



Universidad
Zaragoza

TRABAJO DE FIN DE GRADO

ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS PRESENTES EN LAS LENTES DE CONTACTO DESPUÉS DE SU USO RUTINARIO

Autor

Paula Floria Porroche

Directores

Sofía Otín Mallada

Eugenio Vispe Palacin

Facultad de Ciencias, Grado de Óptica y Optometría
Curso 2022-2023



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

INDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	3
1.1	Lentes de contacto.	3
1.2	Depósitos presentes en las lentes de contacto.	4
1.3	Métodos de detección de depósitos proteicos.....	5
2	JUSTIFICACIÓN DEL TEMA.....	7
3	HIPÓTESIS	7
4	OBJETIVOS	7
5	METODOLOGÍA	8
5.1	Diseño del estudio.....	8
5.2	Selección de las muestras y creación de la base de datos.	8
5.3	Procesamiento de las muestras.	8
5.4	Curva de calibrado.	9
5.5	Obtención de los resultados.....	10
6	RESULTADOS.....	10
6.1	Concentración de proteínas por materiales.	10
6.2	Concentración de proteínas Hi-Si vs HG.....	11
7	DISCUSIÓN	11
7.1	Comentarios sobre la recogida de muestras.	11
7.2	Comentarios sobre la metodología.....	12
7.3	Comentario sobre los resultados	13
7.4	Comentarios sobre las limitaciones del estudio.	14
8	CONCLUSIONES	14
9	BIBLIOGRAFÍA	15

1 INTRODUCCIÓN

Según el libro blanco de la salud visual publicado en 2022, un 17% de la población con defectos refractivos utilizan las lentes de contacto como método de compensación en España (1).

Las lentes de contacto (LCs) se colocan sobre la película lagrimal del ojo y cubren la superficie externa para corregir ametropías e irregularidades de la superficie corneal (2). La interacción que tiene lugar entre los componentes de la lágrima y la estructura química de las LCs produce que algunos compuestos orgánicos queden adheridos a su superficie, lo cual puede ocasionar mala visión o incomodidad por sequedad o reacciones de hipersensibilidad.

1.1 Lentes de contacto.

Las primeras lentes se fabricaron con PMMA y se les denominaba LCs duras, pero actualmente se utilizan diferentes materiales de bajo módulo y se les conoce como LCs rígidas permeables al gas (RGP) (3, 4). Las lentillas rígidas están formadas por grupos de siloxano y flúor. El siloxano es un componente hidrófobo, pero permite que aumente la permeabilidad a los gases, es decir, que pase más oxígeno, y el flúor es hidrófilo, aumenta la permeabilidad y proporciona resistencia a los depósitos. Con estas lentes se consigue tener buena agudeza visual y sensibilidad al contraste y, además, son capaces de corregir astigmatismos altos y son más toleradas en personas con ojo seco o conjuntivitis pero la adaptación es lenta e incómoda al principio, lo que hace que sean mucho menos usadas (4, 5).

En la actualidad, las más utilizadas son las LCs blandas (6). Se componen principalmente de HEMA, que es un material con baja permeabilidad al oxígeno y tiene afinidad a la adherencia de depósitos. Se deforma con facilidad, pero es altamente hidrófilo. También están presentes en la mayoría de las LCs blandas el NVP (N-Vinil pirrolidina), monómero iónico e hidrófilo que atrae a las proteínas y en las nuevas generaciones, se añaden grupos siloxano que aumentan la permeabilidad a los gases y a su vez, la adhesión de depósitos de carácter lipídico.

En general, son lentillas compuestas por materiales altamente flexibles, permeables al oxígeno y con alto contenido en agua, facilitando así la adaptación al ojo (3, 7).

Las LCs blandas las podemos dividir en dos subgrupos según la permeabilidad al oxígeno (3):

- **Lentes de hidrogel convencional (HG)**. Su característica principal es el alto contenido en agua, que aporta permeabilidad al oxígeno. Se crean con enlaces de carbono a carbono, con diferentes tipos de radicales.
- **Lentes de hidrogel de silicona (Hi-Si)**. Representan el avance más importante en la industria de las LCs (8). Se forman a través de cadenas poliméricas compuestas con enlaces de oxígeno y silicio a los que se incorporan radicales hidrófobos. Su característica más importante es la elevada permeabilidad a los gases producida por la incorporación del grupo siloxano, que además aumenta el módulo de elasticidad y disminuye la hidrofilia.

El tiempo de uso de las lentillas es un factor de riesgo para la formación de depósitos. Se ha observado que en los primeros minutos de porte ya se detectan depósitos de carácter lipídico y con usos de LCs de reemplazo largo se aprecian mayores concentraciones de depósitos proteicos

(9). Existen LCs de uso diario, de uso prolongado (hasta 6 días sin quitar) y de uso continuado (hasta 30 días sin quitar). Dentro del uso diario se clasifican en reemplazo diario, quincenal, mensual, trimestral o incluso anual.

Para LCs de reemplazo no diario es muy importante la solución de mantenimiento (SM). Existen soluciones multipropósito, que limpian y desinfectan las lentillas sin necesidad de frotar, aunque esa acción puede reducir considerablemente la cantidad de depósitos y microorganismos de la lente (10). Se componen de diferentes compuestos clínicos con base de solución salina.

Otros tipos de SM se componen con base de peróxido de hidrógeno, las cuales limpian y desinfectan en profundidad la lente, pero no pueden entrar en contacto con el ojo y deben neutralizarse con una solución salina.

1.2 Depósitos presentes en las lentes de contacto.

La formación de depósitos en las LCs blandas favorecen la contaminación microbiana, generan discomfort y disminuye la calidad visual (11). La adherencia de depósitos está determinada principalmente por el material con el que se han fabricado las LCs, además de la composición de la lágrima del usuario y la SM utilizada.

Se pueden encontrar depósitos orgánicos (lípidos y proteínas), inorgánicos (sales de calcio, magnesio, hierro...), depósitos mixtos, microbianos e intrínsecos de la lente.

- Depósitos lipídicos.

Su composición (formada por hidrógeno, carbono y oxígeno), les da la cualidad de ser apolares y solubles en el agua. Son atraídos a las LCs por el grupo siloxano y suelen proceder de las glándulas sebáceas contenidas en el párpado o de factores externos al no lavarse las manos para manipular las LCs, o introducir cosméticos y productos higiénicos en el ojo. Aportan un aspecto graso a la lente y pueden reducir la agudeza visual con las LCs puestas.

Los componentes lipídicos principales son triglicéridos, ésteres de cera, colesterol, glicolipídicos, lecitinas y fosfolípidos.

- Depósitos proteicos.

Se trata de biomoléculas orgánicas formadas por la unión de cadenas lineales de aminoácidos y enlaces peptídicos. Compuestas principalmente por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. Se unen a las LCs componentes proteicos de la película lagrimal: lisozima, albúmina, IgG, transferrina y lactoferrina (11, 12). El uso de LCs puede modificar la concentración de proteínas en la lágrima, aunque también influye la hora del día, la edad, alteraciones lagrimales o alergias (11).

Se trata de un proceso complejo que depende de la carga de la superficie del material, el contenido en agua, el grado de hidrofilia y la composición de la lágrima. Los aminoácidos hidrófilos (polares) interactúan libremente en el entorno y las cadenas laterales cargadas forman puentes de hidrógeno con una superficie con carga opuesta y aumenta la absorción de las mismas.

La acumulación de estos depósitos es mayor en las LCs HG y son muy visibles ya que crean una capa blanquecina cubriendo la superficie de la lente.

La exposición de las proteínas a SM con base de agua es contraproducente y no ayuda a la eliminación de las mismas ya que las proteínas tienen estructuras metaestables, por eso, es importante realizar limpiezas enzimáticas habitualmente en las LCs.

La lisozima, lactoferrina, inmunoglobulina (IgA) y lipocalina componen los depósitos proteicos más habituales en LCs aunque también hay estudios que confirman la presencia de glicoproteínas, mucoproteínas, lacritina y albúmina (13). La **lisozima** es la proteína depositada predominante en las LCs. Se trata de una proteína que de forma activa presenta actividad antibacteriana, pero al entrar en contacto con las LCs pierde su efectividad y favorece la adherencia de depósitos proteicos. La **lactoferrina** tiene actividad antimicrobiana en la lágrima y a pesar de ser un depósito, actúa de manera efectiva reduciendo la viabilidad bacteriana con la unión a bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas. La **IgA** es un anticuerpo localizado en las mucosas del organismo, actúa como primera línea de defensa ante virus y bacterias, previniendo la adhesión de microorganismos a la superficie ocular. La **lipocalina** se encarga de la tensión superficial de la película lagrimal uniéndose a los lípidos.

1.3 Métodos de detección de depósitos proteicos.

Hay numerosas técnicas de detección de proteínas en las LCs, tanto para medir la cantidad, como la actividad biológica de las proteínas absorbidas (14). Existen métodos *in vivo* e *in vitro*.

- **Lámpara de hendidura** (método *in vivo*).

Este instrumento permite observar la cara anterior de las LCs durante su porte.

Evalúa, de manera subjetiva, los depósitos proteicos que puedan existir sobre la superficie de la LC. El método utilizado es la reflexión especular y categoriza la cantidad de depósito dependiendo del nivel de magnificación utilizado (12, 15).

Luensmann et al. utilizaron este método para identificar lisozimas en las LC Hi-Si (16).

- **Microscopio.**

Se trata de un método subjetivo para conocer la cantidad de depósito proteico que se acumula en las LCs. Con la ayuda de un tinte para proteínas (Azul brillante Cromassie) se analizan las secciones transversales de lentes de contacto congeladas tras su uso a través de un microscopio. Okada et al. en 2006 estudiaron con este método la penetración de proteínas en lentes de contacto (17).

- **Microscopía de fuerza atómica (AFM)**

Con este método se obtienen mediciones cualitativas de las proteínas adsorbidas en las LCs. A través de una sonda de barrido se analiza toda la superficie de la LC creando un mapa topográfico tridimensional donde se pueden localizar los depósitos proteicos, su patrón, espesor e incluso donde se acumula en mayor cantidad.

A pesar de que resulta más complicado al tratarse de una superficie curva, Teichroeb et al. en 2008, consiguieron resultados exitosos para el análisis de LCs (18).

- **Método de absorción ultravioleta.**

Es un método rápido ya que se puede realizar directamente sobre la muestra sin agregar reactivos y sin necesidad de incubarla.

Las proteínas absorben la luz ultravioleta con dos máximos (200 y 280 nm), aunque se ha descubierto que a 280 nm se absorben menos sustancias químicas, por lo que se utiliza más a la hora de cuantificar proteínas. La espectroscopia de absorción implica la absorción de un fotón por un electrón.

- **Cromatografía.**

Es un método de análisis bioquímico, *in vitro*, que consiste en separar en fases los componentes de la muestra estrechamente relacionados. La cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) es un método que permite separar, aislar e identificar los analitos de una mezcla de compuestos químicos (19, 20).

Se sirve de un disolvente líquido a elevada presión como fase móvil, y una fase estacionaria (columna cilíndrica) con partículas de pequeño tamaño (20). Los componentes de la muestra interactúan con la fase móvil y permanecen durante diferentes tiempos según la fase estacionaria con la que presentan afinidad.

Mowrey-McKee et al. en 2012 usaron este método para evaluar la compatibilidad de LCs y con soluciones desinfectantes (21).

- **Microscopía de inmunofluorescencia.**

Es un método de inmunomarcación basada en el uso de anticuerpos que se unen a determinadas proteínas usando fluorocromos para confirmar la presencia de las mismas.

Gudmundsson et al. en 1985 identificaron depósitos proteicos en lentes de contacto con este método (22).

- **Reflectancia total atenuada (FTIR-ATR)**

Se trata de una técnica de muestreo de FTIR (infrarrojos por transformada de Fourier), que mide los cambios producidos en un haz de infrarrojos reflejado internamente, cuando el haz entra en contacto con una muestra para medir la cantidad de proteínas. Castillo et al. en 1985 usaron esta técnica para medir la cantidad de lisozima absorbida por las LC blandas "in vitro" (23).

- **Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Es una técnica que proporciona información sobre el peso molecular y la cantidad de proteína. Con un campo eléctrico y un gel que realiza la función de filtro poroso las proteínas se separan según su tamaño y peso.

Este método fue utilizado en el estudio de Lin et al. en 1991 (24).

Boone et al. en 2009, utilizaron este método para la medida de disposición total de lisozima (25).

- **Espectrofotometría UV.**

Es un método basado en la cantidad de luz absorbida, reflejada o emitida por una muestra, relacionándolo con la cantidad de producto químico contenido. Los resultados se muestran en una gráfica (espectro) de la cantidad de luz frente a las diferentes longitudes de onda (λ).

La espectrometría UV-Visible se basa en la Ley de Beer-Lambert, es decir, en la absorción selectiva de la radiación electromagnética en la región ultravioleta y visible del espectro.

Relaciones la cantidad de absorción de luz de una sustancia con la concentración de la misma en la solución.

Partiendo de una solución diluida de un compuesto, con absorbancia máxima conocida, se mide el valor de absorbancia de diferentes λ frente a un blanco que contiene el disolvente de la solución muestra.

Se utiliza un instrumento llamado espectrofotómetro UV-Vis, que utiliza las regiones de UV (entre 195 y 400 nm) y el Visible (entre 195 y 499 nm), permite calcular los valores de proteína tanto por transmitancia de la luz ultravioleta como por reflectancia. Comparando la diferencia entre la intensidad de luz que se emite a la muestra y la que pasa a través de la muestra se conoce como transmitancia y se expresa en porcentaje.

A partir de la transmitancia, podemos conocer también la absorbancia (parámetro más usado) ya que es el logaritmo negativo de la misma. $A = -\log (\%T)$. A representa la cantidad de luz absorbida por la muestra. Boone et al. En 2009, utilizaron este método para la medición del depósito total de proteínas.

2 JUSTIFICACIÓN DEL TEMA

Los depósitos proteicos en las LCs pueden causar grandes molestias al portador, favorecer la adhesión bacteriana, provocar una respuesta inmunológica y crear deficiencias visuales.

Se pretende analizar en qué tipo de lentillas y en qué proporción se encuentran este tipo de depósitos para favorecer la adaptación de las LCs y evitar en la medida de lo posible los efectos que puedan causar en los usuarios.

3 HIPÓTESIS

La espectrofotometría UV-Visible permite detectar los depósitos proteicos presentes en las LCs usadas.

4 OBJETIVOS

1. Detectar el complejo proteína-colorante a partir de muestras patrón preparadas con compuestos proteicos mediante la técnica de espectrofotometría UV-Visible.
2. Detectar el complejo proteína-colorante a partir de proteínas extraídas de LCs utilizadas mediante espectrofotometría UV-Visible.
3. Cuantificar la concentración de depósitos proteicos presentes en una LC después de su uso mediante la espectrofotometría UV-Visible y el reactivo Bradford.

5 METODOLOGÍA

5.1 Diseño del estudio.

Se planteó un estudio longitudinal de análisis transversal. Se recogieron muestras de LCs a lo largo del curso académico 22-23, que posteriormente fueron analizadas mediante espectrofotometría UV-Visible por transmitancia para la detección de depósitos proteicos gracias a la absorbancia del reactivo de Bradford en la longitud de onda de 595 nm.

Los procedimientos analíticos se llevaron a cabo en el laboratorio del Instituto de Síntesis y Catálisis Homogénea de la Universidad de Zaragoza.

5.2 Selección de las muestras y creación de la base de datos.

Se recogieron muestras de LCs blandas, tanto de material HG como Hi-Si, de voluntarios familiares, amigos y usuarios de varias ópticas. Se contó, además, con muestras recogidas por otro compañero para su TFG por lo que se pudo ampliar la variedad de muestras y decidimos utilizar las provenientes del OD para mi TFG y las del OI para el suyo.

Los criterios de inclusión y exclusión que pusimos fue que hubieran sido usadas un mínimo de 8 horas al día y que aquellas LCs de sujetos que refirieron haber sufrido alguna infección ocular, síntomas de ojo seco o alergia durante el porte no fueron incluidas para el estudio.

A la hora de recoger las muestras, se le asignaba un código numérico a cada LC, de manera que no pudiera relacionarse la muestra con el sujeto, y se apuntaba la edad del paciente, el tipo de lentilla (HG o HiSi), el tiempo de uso que se le había dado (en horas o en días), el material (*Fanfilcon*, *Confilcon...*), el tipo de compensación (Monofocal, multifocal, tórica...) y los síntomas que les habían producido las LCs. Además, en el caso de las mensuales, anotamos también la solución de mantenimiento utilizada.

Con todos los datos recogidos se diseñó una tabla de Excel (Microsoft Office 2007, Microsoft Corporation, Seattle, EEUU), en la que a cada uno de los bloques le correspondía una variable de las anteriormente nombradas.

Tras la extracción de las LC se colocó cada muestra en un tubo *Eppendorf*, evitando el contacto con SM o cualquier otro agente externo que pudiese alterarlas, y se guardaron en el congelador hasta el día del procesamiento.

5.3 Procesamiento de las muestras.

Para la extracción de las proteínas de las LCs, se preparó una disolución de 10 ml que contenía 250 μ l de Acetonitrilo (ACN), 250 μ l de Agua Mili Q (H₂O) y 0,02 ml de ácido Trifluoroacético al 0,2% de volumen (TFA). Una vez preparada, se añadió a cada vial 50 μ l, se mezcló durante 3 minutos aproximadamente en el vórtex y se dejó reposar 24 horas a temperatura ambiente.

El día del análisis, se añadió en cada vial 1 ml del reactivo de Bradford puro ya preparado, se mezcló durante 1 minuto en el vórtex y se dejaba reposar otro minuto. Después, se colocaba una muestra del reactivo de Bradford en una cubeta del espectrofotómetro (CE) y en la otra, se comenzó con una muestra *baseline* (disolvente + Bradford filtrado). Se analizó la longitud de

onda (λ) de 575 nm, que correspondía con el pico de este reactivo, ligado a las proteínas, para obtener los valores de concentración de proteínas que presentaba cada LC.

Partiendo de una muestra con la que se compararon todas las recolectadas. da una de las muestras fue mezclada de nuevo con el vórtex durante 1 minuto antes de recoger una pequeña cantidad de la misma (50 μ l) para depositarla en un Eppendorf nuevo con 1 ml de Bradford diluido y filtrado.

5.4 Curva de calibrado.

Antes del análisis se realizó una curva de calibrado, usada en química analítica para conocer la concentración de compuesto que se encuentran en una disolución. Determina la relación proporcional entre una concentración conocida y una señal analítica determinada, dando lugar a una gráfica.

En la gráfica la masa aparece en el eje “x” y la absorbancia en el “y” y se forma con la fórmula “ $y = mx + b$ ”.

En este caso, se prepararon varias muestras con cantidades conocidas y proporcionales de proteínas con BSA (albúmina de suero bovino). La primera muestra (M1) contenía 2 mg de BSA en 10 ml de H₂O, es decir, una concentración de 200 μ g x ml. La segunda muestra (M2) se formó con 1 ml de M1 con 1 ml de H₂O (100 μ g x ml). En la tercera muestra (M3) se mezcló 1 ml de M2 con 1 ml de H₂O (50 μ g x ml). La M4 contenía 1 ml de M3 con 1 ml de H₂O (25 μ g x ml). Y la M5 contenía 1 ml de M4 con 1 ml de H₂O (12,5 μ g x ml).

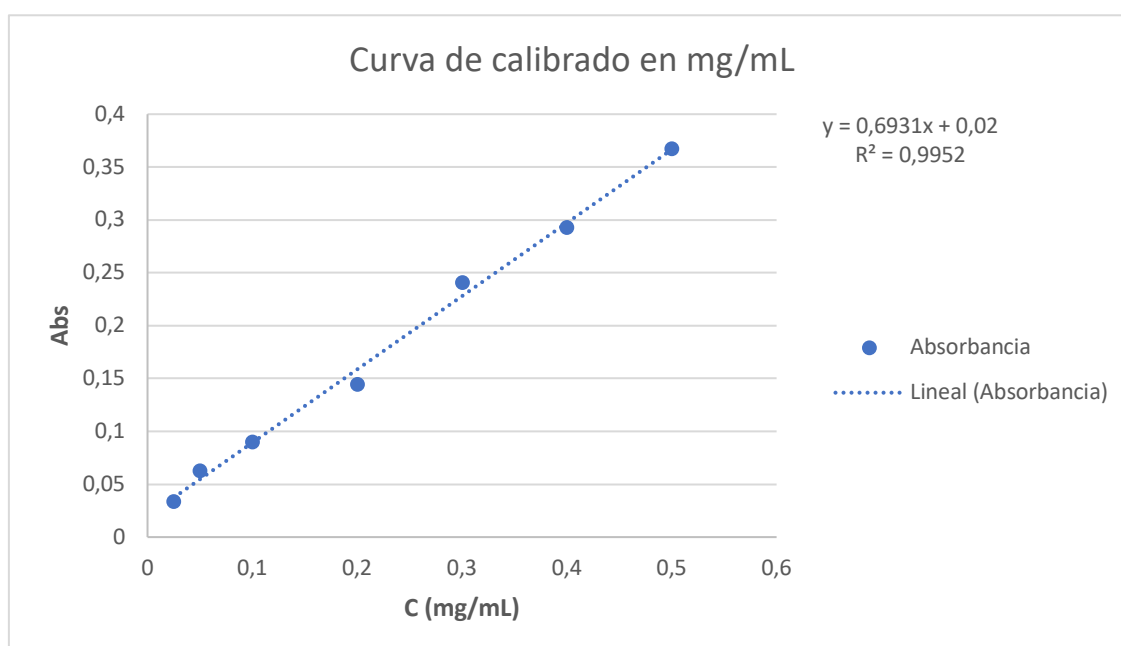


Figura 1. Representación lineal de la curva de calibrado de las muestras patrón.

Consiguiéndose una curva de calibrado lineal (Figura 1) acorde a la ley de Beer Lambert y mediante el ajuste a línea recta se obtuvo los valores $m = 0,6931$ y $b = -0,02$, resultando la ecuación de cálculo: $y = 0,6931x - 0,02$ que relaciona la concentración de la muestra, con las características de la señal de recogida (absorbancia), donde y representa la absorbancia medida a una longitud de onda de 523nm y x representa la concentración de lípidos de las muestras analizadas.

5.5 Obtención de los resultados.

Se obtuvo una representación gráfica correspondiente al espectro de absorbancia de cada muestra analizada en la cual en el eje "x" se representó la λ en (nm) y en el eje "y" los valores de absorbancia en (mg/LC).

Se extrajeron de la base de datos del espectrofotómetro los valores obtenidos en el rango de medida entre 400-690 nm de cada uno de los espectros procesados y se adaptaron a un archivo Excel para realizar su representación gráfica.

Los valores correspondientes a la longitud de onda de 575 nm que representan la "y" de la fórmula obtenida para el cálculo de concentraciones fueron exportados a otro archivo Excel para aplicar la ecuación de ajuste obtenida de la curva de calibrado anteriormente nombrada.

En la cual, el valor despejado "x", es el valor de la concentración de proteína estimada presente en cada muestra.

6 RESULTADOS

Se recogió información sobre el material específico de cada lentilla siendo: 2 muestras de Fanfilcon A, 2 de Senofilcon C, 10 de Senofilcon A, 1 de Somofilcon A, 7 de Etafilcon A, 2 de Verofilcon A, 2 de Letifilcon A y 4 de Nelfilcon A.

6.1 Concentración de proteínas por materiales.

En la figura 2 muestra la concentración de proteína detectada en las LCs según cada material encontrando diferencias significativas entre ellos.

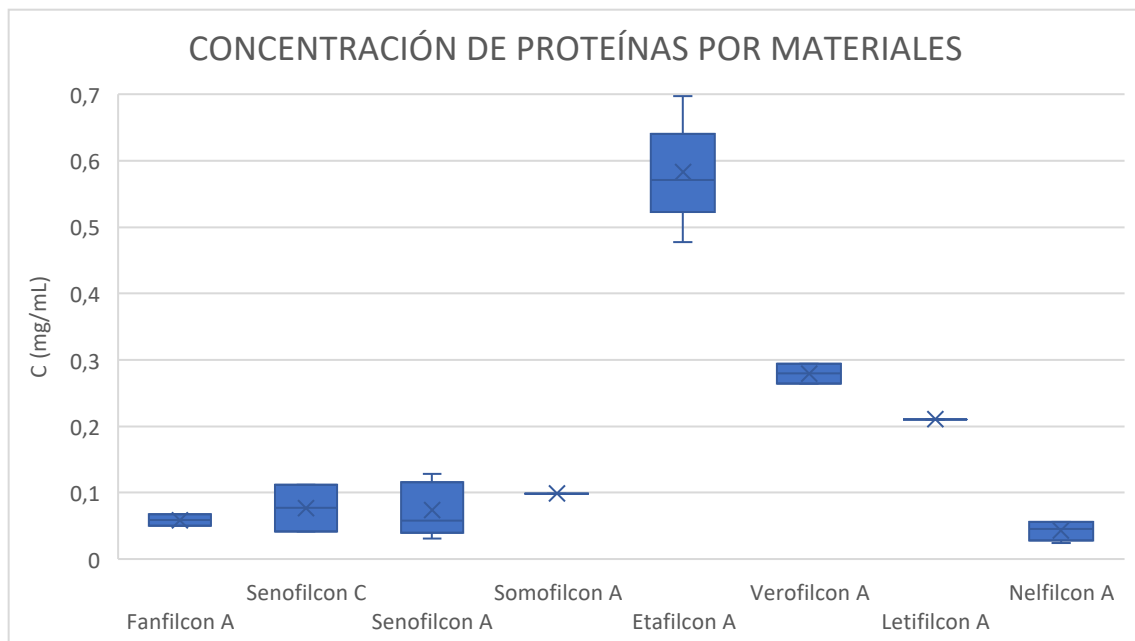


Figura 2. Representación gráfica de la concentración de proteínas de cada material con su desviación standard.

El material Etafilcon A presenta una mayor concentración de depósitos proteicos estadísticamente significativa respecto al resto con un valor de 0,583 mg/LC ($p < 0,05$). Todos los materiales presentan depósitos de proteínas tras su uso.

6.2 Concentración de proteínas Hi-Si vs HG

Del total de 30 LCB, provenientes de diferentes materiales, se agruparon según los dos grandes grupos: de las cuales 17 eran de Hi-Si y 13 eran de HG. La concentración media de proteínas detectada fue significativamente mayor en las de HG $0,370 \pm 0,257$ mg/LC comparándolas con las de Hi-Si $0,091 \pm 0,566$ mg/LC ($p < 0,05$).

Concentración de proteínas (mg/LC)					
<i>LC</i>	n	Concentración mínima detectada	Concentración máxima detectada	Media	Desviación Estandar
<i>Hi-Si</i>	17	0,031	0,211	0,091	$\pm 0,566$
<i>HG</i>	13	0,024	0,697	0,370	$\pm 0,257$

Figura 3. Concentración de proteínas media en cada muestra. Hi-Si= Hidrogel de Silicona. HG= Hidrogel.

Dentro de estos grupos, se encontró más disparidad de concentraciones dentro de las LCs de Hi-Si donde la concentración mínima se detectó en una muestra de Senofilcon A (0,032 mg/LC) y la máxima en una muestra de Letifilcon A (0,211mg/LC). Dentro de las muestras de HG la concentración mínima se analizó en una muestra de Nelfilcon A (0,025 mg/LC) y se analizó mayor concentración en una muestra de Etafilcon A (0,697 mg/LC).

7 DISCUSIÓN

7.1 Comentarios sobre la recogida de muestras.

Uno de los objetivos del trabajo era conocer la concentración de proteínas que había presentes en las LCs usadas, independientemente del tipo de LC que se tratase, por lo que se consideró que cualquier tipo de LC podía ser válida para la investigación.

En el estudio que realizaron para el Libro Blanco de la Salud Visual en España 2022 se conoció que un 64,7% de los usuarios de LCs eran mujeres mientras que el 35,3% eran varones (1). Consiguiendo recolectar para nuestro estudio 30 LCs de diferentes donantes aleatoriamente se logró cierta similitud con la realidad con 73,3% muestras pertenecientes a mujeres y 26,6% a varones y que la media de edad fuese de 30,7 años con voluntarios entre 18 y 60 años.

No se les marcó ningún protocolo para el uso de las LCs ni ninguna condición sobre las SM, de esta forma se intentó que fuera un estudio mucho más real sobre los depósitos de proteína en usuarios de lentes de contacto y a la vez, nos facilitó la recogida de muestras ya que de esta manera se animaron a colaborar mayor número de personas.

Finalmente, se recogieron únicamente LCs de material “blando”, ya que son las más utilizadas entre la población. De esta forma, podríamos conseguir información más relevante e interesante

bajo nuestro punto de vista. Aunque a la hora de procesarlas no se tuvo en cuenta, se anotó el material (Etafilcon A, Fanfilcon A, Senofilcon C, etc.) y si se trataba de lentes de Hi-Si o HG para analizar las distintas concentraciones y poder realizar comparaciones. JJ Nichols et al. realizaron un estudio en 2013 en el que determinaron que el tipo de material del que se componen las LCs influye en la adherencia de proteínas a la superficie de las mismas (26).

Pese a que era conocida, no se tuvo en cuenta la ametropía de los portadores. Puede tratarse de un parámetro a tener en cuenta para futuros estudios, debido a la diferencia de forma geométrica y espesor que puede presentar una LC según el error refractivo y que estas variaciones en el diseño podrían influir en la adherencia de depósitos.

Respecto al tiempo de uso, se recogieron con un mínimo de 8 horas continuadas, independientemente del tipo de remplazo que se tratase dado que tras 8 horas ya puede haber formación de depósitos. Esta duración fue respaldada por el estudio de Omali et al., que a pesar de que asumen que tras pocos minutos de porte, las LCs se recubren rápidamente con los componentes de la película lagrimal, usaron las mismas horas de porte (9). Otros estudios, como el de Hatou et al., sugirieron un periodo más prolongado de 12 a 14 horas de uso (27).

Todas las muestras del estudio fueron recogidas y depositadas en viales inmediatamente después de la extracción del ojo y sin entrar en contacto con SM para evitar la eliminación de depósitos. Dichos viales fueron conservados a una temperatura inferior de -4°C , con la intención de conservar las proteínas en el mejor estado posible, sin la entrada de nuevos microorganismos sabiendo que este procedimiento no iba a alterar los resultados del trabajo ya que había sido usado en otros estudios (28).

7.2 Comentarios sobre la metodología.

Se decidió utilizar la espectrofotometría con el reactivo de Bradford porque era un método usado en otros trabajos para conocer concentraciones de proteínas, además de ser relativamente sencillo, económico y accesible en el laboratorio de Síntesis Química y Catálisis Homogénea de la Universidad de Zaragoza. Luensmann et al. en 2012 (12) o JJ Nichols et al. en 2013 ya mostraron resultados sobre la concentración de proteínas en LCs con este método (26). Además, el colorante "Coomassie G-250" que usamos para teñir la proteína facilita la detección mediante espectrofotometría del complejo proteína-colorante gracias a su alto peso molecular.

Tras una revisión de las diferentes técnicas para cuantificar los depósitos proteicos acumulados en LCs, Hall B et al. en 2017 llegaron a la conclusión de que el método más fiable para medir la cantidad de proteínas adsorbidas en lentes de contacto sea el radiomarcaje con I125. Analiza las muestras en periodos cortos de tiempo pero se requiere tomar medidas para limitar y medir cualquier interacción del trazador de yodo con los materiales (14). Es una técnica mucho más compleja y finalmente no la recomiendan para ensayos clínicos. En la misma revisión se sugieren la SDS-PAGE y ensayos colorimétricos para la medida de proteínas en las LCs.

Se rompieron los enlaces químicos de las proteínas usando ACN y TFA consiguiendo separarlas de las LCs recolectadas siguiendo la misma técnica que usaron Glasier et al. en 2008 (29),

pudiendo haber usado otros reactivos como urea usado en el ensayo de Stapleton et al. en 1998 (30).

El espectrofotómetro se ajustó para las longitudes de onda dentro del rango 400-900 nm ya que con el reactivo con el que trabajamos al entrar en contacto con las proteínas en su forma aniónica presentaba su pico máximo de absorbancia en 595 nm.

Para poder cuantificar los depósitos proteicos de cada muestra era necesario conocer la respuesta del detector ante una muestra de concentración conocida. Para ello realizamos una curva de calibrado. Consiste en una serie de determinaciones espectrofotométricas de muestras que contenían BSA marcada con Bradford en concentración conocida, relacionando las intensidades absorbidas con los datos conocidos. En la gráfica se representó la concentración (eje x) frente a la absorbancia (eje y). La recta quedó definida por una ordenada de origen y una pendiente mediante la ecuación $y = mx + b$. una vez sustituido el valor "y", de absorbancia, podíamos conocer mediante el valor "x" la concentración de proteínas presente en las muestras.

7.3 Comentario sobre los resultados

Se consiguió procesar y analizar correctamente las 30 muestras recogidas durante la recolección de LCs y se comparó mediante distintos métodos estadísticos las diferencias de concentración de proteína, sin tener en cuenta de que las LCs son procedentes de distintas personas y pueden tener composición lagrimal diferente (31). Algo a tener en cuenta para futuros estudios comparando diferentes materiales y marcas de LCs para un mismo ojo.

La idea inicial al conocer los distintos materiales de cada LC era compararlos entre ellos pero al tener una muestra pequeña ($n < 30$) y pese a que se comparó la concentración de proteína en cada LC mediante el método estadístico Anova para conocer si existe una diferencia significativa entre las muestras no se encontró apropiado estudiarlos ya que había grupos con muestras muy pequeñas ($n = 2$) y los resultados no se consideraron fiables (32). A pesar de la poca fiabilidad de este análisis, el material Etafilcon A presenta una mayor concentración de depósitos proteicos estadísticamente significativa respecto al resto. Subbaraman et al. en 2006 o Omali et al. en 2015 compararon depósitos proteicos en diferentes materiales, encontrando mayores concentraciones en Etafilcon A, al igual que nosotros (9, 33). Esta LC perteneciente al grupo de lentes IV según la FDA es de HG y crea gran afinidad con las proteínas de la película lagrimal por su carga negativa y su gran cantidad de grupos ácidos (34).

A través del método estadístico analizamos los valores de concentración mínima y máxima dentro de los dos grandes grupos de LC se analizan sin tener en cuenta el tipo de reemplazo de la lentilla, SM utilizada en el caso de las reutilizables ni composición de la lágrima de cada usuario. Observamos que las LCs de HG presentaban una mayor cantidad de depósitos proteicos de media respecto a las LCs de Hi-Si. Omali et al. en 2015 estudiaron la diferencia de concentración entre diferentes materiales de LCs.

Luensmann et al. en 2012 realizaron comparaciones entre los dos grandes materiales de LCs, Hi-Si e HG, por lo que finalmente se decidió estudiar esta misma comparación (12). Las diferencias que encontramos son estadísticamente significativas, observando una mayor concentración en las de HG 0,370 mg/LC frente 0,091 mg/LC en las de Hi-Si. Comparando las concentraciones

obtenidas en nuestro estudio con otros estudios que analizaron lo mismo con diferentes métodos de medida se puede observar que con el láser confocal de barrido Baines et al. demostraron que las lentes de HG con mayor contenido en agua absorbían mayor cantidad de proteína.

A pesar de que los resultados de nuestro estudio concuerdan con los nombrados anteriormente, se trata de comparaciones aproximadas ya que las concentraciones las medimos en mg/LC mientras que en la mayoría de estudios lo hacen mg/mL.

7.4 Comentarios sobre las limitaciones del estudio.

Al tratarse de un estudio con pocas muestras ($n < 30$) los resultados pueden ser menos fiables, a pesar de ello, los resultados obtenidos concuerdan con los expuestos en estudios ya realizados, pero igualmente sería conveniente haber conseguido mayor número de LCs.

En este caso se recogieron las muestras de manera general a todo el que quisiera participar en el estudio, sin marcar protocolos de uso. Otro enfoque en cuanto a los donantes hubiera sido elegirlos nosotros mismos dictándoles unas pautas de uso y de limpieza con determinadas SM pudiéndose establecer relaciones fiables, una distribución representativa de los usuarios de LCs y además de comparar con otros parámetros, como puede ser la relación entre la cantidad de depósitos y el tipo de solución de limpieza.

Las muestras recogidas pertenecían a personas diferentes con diferente composición lagrimal, pudiendo dar lugar a mayores o menores concentraciones según la lágrima de cada usuario. Sería interesante analizar varias lentillas en un mismo paciente para no influir en la concentración a pesar de que la composición lagrimal también varía dentro de cada persona.

8 CONCLUSIONES

- Primera

La técnica de espectrofotometría UV-visible nos permite detectar el complejo proteína-colorante a partir de muestras patrón preparadas con compuestos proteicos.

- Segunda

La espectrofotometría UV-visible nos permite detectar el complejo proteína-colorante a partir de proteínas extraídas de LCs utilizadas.

- Tercera

Mediante la aplicación de una ecuación de ajuste obtenida de la curva de calibrado a partir de muestras patrón de diferentes concentraciones de proteínas, la espectrofotometría UV-visible nos permite cuantificar la concentración de depósitos proteicos presentes en una LC después de su uso.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Martínez Moral JC, Bielsa Elías A, Fernández Pino B, Gené Sanpedro A, Mainar Andreu E, Merino Rojo LA, et al. Libro Blanco de la Salud Visual en España 2022.
2. StatPearls. 2022.
3. Musgrave CSA, Fang F. Contact Lens Materials: A Materials Science Perspective. *Materials (Basel)*. 2019;12(2).
4. Wolffsohn JS, Dumbleton K, Huntjens B, Kandel H, Koh S, Kunnen CME, et al. CLEAR - Evidence-based contact lens practice. *Cont Lens Anterior Eye*. 2021;44(2):368-97.
5. Ortiz-Toquero S, Martin M, Rodriguez G, de Juan V, Martin R. Success of Rigid Gas Permeable Contact Lens Fitting. *Eye Contact Lens*. 2017;43(3):168-73.
6. Ópticos-Optometristas CGdCd. LIBRO BLANCO DE LA SALUD VISUAL EN ESPAÑA. Optometría SEd, Visual FS, editors 2022.
7. Woods C, Dutta D. Adaptation and adverse responses to contact lens wear. *Cont Lens Anterior Eye*. 2021;44(1):1-2.
8. Stapleton F, Stretton S, Papas E, Skotnitsky C, Sweeney DF. Silicone hydrogel contact lenses and the ocular surface. *Ocul Surf*. 2006;4(1):24-43.
9. Omali NB, Subbaraman LN, Coles-Brennan C, Fadli Z, Jones LW. Biological and Clinical Implications of Lysozyme Deposition on Soft Contact Lenses. *Optom Vis Sci*. 2015;92(7):750-7.
10. Bennet, E. S; Henry, V. A. Clinical manual of contact lenses, Philadelphia, Lippincot Williams & Wilkins, 2009 Tghird edition.
11. Mann A, Tighe B. Contact lens interactions with the tear film. *Exp Eye Res*. 2013;117:88-98.
12. Luensmann D, Jones L. Protein deposition on contact lenses: the past, the present, and the future. *Cont Lens Anterior Eye*. 2012;35(2):53-64.
13. Green-Church KB, Nichols JJ. Mass spectrometry-based proteomic analyses of contact lens deposition. *Mol Vis*. 2008;14:291-7.
14. Hall B, Forrest JA, Jones L. A Review of Techniques to Measure Protein Sorption to Soft Contact Lenses. *Eye Contact Lens*. 2017;43(5):276-86.
15. Castiblanco D, Rodríguez MF, Mayorga MT. Bacilos gram negativos, contaminantes, mas prevalentes en lentes de contacto blandos usados. *Redalyc*. 2007; 1692-8415: 57-66.
16. Luensmann D, Zhang F, Subbaraman L, Sheardown H, Jones L. Localization of lysozyme sorption to conventional and silicone hydrogel contact lenses using confocal microscopy. *Curr Eye Res*. 2009;34(8):683-97.
17. Okada E, Matsuda T, Yokoyama T, Okuda K. Lysozyme penetration in group IV soft contact lenses. *Eye Contact Lens*. 2006;32(4):174-7.
18. Teichroeb JH, Forrest JA, Ngai V, Martin JW, Jones L, Medley J. Imaging protein deposits on contact lens materials. *Optom Vis Sci*. 2008;85(12):1151-64.
19. Josic D, Kovac S. Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography of proteins. *Curr Protoc Protein Sci*. 2010;Chapter 8:8.7.1-8.7.22.
20. Baquero M. Mecanismos y aplicaciones de la cromatografía líquida de alto desempeño. *Serie Química*, 5. 2003.

21. Mowrey-McKee M, Borazjani R, Collins G, Cook J, Norton S. A new method for evaluation of compatibility of contact lenses and lens cases with contact lens disinfecting solutions. *Eye Contact Lens*. 2012;38(1):53-62.
22. Gudmundsson OG, Woodward DF, Fowler SA, Allansmith MR. Identification of proteins in contact lens surface deposits by immunofluorescence microscopy. *Arch Ophthalmol*. 1985;103(2):196-7.
23. Castillo EJ, Koenig JL, Anderson JM, Lo J. Protein adsorption on hydrogels. II. Reversible and irreversible interactions between lysozyme and soft contact lens surfaces. *Biomaterials*. 1985;6(5):338-45.
24. Lin ST, Mandell RB, Leahy CD, Newell JO. Protein accumulation on disposable extended wear lenses. *CLAO J*. 1991;17(1):44-50.
25. Boone A, Heynen M, Joyce E, Varikooty J, Jones L. Ex vivo protein deposition on bi-weekly silicone hydrogel contact lenses. *Optom Vis Sci*. 2009;86(11):1241-9.
26. Nichols JJ. Deposition on silicone hydrogel lenses. *Eye Contact Lens*. 2013;39(1):20-3.
27. Hatou S, Fukui M, Yatsui K, Mochizuki H, Akune Y, Yamada M. Biochemical analyses of lipids deposited on silicone hydrogel lenses. *J Optom*. 2010 Jul;3(3):164–8. doi: 10.1016/S1888-4296(10)70023-6. Epub 2010 Dec 7. PMID: PMC3974282.
28. Saville JT, Zhao Z, Willcox MD, Blanksby SJ, Mitchell TW. Detection and quantification of tear phospholipids and cholesterol in contact lens deposits: the effect of contact lens material and lens care solution. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(6):2843-51.
29. Glasier MA, Keech A, Sheardown H, Subbaraman LN, Jones L. Conformational and quantitative characterization of lysozyme extracted from galyfilcon and senofilcon silicone hydrogel contact lenses. *Curr Eye Res*. 2008;33(1):1-11.
30. Stapleton F, Willcox MD, Morris CA, Sweeney DF. Tear changes in contact lens wearers following overnight eye closure. *Curr Eye Res*. 1998;17(2):183-8.
31. Downie LE, Craig JP. Tear film evaluation and management in soft contact lens wear: a systematic approach. *Clin Exp Optom*. 2017;100(5):438-58.
32. Pigott TD, SpringerLink (Online service). *Advances in Meta-Analysis* [
33. Subbaraman LN, Glasier MA, Senchyna M, Sheardown H, Jones L. Kinetics of in vitro lysozyme deposition on silicone hydrogel, PMMA, and FDA groups I, II, and IV contact lens materials. *Curr Eye Res*. 2006;31(10):787-96.
34. Chatterjee S, Upadhyay P, Mishra M, M S, Akshara MR, N K, et al. Advances in chemistry and composition of soft materials for drug releasing contact lenses. *RSC Adv*. 2020;10(60):36751-77.