthalmology*. 2015;30(4):281-8.
131. Bharathi MJ, Ramakrishnan R, Meenakshi R, Padmavathy S, Shivakumar C, Srinivasan M. Microbial keratitis in South India: influence of risk factors, climate, and geographical variation. *Ophthalmic epidemiology*. 2007;14(2):61-9.
132. Jain R, Garg P, Motukupally SR, Geary MB. Clinico-microbiological review of non-contact-lens-associated acanthamoeba keratitis. *Semin Ophthalmol*. 2015;30(4):281-8.
133. Ibrahim YW, Boase DL, Cree IA. How could contact lens wearers be at risk of Acanthamoeba infection? A review. *Journal of Optometry*. 2009;2(2):60-6.
134. de Lacerda AG, Lira M. Acanthamoeba keratitis: a review of biology, pathophysiology and epidemiology. *Ophthalmic Physiol Opt*. 2021;41(1):116-35.
135. Cope JR, Collier SA, Schein OD, Brown AC, Verani JR, Gallen R, et al. Acanthamoeba Keratitis among Rigid Gas Permeable Contact Lens Wearers in the United States, 2005 through 2011. *Ophthalmology*. 2016;123(7):1435-41.
136. McKelvie J, Patel D, McGhee C. Cosmetic contact lens-related Acanthamoeba keratitis. *Clin Exp Ophthalmol*. 37. Australia2009. p. 419-20.
137. Kuzman T, Kutija MB, Juri J, Jandroković S, Skegro I, Olujić SM, et al. Lens wearers non-compliance - is there an association with lens case contamination? *Cont Lens Anterior Eye*. 2014;37(2):99-105.
138. Niyyati M, Rahimi F, Lasejerdi Z, Rezaeian M. Potentially pathogenic free-living amoebae in contact lenses of the asymptomatic contact lens wearers. *Iran J Parasitol*. 2014;9(1):14-9.
139. Arance-Gil Á, Gutiérrez-Ortega ÁR, Villa-Collar C, Nieto-Bona A, Lopes-Ferreira D, González-Méijome JM. Corneal cross-linking for *Acanthamoeba* keratitis in an orthokeratology patient after swimming in contaminated water. *Contact Lens and Anterior Eye*. 2014;37(3):224-7.

140. Kelly LD, Long D, Mitra D. Quantitative comparison of *Acanthamoeba castellanii* adherence to rigid versus soft contact lenses. *Clao j.* 1995;21(2):111-3.
141. Scanzera AC, Tu EY, Joslin CE. *Acanthamoeba* Keratitis in Minors With Orthokeratology (OK) Lens Use: A Case Series. *Eye Contact Lens.* 2021;47(2):71-3.
142. Revere JF, Fromme R, Leippe M, Selhuber-Unkel C. In vitro adhesion of *Acanthamoeba castellanii* to soft contact lenses depends on water content and disinfection procedure. *Cont Lens Anterior Eye.* 2014;37(4):262-6.
143. Beattie TK, Tomlinson A. The effect of surface treatment of silicone hydrogel contact lenses on the attachment of *Acanthamoeba castellanii* trophozoites. *Eye Contact Lens.* 2009;35(6):316-9.
144. Seal DV, Bennett ES, McFadyen AK, Todd E, Tomlinson A. Differential adherence of *Acanthamoeba* to contact lenses: effects of material characteristics. *Optom Vis Sci.* 1995;72(1):23-8.
145. Kilvington S, Larkin DF. *Acanthamoeba* adherence to contact lenses and removal by cleaning agents. *Eye (Lond).* 1990;4 (Pt 4):589-93.
146. Gorlin AI, Gabriel MM, Wilson LA, Ahearn DG. Binding of *Acanthamoeba* to hydrogel contact lenses. *Curr Eye Res.* 1996;15(2):151-5.
147. Lee GH, Yu HS, Lee JE. Effects of multipurpose solutions on the adhesion of *Acanthamoeba* to rigid gas permeable contact lenses. *Ophthalmic Physiol Opt.* 2016;36(2):93-9.
148. Chan KY, Cho P, Boost M. Microbial adherence to cosmetic contact lenses. *Cont Lens Anterior Eye.* 2014;37(4):267-72.
149. Omaña-Molina MA, González-Robles A, Salazar-Villatoro L, Bernal-Escobar A, Durán-Díaz A, Méndez-Cruz AR, et al. Silicone hydrogel contact lenses surface promote *Acanthamoeba castellanii* trophozoites adherence: qualitative and quantitative analysis. *Eye Contact Lens.* 2014;40(3):132-9.
150. Kilvington S, Anger C. A comparison of cyst age and assay method of the efficacy of contact lens disinfectants against *Acanthamoeba*. *Br J Ophthalmol.* 2001;85(3):336-40.
151. Lee GH, Lee JE, Park MK, Yu HS. Adhesion of *Acanthamoeba* on Silicone Hydrogel Contact Lenses. *Cornea.* 2016;35(5):663-8.
152. Beattie TK, Tomlinson A, McFadyen AK. Attachment of *Acanthamoeba* to first- and second-generation silicone hydrogel contact lenses. *Ophthalmology.* 2006;113(1):117-25.
153. Beattie TK, Tomlinson A, McFadyen AK, Seal DV, Grimason AM. Enhanced attachment of *Acanthamoeba* to extended-wear silicone hydrogel contact lenses: a new risk factor for infection? *Ophthalmology.* 2003;110(4):765-71.
154. Preston TM, King CA. Amoeboid locomotion of *Acanthamoeba castellanii* with special reference to cell-substratum interactions. *J Gen Microbiol.* 1984;130(9):2317-23.
155. John T, Desai D, Sahm D. Adherence of *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites to unworn soft contact lenses. *Am J Ophthalmol.* 1989;108(6):658-64.
156. Xuguang S, Lin C, Yan Z, Zhiqun W, Ran L, Shiyun L, et al. *Acanthamoeba* keratitis as a complication of orthokeratology. *American journal of ophthalmology.* 2003;136(6):1159-61.
157. Mowrey-McKee M, George M. Contact lens solution efficacy against *Acanthamoeba castellanii*. *Eye Contact Lens.* 2007;33(5):211-5.
158. Hughes R, Kilvington S. Comparison of hydrogen peroxide contact lens disinfection systems and solutions against *Acanthamoeba polyphaga*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(7):2038-43.
159. Joslin CE, Tu EY, Shoff ME, Booton GC, Fuerst PA, McMahan TT, et al. The association of contact lens solution use and *Acanthamoeba* keratitis. *Am J Ophthalmol.* 2007;144(2):169-80.
160. Borazjani RN, Kilvington S. Efficacy of multipurpose solutions against *Acanthamoeba* species. *Cont Lens Anterior Eye.* 2005;28(4):169-75.
161. de Aguiar AP, de Oliveira Silveira C, Todero Winck MA, Rott MB. Susceptibility of *Acanthamoeba* to multipurpose lens-cleaning solutions. *Acta Parasitol.* 2013;58(3):304-8.
162. Hiti K, Walochnik J, Maria Haller-Schober E, Faschinger C, Aspöck H. Efficacy of contact lens storage solutions against different *Acanthamoeba* strains. *Cornea.* 2006;25(4):423-7.
163. Szentmáry N, Daas L, Shi L, Laurik KL, Lepper S, Milioti G, et al. *Acanthamoeba* keratitis - Clinical signs, differential diagnosis and treatment. *Journal of current ophthalmology.* 2018;31(1):16-23.

164. Kelley PS, Dossey AP, Patel D, Whitson JT, Hogan RN, Cavanagh HD. Secondary glaucoma associated with advanced acanthamoeba keratitis. *Eye & contact lens*. 2006;32(4):178-82.
165. Herz NL, Matoba AY, Wilhelmus KR. Rapidly progressive cataract and iris atrophy during treatment of Acanthamoeba keratitis. *Ophthalmology*. 2008;115(5):866-9.
166. Lang SJ, Böhringer D, Reinhard T. [Necrotizing scleritis after acanthamoeba keratitis]. *Ophthalmologie*. 2021;118(1):50-2.
167. Ehlers N, Hjortdal J. Are cataract and iris atrophy toxic complications of medical treatment of acanthamoeba keratitis? *Acta Ophthalmol Scand*. 2004;82(2):228-31.
168. Varacalli G, Di Zazzo A, Mori T, Dohlman TH, Spelta S, Coassin M, et al. Challenges in Acanthamoeba Keratitis: A Review. *J Clin Med*. 2021;10(5).
169. Garate M, Cao Z, Bateman E, Panjwani N. Cloning and characterization of a novel mannose-binding protein of Acanthamoeba. *J Biol Chem*. 2004;279(28):29849-56.
170. Rocha-Azevedo BD, Jamerson M, Cabral GA, Silva-Filho FC, Marciano-Cabral F. Acanthamoeba interaction with extracellular matrix glycoproteins: biological and biochemical characterization and role in cytotoxicity and invasiveness. *J Eukaryot Microbiol*. 2009;56(3):270-8.
171. van Klink F, Alizadeh H, He Y, Mellon JA, Silvany RE, McCulley JP, et al. The role of contact lenses, trauma, and Langerhans cells in a Chinese hamster model of Acanthamoeba keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1993;34(6):1937-44.
172. Jaison PL, Cao Z, Panjwani N. Binding of Acanthamoeba to [corrected] mannose-glycoproteins of corneal epithelium: effect of injury. *Curr Eye Res*. 1998;17(8):770-6.
173. Taylor WM, Pidherney MS, Alizadeh H, Niederkorn JY. In vitro characterization of Acanthamoeba *castellanii* cytopathic effect. *J Parasitol*. 1995;81(4):603-9.
174. Sissons J, Alsam S, Jayasekera S, Khan NA. Ecto-ATPases of clinical and non-clinical isolates of Acanthamoeba. *Microb Pathog*. 2004;37(5):231-9.
175. Hurt M, Niederkorn J, Alizadeh H. Effects of mannose on Acanthamoeba *castellanii* proliferation and cytolytic ability to corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(8):3424-31.
176. Hurt M, Neelam S, Niederkorn J, Alizadeh H. Pathogenic Acanthamoeba spp secrete a mannose-induced cytolytic protein that correlates with the ability to cause disease. *Infection and immunity*. 2003;71(11):6243-55.
177. Leher H, Silvany R, Alizadeh H, Huang J, Niederkorn JY. Mannose induces the release of cytopathic factors from Acanthamoeba *castellanii*. *Infect Immun*. 1998;66(1):5-10.
178. Khan NA. Pathogenicity, morphology, and differentiation of Acanthamoeba. *Curr Microbiol*. 2001;43(6):391-5.
179. Rocha-Azevedo B, Jamerson M, Cabral GA, Marciano-Cabral F. Acanthamoeba culbertsoni: analysis of amoebic adhesion and invasion on extracellular matrix components collagen I and laminin-1. *Exp Parasitol*. 2010;126(1):79-84.
180. He YG, Niederkorn JY, McCulley JP, Stewart GL, Meyer DR, Silvany R, et al. In vivo and in vitro collagenolytic activity of Acanthamoeba *castellanii*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1990;31(11):2235-40.
181. Berman MB. Regulation of corneal fibroblast MMP-1 collagenase secretion by plasmin. *Cornea*. 1993;12(5):420-32.
182. Mitra MM, Alizadeh H, Gerard RD, Niederkorn JY. Characterization of a plasminogen activator produced by Acanthamoeba *castellanii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1995;73(1):157-64.
183. Sivak JM, Fini ME. MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology. *Prog Retin Eye Res*. 2002;21(1):1-14.
184. McDonnell S, Morgan M, Lynch C. Role of matrix metalloproteinases in normal and disease processes. *Biochem Soc Trans*. 1999;27(4):734-40.
185. Johns KJ, O'Day DM, Feman SS. Chorioretinitis in the contralateral eye of a patient with Acanthamoeba keratitis. *Ophthalmology*. 1988;95(5):635-9.
186. Heffler KF, Eckhardt TJ, Reboli AC, Stieritz D. Acanthamoeba endophthalmitis in acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Ophthalmol*. 1996;122(4):584-6.

187. Moshari A, McLean IW, Dodds MT, Damiano RE, McEvoy PL. Chorioretinitis after keratitis caused by *Acanthamoeba*: case report and review of the literature. *Ophthalmology*. 2001;108(12):2232-6.
188. Clarke DW, Alizadeh H, Niederkorn JY. Failure of *Acanthamoeba castellanii* to produce intraocular infections. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(7):2472-8.
189. Pidherney MS, Alizadeh H, Stewart GL, McCulley JP, Niederkorn JY. In vitro and in vivo tumoricidal properties of a pathogenic/free-living amoeba. *Cancer Lett*. 1993;72(1-2):91-8.
190. Pettit DA, Williamson J, Cabral GA, Marciano-Cabral F. In vitro destruction of nerve cell cultures by *Acanthamoeba* spp.: a transmission and scanning electron microscopy study. *J Parasitol*. 1996;82(5):769-77.
191. Clarke DW, Niederkorn JY. The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. *Trends Parasitol*. 2006;22(4):175-80.
192. Cursons RT, Brown TJ, Keys EA, Moriarty KM, Till D. Immunity to pathogenic free-living amoebae: role of cell-mediated immunity. *Infect Immun*. 1980;29(2):408-10.
193. Cursons RT, Brown TJ, Keys EA, Moriarty KM, Till D. Immunity to pathogenic free-living amoebae: role of humoral antibody. *Infection and immunity*. 1980;29(2):401-7.
194. Hurt M, Apte S, Leher H, Howard K, Niederkorn J, Alizadeh H. Exacerbation of *Acanthamoeba* keratitis in animals treated with anti-macrophage inflammatory protein 2 or antineutrophil antibodies. *Infect Immun*. 2001;69(5):2988-95.
195. Marciano-Cabral F, Toney DM. The interaction of *Acanthamoeba* spp. with activated macrophages and with macrophage cell lines. *J Eukaryot Microbiol*. 1998;45(4):452-8.
196. Stewart GL, Kim I, Shupe K, Alizadeh H, Silvany R, McCulley JP, et al. Chemotactic response of macrophages to *Acanthamoeba castellanii* antigen and antibody-dependent macrophage-mediated killing of the parasite. *J Parasitol*. 1992;78(5):849-55.
197. Stewart GL, Shupe K, Kim I, Silvany RE, Alizadeh H, McCulley JP, et al. Antibody-dependent neutrophil-mediated killing of *Acanthamoeba castellanii*. *Int J Parasitol*. 1994;24(5):739-42.
198. Hurt M, Proy V, Niederkorn JY, Alizadeh H. The interaction of *Acanthamoeba castellanii* cysts with macrophages and neutrophils. *J Parasitol*. 2003;89(3):565-72.
199. Walochnik J, Obwaller A, Haller-Schober EM, Aspöck H. Anti-*Acanthamoeba* IgG, IgM, and IgA immunoreactivities in correlation to strain pathogenicity. *Parasitol Res*. 2001;87(8):651-6.
200. Van Klink F, Leher H, Jager MJ, Alizadeh H, Taylor W, Niederkorn JY. Systemic immune response to *Acanthamoeba* keratitis in the Chinese hamster. *Ocul Immunol Inflamm*. 1997;5(4):235-44.
201. Leher H, Kinoshita K, Alizadeh H, Zaragoza FL, He Y, Niederkorn J. Impact of oral immunization with *Acanthamoeba* antigens on parasite adhesion and corneal infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39(12):2337-43.
202. Leher H, Zaragoza F, Taherzadeh S, Alizadeh H, Niederkorn JY. Monoclonal IgA antibodies protect against *Acanthamoeba* keratitis. *Exp Eye Res*. 1999;69(1):75-84.
203. Leher HF, Alizadeh H, Taylor WM, Shea AS, Silvany RS, Van Klink F, et al. Role of mucosal IgA in the resistance to *Acanthamoeba* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39(13):2666-73.
204. Alizadeh H, Apte S, El-Agha MS, Li L, Hurt M, Howard K, et al. Tear IgA and serum IgG antibodies against *Acanthamoeba* in patients with *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea*. 2001;20(6):622-7.
205. Kong HH, Kim TH, Chung DI. Purification and characterization of a secretory serine proteinase of *Acanthamoeba* healyi isolated from GAE. *J Parasitol*. 2000;86(1):12-7.
206. Martín-Pérez T, Criado-Fornelio A, Martínez J, Blanco MA, Fuentes I, Pérez-Serrano J. Isolation and molecular characterization of *Acanthamoeba* from patients with keratitis in Spain. *Eur J Protistol*. 2017;61(Pt A):244-52.
207. Rus H, Cudrici C, Niculescu F. The role of the complement system in innate immunity. *Immunol Res*. 2005;33(2):103-12.
208. Carroll MC. A protective role for innate immunity in autoimmune disease. *Clin Immunol*. 2000;95(1 Pt 2):S30-8.
209. Ferrante A, Rowan-Kelly B. Activation of the alternative pathway of complement by *Acanthamoeba culbertsoni*. *Clin Exp Immunol*. 1983;54(2):477-85.

210. Bora NS, Gobleman CL, Atkinson JP, Pepose JS, Kaplan HJ. Differential expression of the complement regulatory proteins in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993;34(13):3579-84.
211. Toney DM, Marciano-Cabral F. Resistance of *Acanthamoeba* species to complement lysis. *J Parasitol.* 1998;84(2):338-44.
212. Whiteman LY, Marciano-Cabral F. Resistance of highly pathogenic *Naegleria fowleri* amoebae to complement-mediated lysis. *Infect Immun.* 1989;57(12):3869-75.
213. Tu EY, Joslin CE, Sugar J, Shoff ME, Booton GC. Prognostic factors affecting visual outcome in *Acanthamoeba* keratitis. *Ophthalmology.* 2008;115(11):1998-2003.
214. Bacon AS, Dart JK, Ficker LA, Matheson MM, Wright P. *Acanthamoeba* keratitis. The value of early diagnosis. *Ophthalmology.* 1993;100(8):1238-43.
215. Claerhout I, Goegebuer A, Van Den Broecke C, Kestelyn P. Delay in diagnosis and outcome of *Acanthamoeba* keratitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2004;242(8):648-53.
216. Goh JWY, Harrison R, Hau S, Alexander CL, Tole DM, Avadhanam VS. Comparison of In Vivo Confocal Microscopy, PCR and Culture of Corneal Scrapes in the Diagnosis of *Acanthamoeba* Keratitis. *Cornea.* 2018;37(4):480-5.
217. Yera H, Ok V, Lee Koy Kuet F, Dahane N, Arie F, Hasseine L, et al. PCR and culture for diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *Br J Ophthalmol.* 2020.
218. Grossniklaus HE, Waring GOt, Akor C, Castellano-Sanchez AA, Bennett K. Evaluation of hematoxylin and eosin and special stains for the detection of *acanthamoeba* keratitis in penetrating keratoplasties. *Am J Ophthalmol.* 2003;136(3):520-6.
219. Wilhelmus KR, Osato MS, Font RL, Robinson NM, Jones DB. Rapid diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis using calcofluor white. *Arch Ophthalmol.* 1986;104(9):1309-12.
220. Marines HM, Osato MS, Font RL. The value of calcofluor white in the diagnosis of mycotic and *Acanthamoeba* infections of the eye and ocular adnexa. *Ophthalmology.* 1987;94(1):23-6.
221. Epstein RJ, Wilson LA, Visvesvara GS, Plourde EG, Jr. Rapid diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis from corneal scrapings using indirect fluorescent antibody staining. *Arch Ophthalmol.* 1986;104(9):1318-21.
222. Hahn TW, O'Brien TP, Sah WJ, Kim JH. Acridine orange staining for rapid diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *Jpn J Ophthalmol.* 1998;42(2):108-14.
223. Pfister DR, Cameron JD, Krachmer JH, Holland EJ. Confocal microscopy findings of *Acanthamoeba* keratitis. *Am J Ophthalmol.* 1996;121(2):119-28.
224. Vaddavalli PK, Garg P, Sharma S, Sangwan VS, Rao GN, Thomas R. Role of confocal microscopy in the diagnosis of fungal and *acanthamoeba* keratitis. *Ophthalmology.* 2011;118(1):29-35.
225. Wang YE, Tepelus TC, Vickers LA, Baghdasaryan E, Gui W, Huang P, et al. Role of in vivo confocal microscopy in the diagnosis of infectious keratitis. *Int Ophthalmol.* 2019;39(12):2865-74.
226. Füst Á, Tóth J, Simon G, Imre L, Nagy ZZ. Specificity of in vivo confocal cornea microscopy in *Acanthamoeba* keratitis. *Eur J Ophthalmol.* 2017;27(1):10-5.
227. Tu EY, Joslin CE, Sugar J, Booton GC, Shoff ME, Fuerst PA. The relative value of confocal microscopy and superficial corneal scrapings in the diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea.* 2008;27(7):764-72.
228. Lehmann OJ, Green SM, Morlet N, Kilvington S, Keys MF, Matheson MM, et al. Polymerase chain reaction analysis of corneal epithelial and tear samples in the diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39(7):1261-5.
229. Weekers PH, Bodelier PL, Wijen JP, Vogels GD. Effects of Grazing by the Free-Living Soil Amoebae *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga*, and *Hartmannella vermiformis* on Various Bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1993;59(7):2317-9.
230. Sawada Y, Yuan C, Huang AJ. Impression cytology in the diagnosis of *acanthamoeba* keratitis with surface involvement. *Am J Ophthalmol.* 2004;137(2):323-8.
231. Rezaei Kanavi M, Hosseini B, Javadi F, Rakhshani N, Javadi MA. Impression cytology in eyes with clinical and confocal scan features of *acanthamoeba* keratitis. *J Ophthalmic Vis Res.* 2013;8(3):207-12.

232. Patel SP, Schaefer JL, Jaber R, Paterson J, Liu W, Gonzalez-Fernandez F. The Value of Cytology Smears for Acanthamoeba Keratitis. *Case Rep Ophthalmol Med.* 2016;2016:4148968.
233. Yamazaki N, Kobayashi A, Yokogawa H, Ishibashi Y, Oikawa Y, Tokoro M, et al. In vivo imaging of radial keratoneuritis in patients with Acanthamoeba keratitis by anterior-segment optical coherence tomography. *Ophthalmology.* 2014;121(11):2153-8.
234. Khunkitti W, Lloyd D, Furr JR, Russell AD. The lethal effects of biguanides on cysts and trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*. *J Appl Bacteriol.* 1996;81(1):73-7.
235. Larkin DF, Kilvington S, Dart JK. Treatment of Acanthamoeba keratitis with polyhexamethylene biguanide. *Ophthalmology.* 1992;99(2):185-91.
236. Papa V, van der Meulen I, Rottey S, Sallet G, Overweel J, Asero N, et al. Safety and tolerability of topical polyhexamethylene biguanide: a randomised clinical trial in healthy adult volunteers. *Br J Ophthalmol.* 2020.
237. Clarke B, Sinha A, Parmar DN, Sykakis E. Advances in the diagnosis and treatment of acanthamoeba keratitis. *J Ophthalmol.* 2012;2012:484892.
238. Hay J, Kirkness CM, Seal DV, Wright P. Drug resistance and Acanthamoeba keratitis: the quest for alternative antiprotozoal chemotherapy. *Eye (Lond).* 1994;8 (Pt 5):555-63.
239. Perrine D, Chenu JP, Georges P, Lancelot JC, Saturnino C, Robba M. Amoebicidal efficiencies of various diamidines against two strains of Acanthamoeba polyphaga. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(2):339-42.
240. Hughes R, Dart J, Kilvington S. Activity of the amidoamine myristamidopropyl dimethylamine against keratitis pathogens. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51(6):1415-8.
241. Cohen EJ, Parlato CJ, Arentsen JJ, Genvert GI, Eagle RC, Jr., Wieland MR, et al. Medical and surgical treatment of Acanthamoeba keratitis. *Am J Ophthalmol.* 1987;103(5):615-25.
242. Bang S, Edell E, Eghrari AO, Gottsch JD. Treatment with voriconazole in 3 eyes with resistant Acanthamoeba keratitis. *Am J Ophthalmol.* 2010;149(1):66-9.
243. Tu EY, Joslin CE, Shoff ME. Successful treatment of chronic stromal acanthamoeba keratitis with oral voriconazole monotherapy. *Cornea.* 2010;29(9):1066-8.
244. Murthy S, Hawksworth NR, Cree I. Progressive ulcerative keratitis related to the use of topical chlorhexidine gluconate (0.02%). *Cornea.* 2002;21(2):237-9.
245. Wouters KA, Verhoekx JS, van Rooij J, Wubbels R, van Goor AT. Topical corticosteroids in Acanthamoeba keratitis: Friend or foe? *Eur J Ophthalmol.* 2020:1120672120973606.
246. McClellan K, Howard K, Niederkorn JY, Alizadeh H. Effect of steroids on Acanthamoeba cysts and trophozoites. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(12):2885-93.
247. Kitzmann AS, Goins KM, Sutphin JE, Wagoner MD. Keratoplasty for treatment of Acanthamoeba keratitis. *Ophthalmology.* 2009;116(5):864-9.
248. Nguyen TH, Weisenthal RW, Florakis GJ, Reidy JJ, Gaster RN, Tom D. Penetrating keratoplasty in active Acanthamoeba keratitis. *Cornea.* 2010;29(9):1000-4.
249. Parthasarathy A, Tan DT. Deep lamellar keratoplasty for acanthamoeba keratitis. *Cornea.* 2007;26(8):1021-3.
250. Blackman HJ, Rao NA, Lemp MA, Visvesvara GS. Acanthamoeba keratitis successfully treated with penetrating keratoplasty: suggested immunogenic mechanisms of action. *Cornea.* 1984;3(2):125-30.
251. Seitz B, Resch MD, Schlötzer-Schrehardt U, Hofmann-Rummelt C, Sauer R, Kruse FE. Histopathology and ultrastructure of human corneas after amniotic membrane transplantation. *Arch Ophthalmol.* 2006;124(10):1487-90.
252. Abdulhalim BE, Wagih MM, Gad AA, Boghdadi G, Nagy RR. Amniotic membrane graft to conjunctival flap in treatment of non-viral resistant infectious keratitis: a randomised clinical study. *Br J Ophthalmol.* 2015;99(1):59-63.
253. Garduño-Vieyra L, Gonzalez-Sanchez CR, Hernandez-Da Mota SE. Ultraviolet-a light and riboflavin therapy for acanthamoeba keratitis: a case report. *Case Rep Ophthalmol.* 2011. p. 291-5.

254. Khan YA, Kashiwabuchi RT, Martins SA, Castro-Combs JM, Kalyani S, Stanley P, et al. Riboflavin and Ultraviolet Light A Therapy as an Adjuvant Treatment for Medically Refractive *Acanthamoeba* Keratitis: Report of 3 Cases. *Ophthalmology*. 2011;118(2):324-31.
255. Hager T, Hasenfus A, Stachon T, Seitz B, Szentmáry N. *Crosslinking* and corneal cryotherapy in *acanthamoeba* keratitis -- a histological study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2016;254(1):149-53.
256. Meisler DM, Ludwig IH, Rutherford I, Bican FE, Langston RH, Visvesvara GS. Susceptibility of *Acanthamoeba* to cryotherapeutic method. *Arch Ophthalmol*. 1986;104(1):130-1.
257. Binder PS. Cryotherapy for medically unresponsive *acanthamoeba* keratitis. *Cornea*. 1989;8(2):106-14.
258. Matoba AY, Pare PD, Le TD, Osato MS. The effects of freezing and antibiotics on the viability of *Acanthamoeba* cysts. *Arch Ophthalmol*. 1989;107(3):439-40.
259. Bergan T, Klaveness J, Aasen AJ. Chelating agents. *Chemotherapy*. 2001;47(1):10-4.
260. Pastor-Nieto M-A, González-Muñoz P, Pérez-Mesonero R, Melgar-Molero V, Pastor-Nieto M-B, Zarallo-Gallardo J, et al. Allergic contact dermatitis caused by poly (hexamethylene) biguanide hydrochloride in contact lens care solutions. *Contact dermatitis*. 2017;76(6):373-6.
261. Shih KL, Raad MK, Hu JC, Gresh WJ, Jiries SI, Caldwell LJ, et al. Disinfecting activities of non-peroxide soft contact lens cold disinfection solutions. *The CLAO Journal: Official Publication of the Contact Lens Association of Ophthalmologists, Inc*. 1991;17(3):165-8.
262. Silvano RE, Dougherty JM, McCulley JP, Wood TS, Bowman RW, Moore MB. The effect of currently available contact lens disinfection systems on *Acanthamoeba castellanii* and *Acanthamoeba polyphaga*. *Ophthalmology*. 1990;97(3):286-90.
263. Sowlati-Hashjin S, Carbone P, Karttunen M. Insights into the Polyhexamethylene Biguanide (PHMB) Mechanism of Action on Bacterial Membrane and DNA: A Molecular Dynamics Study. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2020;124(22):4487-97.
264. Parment PA, Colucci B, Nyström B. The efficacy of soft contact lens disinfection solutions against *Serratia marcescens* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Ophthalmol Scand*. 1996;74(3):235-7.
265. Cano-Parra J, Bueno-Gimeno I, Lainez B, Córdoba J, Montés-Micó R. Antibacterial and antifungal effects of soft contact lens disinfection solutions. *Contact Lens and Anterior Eye*. 1999;22(3):83-6.
266. Boost MV, Shi GS, Lai S, Cho P. Amoebicidal effects of contact lens disinfecting solutions. *Optom Vis Sci*. 2012;89(1):44-51.
267. Johnston SP, Sriram R, Qvarnstrom Y, Roy S, Verani J, Yoder J, et al. Resistance of *Acanthamoeba* cysts to disinfection in multiple contact lens solutions. *Journal of clinical microbiology*. 2009;47(7):2040-5.
268. Bradley CS, Sicks LA, Pucker AD. Common Ophthalmic Preservatives in Soft Contact Lens Care Products: Benefits, Complications, and a Comparison to Non-Preserved Solutions. *Clinical optometry*. 2021;13:271-85.
269. Buck SL, Rosenthal RA, Schlech BA. Amoebicidal activity of multipurpose contact lens solutions. *Eye Contact Lens*. 2005;31(2):62-6.
270. Buck SL, Rosenthal RA, Abshire RL. Amoebicidal activity of a preserved contact lens multipurpose disinfecting solution compared to a disinfection/neutralisation peroxide system. *Contact Lens Anterior Eye*. 1998;21(3):81-4.
271. Zanetti S, Fiori PL, Pinna A, Usai S, Carta F, Fadda G. Susceptibility of *Acanthamoeba castellanii* to contact lens disinfecting solutions. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(7):1596-8.
272. Silvano RE, Dougherty JM, McCulley JP. Effect of contact lens preservatives on *Acanthamoeba*. *Ophthalmology*. 1991;98(6):854-7.
273. Stapleton F, Harmis N, Deshpande R, Tran D. Preliminary studies on the amoebicidal efficacy of contact lens disinfection systems. *Australian and New Zealand Journal of Ophthalmology*. 1998;26:S44-S6.
274. Abjani F, Khan NA, Jung SY, Siddiqui R. Status of the effectiveness of contact lens disinfectants in Malaysia against keratitis-causing pathogens. *Exp Parasitol*. 2017;183:187-93.

275. Shoff ME, Joslin CE, Tu EY, Kubatko L, Fuerst PA. Efficacy of contact lens systems against recent clinical and tap water *Acanthamoeba* isolates. *Cornea*. 2008;27(6):713-9.
276. Johnston SP, Sriram R, Qvarnstrom Y, Roy S, Verani J, Yoder J, et al. Resistance of *Acanthamoeba* cysts to disinfection in multiple contact lens solutions. *J Clin Microbiol*. 2009;47(7):2040-5.
277. Brown AC, Ross J, Jones DB, Collier SA, Ayers TL, Hoekstra RM, et al. Risk factors for *Acanthamoeba* keratitis—a multistate case–control study, 2008–2011. *Eye & contact lens*. 2018;44:S173-S8.
278. Chang DC, Grant GB, O'Donnell K, Wannemuehler KA, Noble-Wang J, Rao CY, et al. Multistate outbreak of *Fusarium* keratitis associated with use of a contact lens solution. *Jama*. 2006;296(8):953-63.
279. Lehmann DM, Richardson ME. Impact of assay selection and study design on the outcome of cytotoxicity testing of medical devices: the case of multi-purpose vision care solutions. *Toxicol In Vitro*. 2010;24(4):1306-13.
280. Tripathi BJ, Tripathi RC, Millard CB, Borisuth NS. Cytotoxicity of hydrogen peroxide to human corneal epithelium in vitro and its clinical implications. *Lens Eye Toxic Res*. 1990;7(3-4):385-401.
281. Hiti K, Walochnik J, Faschinger C, Haller-Schober EM, Aspöck H. One- and two-step hydrogen peroxide contact lens disinfection solutions against *Acanthamoeba*: how effective are they? *Eye (Lond)*. 2005;19(12):1301-5.
282. Tzanetou K, Miltisakakis D, Droutsas D, Alimisi S, Petropoulou D, Ganteris G, et al. *Acanthamoeba* keratitis and contact lens disinfecting solutions. *Ophthalmologica*. 2006;220(4):238-41.
283. Isenberg SJ. The ocular application of povidone-iodine. *Community eye health*. 2003;16(46):30-1.
284. Apt L, Isenberg SJ, Yoshimori R, Spierer A. Outpatient topical use of povidone-iodine in preparing the eye for surgery. *Ophthalmology*. 1989;96(3):289-92.
285. Cheung SW, Boost MV, Cho P. Effect of povidone iodine contact lens disinfecting solution on orthokeratology lens and lens case contamination and organisms in the microbiome of the conjunctiva. *Cont Lens Anterior Eye*. 2021;44(6):1014-12.
286. Yanai R, Yamada N, Ueda K, Tajiri M, Matsumoto T, Kido K, et al. Evaluation of povidone-iodine as a disinfectant solution for contact lenses: antimicrobial activity and cytotoxicity for corneal epithelial cells. *Cont Lens Anterior Eye*. 2006;29(2):85-91.
287. Yamasaki K, Mizuno Y, Kitamura Y, McCanna DJ, Ngo W, Jones LW. The efficacy of povidone-iodine, hydrogen peroxide and a chemical multipurpose contact lens care system against *Pseudomonas aeruginosa* on various lens case surfaces. *Cont Lens Anterior Eye*. 2021;44(1):18-23.
288. Nakagawa M, Nakagawa R, Willcox MDP, Vijay AK. Effect of Hygiene Procedures on Lens Case Contamination with Povidone-Iodine or Multipurpose Disinfecting Solutions. *Optom Vis Sci*. 2021;98(6):563-9.
289. Kilvington S. Antimicrobial efficacy of a povidone iodine (PI) and a one-step hydrogen peroxide contact lens disinfection system. *Contact Lens and Anterior Eye*. 2004;27(4):209-12.
290. Kobayashi T, Gibbon L, Mito T, Shiraishi A, Uno T, Ohashi Y. Efficacy of commercial soft contact lens disinfectant solutions against *Acanthamoeba*. *Jpn J Ophthalmol*. 2011;55(5):547-57.
291. Yamasaki K, Saito F, Ota R, Kilvington S. Antimicrobial efficacy of a novel povidone iodine contact lens disinfection system. *Cont Lens Anterior Eye*. 2018;41(3):277-81.
292. Feynman RP. There's plenty of room at the bottom. *Engineering and science*. 1959;23(5).
293. Castagnola V, Cookman J, De Araujo JM, Polo E, Cai Q, Silveira CP, et al. Towards a classification strategy for complex nanostructures. *Nanoscale Horizons*. 2017;2(4):187-98.
294. Yaqoob SB, Adnan R, Rameez Khan RM, Rashid M. Gold, Silver, and Palladium Nanoparticles: A Chemical Tool for Biomedical Applications. *Front Chem*. 2020;8:376.
295. Faraday M. X. The Bakerian Lecture. —Experimental relations of gold (and other metals) to light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 1857;147:145-81.
296. Juan ML, Righini M, Quidant R. Plasmon nano-optical tweezers. *Nature photonics*. 2011;5(6):349-56.

297. Miller MM, Lazarides AA. Sensitivity of metal nanoparticle surface plasmon resonance to the dielectric environment. *J Phys Chem B*. 2005;109(46):21556-65.
298. Liu B, Liu J. Methods for preparing DNA-functionalized gold nanoparticles, a key reagent of bioanalytical chemistry. *Analytical methods*. 2017;9(18):2633-43.
299. Njoki PN, Lim IIS, Mott D, Park H-Y, Khan B, Mishra S, et al. Size Correlation of Optical and Spectroscopic Properties for Gold Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2007;111(40):14664-9.
300. Zeng S, Yong K-T, Roy I, Dinh XQ, Yu X, Luan F. A Review on Functionalized Gold Nanoparticles for Biosensing Applications. *Plasmonics*. 2011;6:491-506.
301. Bhalla N, Jolly P, Formisano N, Estrela P. Introduction to biosensors. *Essays in biochemistry*. 2016;60(1):1-8.
302. Aslan K, Gryczynski I, Malicka J, Matveeva E, Lakowicz JR, Geddes CD. Metal-enhanced fluorescence: an emerging tool in biotechnology. *Current opinion in biotechnology*. 2005;16(1):55-62.
303. Petryayeva E, Krull UJ. Localized surface plasmon resonance: nanostructures, bioassays and biosensing--a review. *Anal Chim Acta*. 2011;706(1):8-24.
304. Pumera M, Sánchez S, Ichinose I, Tang J. Electrochemical nanobiosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2007;123(2):1195-205.
305. Gajdosova V, Lorencova L, Kasak P, Tkac J. Electrochemical Nanobiosensors for Detection of Breast Cancer Biomarkers. *Sensors (Basel, Switzerland)*. 2020;20(14):4022.
306. Alex S, Tiwari A. Functionalized Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties and Applications--A Review. *J Nanosci Nanotechnol*. 2015;15(3):1869-94.
307. Khlebtsov NG. Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from Extinction Spectra. *Analytical Chemistry*. 2008;80(17):6620-5.
308. Liu X, Atwater M, Wang J, Huo Q. Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2007;58(1):3-7.
309. Lee K-S, El-Sayed MA. Gold and Silver Nanoparticles in Sensing and Imaging: Sensitivity of Plasmon Response to Size, Shape, and Metal Composition. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2006;110(39):19220-5.
310. Haes AJ, Zou S, Schatz GC, Van Duyne RP. A Nanoscale Optical Biosensor: The Long Range Distance Dependence of the Localized Surface Plasmon Resonance of Noble Metal Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2004;108(1):109-16.
311. Haes AJ, Zou S, Schatz GC, Van Duyne RP. Nanoscale Optical Biosensor: Short Range Distance Dependence of the Localized Surface Plasmon Resonance of Noble Metal Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2004;108(22):6961-8.
312. Mock JJ, Smith DR, Schultz S. Local refractive index dependence of plasmon resonance spectra from individual nanoparticles. *Nano letters*. 2003;3(4):485-91.
313. Murray WA, Auguié B, Barnes WL. Sensitivity of Localized Surface Plasmon Resonances to Bulk and Local Changes in the Optical Environment. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2009;113(13):5120-5.
314. Kim Y, Johnson RC, Hupp JT. Gold Nanoparticle-Based Sensing of "Spectroscopically Silent" Heavy Metal Ions. *Nano Letters*. 2001;1(4):165-7.
315. Gates AT, Fakayode SO, Lowry M, Ganea GM, Murugesu A, Robinson JW, et al. Gold nanoparticle sensor for homocysteine thiolactone-induced protein modification. *Langmuir*. 2008;24(8):4107-13.
316. Raj V, Sreenivasan K. Selective detection and estimation of C-reactive protein in serum using surface-functionalized gold nano-particles. *Anal Chim Acta*. 2010;662(2):186-92.
317. Raj V, Vijayan AN, Joseph K. Naked eye detection of infertility using fructose blue--a novel gold nanoparticle based fructose sensor. *Biosens Bioelectron*. 2014;54:171-4.
318. Aslan K, Lakowicz JR, Geddes CD. Nanogold-plasmon-resonance-based glucose sensing. *Anal Biochem*. 2004;330(1):145-55.
319. Raj V, Jaime R, Astruc D, Sreenivasan K. Detection of cholesterol by digitonin conjugated gold nanoparticles. *Biosens Bioelectron*. 2011;27(1):197-200.

320. Jiang Y, Zhao H, Zhu N, Lin Y, Yu P, Mao L. A simple assay for direct colorimetric visualization of trinitrotoluene at picomolar levels using gold nanoparticles. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2008;47(45):8601-4.
321. Rosi NL, Mirkin CA. Nanostructures in biodiagnostics. *Chem Rev.* 2005;105(4):1547-62.
322. Zou YM, Tan JP, Li N, Yang JS, Yu BC, Yu JM, et al. The prevalence of Parkinson's disease continues to rise after 80 years of age: a cross-sectional study of Chinese veterans. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014;18(24):3908-15.
323. Zanolli LM, D'Agata R, Spoto G. Functionalized gold nanoparticles for ultrasensitive DNA detection. *Anal Bioanal Chem.* 2012;402(5):1759-71.
324. Storhoff JJ, Elghanian R, Mucic RC, Mirkin CA, Letsinger RL. One-pot colorimetric differentiation of polynucleotides with single base imperfections using gold nanoparticle probes. *Journal of the American Chemical Society.* 1998;120(9):1959-64.
325. Elghanian R, Storhoff JJ, Mucic RC, Letsinger RL, Mirkin CA. Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles. *Science.* 1997;277(5329):1078-81.
326. Wang G, Akiyama Y, Shiraishi S, Kanayama N, Takarada T, Maeda M. Cross-Linking versus Non-Cross-Linking Aggregation of Gold Nanoparticles Induced by DNA Hybridization: A Comparison of the Rapidity of Solution Color Change. *Bioconjugate Chemistry.* 2017;28(1):270-7.
327. Liandris E, Gazouli M, Andreadou M, Comor M, Abazovic N, Sechi LA, et al. Direct detection of unamplified DNA from pathogenic mycobacteria using DNA-derivatized gold nanoparticles. *J Microbiol Methods.* 2009;78(3):260-4.
328. Bakthavathsalam P, Rajendran VK, Baquir Mohammed JA. A direct detection of Escherichia coli genomic DNA using gold nanoprobe. *Journal of Nanobiotechnology.* 2012;10(1):8.
329. Li H, Rothberg L. Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(39):14036-9.
330. Shawky SM, Bald D, Azzazy HM. Direct detection of unamplified hepatitis C virus RNA using unmodified gold nanoparticles. *Clin Biochem.* 2010;43(13-14):1163-8.
331. Costa P, Amaro A, Botelho A, Inácio J, Baptista PV. Gold nanoprobe assay for the identification of mycobacteria of the Mycobacterium tuberculosis complex. *Clinical Microbiology and Infection.* 2010;16(9):1464-9.
332. Wang YF, Pang DW, Zhang ZL, Zheng HZ, Cao JP, Shen JT. Visual gene diagnosis of HBV and HCV based on nanoparticle probe amplification and silver staining enhancement. *Journal of medical virology.* 2003;70(2):205-11.
333. Yeung CY, Liu CC, Tseng YT, Tsai KC, Hsieh MA, Chan WT, et al. Rapid identification of S almonella using H ektoen enteric agar and 16s ribosomal DNA probe-gold nanoparticle immunochromatography assay in clinical faecal specimens. *Letters in applied microbiology.* 2014;58(4):311-7.
334. Chen S-H, Lin K-I, Tang C-Y, Peng S-L, Chuang Y-C, Lin Y-R, et al. Optical detection of human papillomavirus type 16 and type 18 by sequence sandwich hybridization with oligonucleotide-functionalized Au nanoparticles. *IEEE transactions on nanobioscience.* 2009;8(2):120-31.
335. Moitra P, Alafeef M, Dighe K, Frieman MB, Pan D. Selective naked-eye detection of SARS-CoV-2 mediated by N gene targeted antisense oligonucleotide capped plasmonic nanoparticles. *ACS nano.* 2020;14(6):7617-27.
336. Kim W, Lee JC, Shin JH, Jin KH, Park HK, Choi S. Instrument-Free Synthesizable Fabrication of Label-Free Optical Biosensing Paper Strips for the Early Detection of Infectious Keratoconjunctivides. *Anal Chem.* 2016;88(10):5531-7.
337. Li Q, Ma C, Ma Y, Mao Y, Meng Z. Sustained bimatoprost release using gold nanoparticles laden contact lenses. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2021;32(12):1618-34.
338. Maulvi FA, Patil RJ, Desai AR, Shukla MR, Vaidya RJ, Ranch KM, et al. Effect of gold nanoparticles on timolol uptake and its release kinetics from contact lenses: In vitro and in vivo evaluation. *Acta Biomater.* 2019;86:350-62.

339. Basuki JS, Qie F, Mulet X, Suryadinata R, Vashi AV, Peng YY, et al. Photo-Modulated Therapeutic Protein Release from a Hydrogel Depot Using Visible Light. *Angewandte Chemie International Edition*. 2017;56(4):966-71.
340. Leonavičienė L, Kirdaitė G, Bradūnaitė R, Vaitkienė D, Vasiliauskas A, Zabulytė D, et al. Effect of gold nanoparticles in the treatment of established collagen arthritis in rats. *Medicina (Kaunas)*. 2012;48(2):91-101.
341. Hornos Carneiro MF, Barbosa F, Jr. Gold nanoparticles: A critical review of therapeutic applications and toxicological aspects. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2016;19(3-4):129-48.
342. Sharma A, Tandon A, Tovey JC, Gupta R, Robertson JD, Fortune JA, et al. Polyethylenimine-conjugated gold nanoparticles: Gene transfer potential and low toxicity in the cornea. *Nanomedicine*. 2011;7(4):505-13.
343. Mitra M, Kandalam M, Rangasamy J, Shankar B, Maheswari UK, Swaminathan S, et al. Novel epithelial cell adhesion molecule antibody conjugated polyethyleneimine-capped gold nanoparticles for enhanced and targeted small interfering RNA delivery to retinoblastoma cells. *Mol Vis*. 2013;19:1029-38.
344. Tandon A, Sharma A, Rodier JT, Klibanov AM, Rieger FG, Mohan RR. BMP7 gene transfer via gold nanoparticles into stroma inhibits corneal fibrosis in vivo. *PLoS One*. 2013;8(6):e66434.
345. Prabhulkar S, Matthews J, Rawal S, Awdeh RM. Molecular histopathology using gold nanorods and optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(2):1192-200.
346. Jia Y, Liu G, Gordon AY, Gao SS, Pechauer AD, Stoddard J, et al. Spectral fractionation detection of gold nanorod contrast agents using optical coherence tomography. *Opt Express*. 2015;23(4):4212-25.
347. Wang B, Kagemann L, Schuman JS, Ishikawa H, Bilonick RA, Ling Y, et al. Gold nanorods as a contrast agent for Doppler optical coherence tomography. *PLoS One*. 2014;9(3):e90690.
348. de la Zerda A, Prabhulkar S, Perez VL, Ruggeri M, Paranjape AS, Habte F, et al. Optical coherence contrast imaging using gold nanorods in living mice eyes. *Clin Exp Ophthalmol*. 2015;43(4):358-66.
349. Cope JR, Collier SA, Schein OD, Brown AC, Verani JR, Gallen R, et al. Acanthamoeba Keratitis among Rigid Gas Permeable Contact Lens Wearers in the United States, 2005 through 2011. *Ophthalmology*. 2016;123(7):1435-41.
350. Lindsay RG, Watters G, Johnson R, Ormonde SE, Snibson GR. Acanthamoeba keratitis and contact lens wear. *Clin Exp Optom*. 2007;90(5):351-60.
351. Huang W, Bateman E. Cloning, expression, and characterization of the TATA-binding protein (TBP) promoter binding factor, a transcription activator of the Acanthamoeba TBP gene. *J Biol Chem*. 1995;270(48):28839-47.
352. Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Faraday Discussions*. 1951;11(0):55-75.
353. Zheng T, Bott S, Huo Q. Techniques for Accurate Sizing of Gold Nanoparticles Using Dynamic Light Scattering with Particular Application to Chemical and Biological Sensing Based on Aggregate Formation. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016;8(33):21585-94.
354. Scarabelli L, Sánchez-Iglesias A, Pérez-Juste J, Liz-Marzán LM. A "Tips and Tricks" Practical Guide to the Synthesis of Gold Nanorods. *The Journal of Physical Chemistry Letters*. 2015;6(21):4270-9.
355. Hill HD, Millstone JE, Banholzer MJ, Mirkin CA. The Role Radius of Curvature Plays in Thiolated Oligonucleotide Loading on Gold Nanoparticles. *ACS Nano*. 2009;3(2):418-24.
356. Mirkin CA, Letsinger RL, Mucic RC, Storhoff JJ. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature*. 1996;382(6592):607-9.
357. Ma P, Visvesvara GS, Martinez AJ, Theodore FH, Daggett PM, Sawyer TK. Naegleria and Acanthamoeba infections: review. *Rev Infect Dis*. 1990;12(3):490-513.
358. Kilvington S. Acanthamoeba trophozoite and cyst adherence to four types of soft contact lens and removal by cleaning agents. *Eye (Lond)*. 1993;7 (Pt 4):535-8.

359. Dairawan M, Shetty PJ. The evolution of DNA extraction methods. *America Journal of Biomedical Science and Research*. 2020;8(1):39-46.
360. Haiss W, Thanh NT, Aveyard J, Fernig DG. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-vis spectra. *Anal Chem*. 2007;79(11):4215-21.
361. Khlebtsov BN, Khlebtsov NG. On the measurement of gold nanoparticle sizes by the dynamic light scattering method. *Colloid J*. 2011;73(1):118-27.
362. Zhang X, Servos MR, Liu J. Instantaneous and quantitative functionalization of gold nanoparticles with thiolated DNA using a pH-assisted and surfactant-free route. *Journal of the American Chemical Society*. 2012;134(17):7266-9.
363. Deka J, Mech R, Ianeselli L, Amenitsch H, Cacho-Nerin F, Parris P, et al. Surface passivation improves the synthesis of highly stable and specific DNA-functionalized gold nanoparticles with variable DNA density. *ACS applied materials & interfaces*. 2015;7(12):7033-40.
364. Sanromán-Iglesias M, Lawrie CH, Schäfer T, Grzelczak M, Liz-Marzán LM. Sensitivity Limit of Nanoparticle Biosensors in the Discrimination of Single Nucleotide Polymorphism. *ACS Sensors*. 2016;1(9):1110-6.
365. Hurst SJ, Lytton-Jean AKR, Mirkin CA. Maximizing DNA loading on a range of gold nanoparticle sizes. *Analytical chemistry*. 2006;78(24):8313-8.
366. Ting DSJ, Ho CS, Deshmukh R, Said DG, Dua HS. Infectious keratitis: an update on epidemiology, causative microorganisms, risk factors, and antimicrobial resistance. *Eye (Lond)*. 2021;35(4):1084-101.
367. Garrido-Maestu A, Azinheiro S, Fuciños P, Carvalho J, Prado M. Highly sensitive detection of gluten-containing cereals in food samples by real-time Loop-mediated isothermal AMPLification (qLAMP) and real-time polymerase chain reaction (qPCR). *Food Chemistry*. 2018;246:156-63.
368. Li J, Deng T, Chu X, Yang R, Jiang J, Shen G, et al. Rolling circle amplification combined with gold nanoparticle aggregates for highly sensitive identification of single-nucleotide polymorphisms. *Anal Chem*. 2010;82(7):2811-6.
369. Srimongkol G, Ditmangklo B, Choopara I, Thaniyavarn J, Dean D, Kokpol S, et al. Rapid colorimetric loop-mediated isothermal amplification for hypersensitive point-of-care *Staphylococcus aureus* enterotoxin A gene detection in milk and pork products. *Scientific Reports*. 2020;10(1):7768.
370. Lu X, Shi X, Wu G, Wu T, Qin R, Wang Y. Visual detection and differentiation of Classic Swine Fever Virus strains using nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) and G-quadruplex DNAzyme assay. *Scientific Reports*. 2017;7(1):44211.
371. Xu W, Xue X, Li T, Zeng H, Liu X. Ultrasensitive and Selective Colorimetric DNA Detection by Nicking Endonuclease Assisted Nanoparticle Amplification. *Angewandte Chemie International Edition*. 2009;48(37):6849-52.
372. Xu W, Xie X, Li D, Yang Z, Li T, Liu X. Ultrasensitive colorimetric DNA detection using a combination of rolling circle amplification and nicking endonuclease-assisted nanoparticle amplification (NEANA). *Small*. 2012;8(12):1846-50.
373. Elumalai M, Ipatov A, Carvalho J, Guerreiro J, Prado M. Dual colorimetric strategy for specific DNA detection by nicking endonuclease-assisted gold nanoparticle signal amplification. *Anal Bioanal Chem*. 2021.
374. Yeung CY, Liu CC, Tseng YT, Tsai KC, Hsieh MA, Chan WT, et al. Rapid identification of *Salmonella* using Hektoen enteric agar and 16s ribosomal DNA probe-gold nanoparticle immunochromatography assay in clinical faecal specimens. *Lett Appl Microbiol*. 2014;58(4):311-7.
375. Jin R, Wu G, Li Z, Mirkin CA, Schatz GC. What Controls the Melting Properties of DNA-Linked Gold Nanoparticle Assemblies? *Journal of the American Chemical Society*. 2003;125(6):1643-54.
376. Thompson PP, Kowalski RP, Shanks RM, Gordon YJ. Validation of real-time PCR for laboratory diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *J Clin Microbiol*. 2008;46(10):3232-6.
377. Zhang J, Kim K, Kim HJ, Meyer D, Park W, Lee SA, et al. Smart soft contact lenses for continuous 24-hour monitoring of intraocular pressure in glaucoma care. *Nat Commun*. 2022;13(1):5518.
378. Elsherif M, Moreddu R, Alam F, Salih AE, Ahmed I, Butt H. Wearable Smart Contact Lenses for Continual Glucose Monitoring: A Review. *Front Med (Lausanne)*. 2022;9:858784.

379. Wang Y, Jacobs DS. Role of therapeutic contact lenses in management of corneal disease. *Curr Opin Ophthalmol*. 2022;33(4):306-10.
380. Rykowska I, Nowak I, Nowak R. Soft Contact Lenses as Drug Delivery Systems: A Review. *Molecules*. 2021;26(18).
381. Byers TJ. Molecular biology of DNA in *Acanthamoeba*, *Amoeba*, *Entamoeba*, and *Naegleria*. *Int Rev Cytol*. 1986;99:311-41.
382. Byers TJ, Rudick VL, Rudick MJ. Cell Size, Macromolecule Composition, Nuclear Number, Oxygen Consumption and Cyst Formation During Two Growth Phases in Unagitated Cultures of *Acanthamoeba castellanii*1. *The Journal of Protozoology*. 1969;16(4):693-9.
383. Schroeder JM, Booton GC, Hay J, Niszl IA, Seal DV, Markus MB, et al. Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of acanthamoebae from humans with keratitis and from sewage sludge. *J Clin Microbiol*. 2001;39(5):1903-11.
384. Niyiyati M, Lorenzo-Morales J, Mohebbali M, Rezaie S, Rahimi F, Babaei Z, et al. Comparison of a PCR-based method with culture and direct examination for diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *Iranian Journal of Parasitology*. 2009;4(2):38-43.
385. Holmgaard DB, Barnadas C, Mirbarati SH, O'Brien Andersen L, Nielsen HV, Stensvold CR. Detection and Identification of *Acanthamoeba* and Other Nonviral Causes of Infectious Keratitis in Corneal Scrapings by Real-Time PCR and Next-Generation Sequencing-Based 16S-18S Gene Analysis. *Journal of clinical microbiology*. 2021;59(2):e02224-20.
386. Khosravinia N, Fata A, Moghaddas E, Hosseini Farash BR, Sedaghat MR, Eslampour AR, et al. Diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis in Mashhad, Northeastern Iran: A Gene-Based PCR Assay. *Iranian journal of parasitology*. 2021;16(1):111-21.
387. Aksozek A, McClellan K, Howard K, Niederkorn JY, Alizadeh H. Resistance of *Acanthamoeba castellanii* Cysts to Physical, Chemical, and Radiological Conditions. *Journal of Parasitology*. 2002;88(3):621-3.
388. Connor CG, Hopkins SL, Salisbury RD. Effectivity of contact lens disinfection systems against *Acanthamoeba culbertsoni*. *Optometry and vision science : official publication of the American Academy of Optometry*. 1991;68(2):138-41.
389. Zhu H, Bandara MB, Vijay AK, Masoudi S, Wu D, Willcox MD. Importance of rub and rinse in use of multipurpose contact lens solution. *Optom Vis Sci*. 2011;88(8):967-72.
390. Cancrini G, Iori A, Mancino R. *Acanthamoeba* adherence to contact lenses, removal by rinsing procedures, and survival to some ophthalmic products. *Parassitologia*. 1998;40(3):275-8.
391. Rosenthal RA, Henry CL, Schleich BA. Contribution of regimen steps to disinfection of hydrophilic contact lenses. *Cont Lens Anterior Eye*. 2004;27(3):149-56.
392. Kilvington S, Lonnen J. A comparison of regimen methods for the removal and inactivation of bacteria, fungi and *Acanthamoeba* from two types of silicone hydrogel lenses. *Cont Lens Anterior Eye*. 2009;32(2):73-7.
393. Butcko V, McMahon TT, Joslin CE, Jones L. Microbial keratitis and the role of rub and rinsing. *Eye Contact Lens*. 2007;33(6 Pt 2):421-3; discussion 4-5.
394. Dalton K, Subbaraman LN, Rogers R, Jones L. Physical properties of soft contact lens solutions. *Optom Vis Sci*. 2008;85(2):122-8.
395. Cho P, Reyes S, Boost MV. Microbiocidal characterization of a novel povidone-iodine based rigid contact lens disinfecting solution. *Cont Lens Anterior Eye*. 2018;41(6):542-6.
396. Walters R, Campolo A, Miller E, McAnally C, Gabriel M, Shannon P, et al. Differential Antimicrobial Efficacy of Preservative-Free Contact Lens Disinfection Systems against Common Ocular Pathogens. *Microbiol Spectr*. 2022;10(1):e0213821.
397. Cho P, Poon HY, Chen CC, Yuon LT. To rub or not to rub? - effective rigid contact lens cleaning. *Ophthalmic Physiol Opt*. 2020;40(1):17-23.
398. Gabriel MM, McAnally C, Bartell J, Walters R, Clark L, Crary M, et al. Biocidal Efficacy of a Hydrogen Peroxide Lens Care Solution Incorporating a Novel Wetting Agent. *Eye Contact Lens*. 2019;45(3):164-70.

399. Kamel M, Abd Ghani MK, Kaur K, Singh S, Nordin A, Suboh Y, et al. The Effectiveness of Oxysept® 1-Step Contact Lens Disinfecting Solution against Clinical Isolates of Acanthamoeba Cysts. *International Medical Journal* (1994). 2019;26:196-9.
400. Kolar SS, Manarang JC, Burns AR, Miller WL, McDermott AM, Bergmanson JP. Contact lens care solution killing efficacy against Acanthamoeba *castellanii* by in vitro testing and live-imaging. *Cont Lens Anterior Eye*. 2015;38(6):442-50.
401. Kilvington S, Lam A. Development of Standardized Methods for Assessing Biocidal Efficacy of Contact Lens Care Solutions Against Acanthamoeba Trophozoites and Cysts. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2013;54(7):4527-37.
402. Coulon C, Collignon A, McDonnell G, Thomas V. Resistance of Acanthamoeba cysts to disinfection treatments used in health care settings. *J Clin Microbiol*. 2010;48(8):2689-97.
403. Vaerewijck MJ, Sabbe K, Baré J, Spengler HP, Favoreel HW, Houf K. Assessment of the efficacy of benzalkonium chloride and sodium hypochlorite against Acanthamoeba polyphaga and Tetrahymena spp. *J Food Prot*. 2012;75(3):541-6.
404. Kadry GM, Ismail MAM, El-Sayed NM, El-Kholy HS, El-Akkad DMH. In vitro amoebicidal effect of Aloe vera ethanol extract and honey against Acanthamoeba spp. cysts. *J Parasit Dis*. 2021;45(1):159-68.
405. Padzik M, Baltaza W, Conn DB, Szaflik JP, Chomicz L. Effect of povidone iodine, chlorhexidine digluconate and toyocamycin on amphizoic amoebic strains, infectious agents of Acanthamoeba keratitis - a growing threat to human health worldwide. *Ann Agric Environ Med*. 2018;25(4):725-31.
406. Gooi P, Lee-Wing M, Brownstein S, El-Defrawy S, Jackson WB, Mintsoulis G. Acanthamoeba keratitis: persistent organisms without inflammation after 1 year of topical chlorhexidine. *Cornea*. 2008;27(2):246-8.
407. Kam KW, Yung W, Li GKH, Chen LJ, Young AL. Infectious keratitis and orthokeratology lens use: a systematic review. *Infection*. 2017;45(6):727-35.
408. Choo JD, Caroline PJ, Harlin DD, Papas EB, Holden BA. Morphologic changes in cat epithelium following continuous wear of orthokeratology lenses: a pilot study. *Cont Lens Anterior Eye*. 2008;31(1):29-37.
409. Lin MC, Graham AD, Fusaro RE, Polse KA. Impact of Rigid Gas-Permeable Contact Lens Extended Wear on Corneal Epithelial Barrier Function. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2002;43(4):1019-24.
410. Liu YM, Xie P. The Safety of Orthokeratology--A Systematic Review. *Eye Contact Lens*. 2016;42(1):35-42.
411. Hu P, Zhao Y, Chen D, Ni H. The safety of orthokeratology in myopic children and analysis of related factors. *Cont Lens Anterior Eye*. 2021;44(1):89-93.
412. Yeh TN, Green HM, Zhou Y, Pitts J, Kitamata-Wong B, Lee S, et al. Short-term effects of overnight orthokeratology on corneal epithelial permeability and biomechanical properties. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(6):3902-11.
413. Li W, Wang Z, Qu J, Zhang Y, Sun X. Acanthamoeba keratitis related to contact lens use in a tertiary hospital in China. *BMC Ophthalmol*. 2019;19(1):202.
414. Zimmerman AB, Richdale K, Mitchell GL, Kinoshita BT, Lam DY, Wagner H, et al. Water Exposure is a Common Risk Behavior Among Soft and Gas-Permeable Contact Lens Wearers. *Cornea*. 2017;36(8):995-1001.
415. Legarreta JE, Nau AC, Dhaliwal DK. Acanthamoeba keratitis associated with tap water use during contact lens cleaning: manufacturer guidelines need to change. *Eye Contact Lens*. 2013;39(2):158-61.
416. Giraldez MJ, Resua CG, Lira M, Oliveira ME, Magariños B, Toranzo AE, et al. Contact lens hydrophobicity and roughness effects on bacterial adhesion. *Optom Vis Sci*. 2010;87(6):E426-31.
417. Giraldez MJ, Serra C, Lira M, Real Oliveira ME, Yebra-Pimentel E. Soft contact lens surface profile by atomic force microscopy. *Optom Vis Sci*. 2010;87(7):E475-81.

418. Abedkhozasteh H, Niyyati M, Rezaei S, Mohebbali M, Farnia S, Kazemi-Rad E, et al. Identifying differentially expressed genes in trophozoites and cysts of *Acanthamoeba* T4 genotype: Implications for developing new treatments for *Acanthamoeba* keratitis. *Eur J Protistol*. 2015;51(1):34-41.

419. ISO standard 14729, Ophthalmic optics — contact lens care products — microbiological requirements and test methods for products and regimens for hygienic

management of contact lenses, 2001 [Available from: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:14729:ed-1:v1:en>.

420. International Organization for Standardization. Ophthalmic optics—contact lens care products—method to assess contact lens care products with contact lenses in a lens case, challenged with bacterial and fungal organisms. ISO 18259:2001/2014. . International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland; 2014.

VIII. ANEXO

PUBLICACIONES

1. PATENTE: Sistemas de detección de *Acanthamoeba* spp. y otros parásitos oculares con nanopartículas de oro. Autores: Fernando Huete Toral, Cristina Pastrana Robles, Lorenzo Pastrana Castro, Marta Prado Rodríguez, Juan Gonzalo Carracedo Rodríguez, Basilio Colligris, Joana Rafaela Lara Guerreiro. Título: N° de Registro: P202130709 Fecha de Prioridad: 22-07-2021. Entidad Titular: OcuPharm Diagnostics SL. Países: España.
2. Pastrana C, Guerreiro J, Elumalai M, Carpena-Torres C, Crooke A, Carracedo G, Huete-Toral F. Dual-Mode Gold Nanoparticle-Based Method for Early Detection of *Acanthamoeba*. *International Journal of Molecular Sciences* 2022; 23(23):14877.
3. Pastrana C, Carpena-Torres C, Rodríguez-Pomar C, Martín-Gil A, Carracedo G. Improvement of Soft Contact Lens Wettability After the Instillation of Hyaluronic Acid Eye Drops. *Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice*: 2022.
4. Dammak A, Pastrana C, Martín-Gil A, Carpena-Torres C, Peral Cerda A, Simovart M, Alarma P, Huete-Toral F, Carracedo G. Oxidative Stress in the Anterior Ocular Diseases: Diagnostic and Treatment. *Biomedicines*. 2023; 11(2):292.
5. Carpena-Torres C, Pastrana C, Rodríguez-Pomar C, Serramito M, Carracedo G. Stabilization of comfort and visual quality after the insertion of soft contact lenses. *Contact Lens & Anterior Eye* 2022;45(4):101498.
6. Dammak A, Huete-Toral F, Carpena-Torres C, Martín-Gil A, Pastrana C, Carracedo G. From oxidative stress to inflammation in the posterior ocular diseases: diagnosis and treatment. *Pharmaceutics* 2021; 13(9): 1376.
7. Carpena-Torres C, Pastrana C, Rodríguez-Pomar C, Serramito M, Batres L, Carracedo G. Changes in visual quality with soft contact lenses after the instillation

of hyaluronic acid eye drops. *Contact Lens & Anterior Eye* 2021; 101471 [Online ahead of print].

8. Carracedo G, Carpena-Torres C, Pastrana C, Privado-Aroco A, Serramito M, Espinosa-Vidal TM, Rodríguez-Lafora M. A comparison between automated subjective refraction and Traditional subjective refraction in keratoconus patients. *Optometry and Vision Science* 2021; 98(6): 597-604.
9. Martínez-Águila A, Martín-Gil A, Carpena-Torres C, Pastrana C, Carracedo G. Influence of circadian rhythm in the eye: Significance of melatonin in glaucoma. *Biomolecules* 2021; 11(3): 340.
10. Carpena-Torres C, Pintor J, Pérez de Lara MJ, Huete-Toral F, Crooke A, Pastrana C, Carracedo G. Optimization of a rabbit dry eye model induced by topical instillation of benzalkonium chloride. *Journal of Ophthalmology* 2020; 2020: 7204951.
11. Carracedo G, Carpena-Torres C, Pastrana C, Privado-Aroco A, Serramito M, Batres L. Repeatability of aberrometry-based automated subjective refraction in healthy and keratoconus subjects. *Journal of Ophthalmology* 2020; 2020: 4831298.
12. Peral A, Martínez-Aguila A, Pastrana C, Huete-Toral F, Carpena-Torres C, Carracedo G. Contact lenses as drug delivery system for glaucoma: a review. *Applied Sciences-Basel* 2020; 10(15): 5151.
13. Carracedo G, Pastrana C, Serramito M, Rodríguez-Pomar C. Evaluation of tear meniscus by optical coherence tomography after different sodium hyaluronate eyedrops instillation. *Acta Ophthalmologica*. 2019 Mar;97(2):e162-e169.
14. Carracedo G, Carpena C, Concepción P, Díaz V, García-García M, Jemni N, Lledó VE, Martín M, Pastrana C, Pelissier R, Veselinova A, Wang X, Pintor J. Presence of melatonin in human tears. *Journal of Optometry* 2017; 10(1): 3-4

CONGRESOS

1. Póster titulado 'Development of a new intraocular hypertension animal model with gold nanoparticles' en ARVO Annual Meeting, 2022, Denver, Colorado.
2. Póster titulado 'Cambios en la calidad visual con lentes de contacto blandas tras la instilación de lágrimas de ácido hialurónico' en 26º Congreso de Optometría, contactología y óptica oftálmica, 2021, Madrid.
3. Póster titulado 'Efectividad de una lente de contacto diseñada para el uso de dispositivos digitales en la calidad visual y superficie ocular tras el uso de ordenador' en 26º Congreso de Optometría, contactología y óptica oftálmica, 2021, Madrid.
4. Póster titulado 'Comparación de dos autorefractómetros de frente de onda: Monocular de campo cerrado versus Binocular de campo abierto' en 26º Congreso de Optometría, contactología y óptica oftálmica, 2021, Madrid.
5. Póster titulado 'Development of chronic intraocular hypertension in the rabbits: effect of intraocular injection of goldnanoparticles' en el 5º congreso PhDay, Universidad Complutense, 2021, Madrid.
6. Ponencia titulada 'Optimization of a rabbit dry eye model induced by topical instillation of benzalkonium chloride' en: 4º PhDay Complutense FOO 2020 (Online).
7. Póster titulado 'In vivo changes in wettability of hydrophilic contact lenses after an Aloe vera – HPMC based artificial tear drop' en: 4º PhDay Complutense FOO 2020 (Online).
8. Póster titulado 'Biosensor based DNA for dry eye detection' en: Nanomed Europe 2019 (Braga, Portugal).

9. Ponencia titulada 'Development of a LSPR-based sensor for the detection of Acanthamoeba' en: 3rd PhDay – UCM 2019 (Madrid, España).
10. Póster titulado 'Eficacia y repetibilidad de la refracción basada en aberrometría en niños y adolescentes' en: OPTOM Meeting 2019 (Valladolid, España).
11. Póster titulado 'Comparación de dos autorefractómetros de frente de onda en niños y adolescentes: monocular vs binocular' en: OPTOM Meeting 2019 (Valladolid, España).
12. Ponencia titulada 'Diagnosis of dry eye assisted by gold nanoparticles' en: Congresso Internacional de Optometria e Ciências da Visão, 2019 (Braga, Portugal).
13. Ponencia titulada 'Visual quality changes with soft contact lenses after different hyaluronic acid eye drops instillation' en: Congresso Internacional de Optometria e Ciências da Visão. 2019 (Braga, Portugal).
14. Póster titulado 'Efficacy and repeatability of aberrometry-based binocular refraction compared with subjective refraction in keratoconus patients' en: The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2019 (Vancouver, Canadá).
15. Póster titulado 'Cambios en la humectación in vivo tras la instilación de lágrimas artificiales con lentes de contacto hidrofílicas' en Congreso Internacional de Optometría, Contactología y Óptica oftálmica 2018, OPTOM. (Madrid, España).
16. Póster titulado 'Evaluación del menisco lagrimal mediante OCT tras la instilación de lágrimas de ácido hialurónico' en Congreso Internacional de Optometría, Contactología y Óptica oftálmica 2018, OPTOM. (Madrid, España).
17. Póster titulado 'Estabilización de la humectación in vivo, comfort y calidad visual tras la inserción de lentes de contacto hidrofílicas' en Congreso Internacional de Optometría, Contactología y Óptica oftálmica 2018, OPTOM. (Madrid, España)

18. Ponencia titulada 'Efecto de dos soluciones de mantenimiento con agentes humectantes en usuarios de lentes de contacto para dispositivos electrónicos' en Congreso Internacional de Optometría, Contactología y Óptica oftálmica 2018, OPTOM. (Madrid, España)
19. Póster titulado 'Detection system with gold nanoparticles' 2ª Jornada PhDay Complutense, Madrid
20. Póster titulado 'How long should it be waited to evaluate soft contact lenses after its insertion?' en: Congresso Internacional de Optometria e Ciências da Visão 2018 (Braga, Portugal).
21. Póster titulado 'In-vivo wettability changes after tear substitutes instillation in hydrophilic contact lens users' en: Congresso Internacional de Optometria e Ciências da Visão 2018 (Braga, Portugal).
22. Póster titulado 'Evaluation of tear meniscus by oct after sodium hyaluronate eyedrops instillation' en: OPTOM Meeting Academy 2017 (Barcelona, España).
23. Póster titulado 'Influencia del uso del ordenador en la película lagrimal' en: OPTOM Meeting Academy 2017 (Barcelona, España).
24. Póster titulado 'In vivo wettability changes in soft contact lenses after different tear drops instillation' en: Congresso Internacional de Optometria e Ciências da Visão 2017 (Braga, Portugal).
25. Póster titulado 'Predictive fitting success rates for soft lens designs' en: Congresso Internacional de Optometria e Ciências da Visão (Braga, Portugal).
26. Póster titulado 'Presence of melatonin in human tears' en: Congresso Internacional de Optometria e Ciências da Visão 2017 (Braga, Portugal).

