

# Presencia de *Acanthamoeba* en superficie ocular en pacientes glaucomatosos

**Trabajo de Fin de Grado**

**Alumna: Marta González González**

**Tutor: José Enrique Piñero Barroso**

**11.04.2016**

**GRADO EN MEDICINA**  
**Curso académico 2015-2016**



Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 <i>La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <a href="http://sede.ull.es/validacion">http://sede.ull.es/validacion</a></i>	
Identificador del documento: 825984	Código de verificación: VDAWVyJ7
Firmado por: <i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de MARTA GONZÁLEZ GONZÁLEZ</i>	Fecha: 21/11/2016 12:09:22
<i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de JOSE ENRIQUE PIÑERO BARROSO</i>	21/11/2016 12:27:45

Agradecimientos

A José E. Piñero Barroso por darme la oportunidad de realizar este trabajo y facilitarme su ayuda en todo momento.  
A Pedro Rocha Cabrera y Jacob Lorenzo Morales por ofrecer su tiempo para hacer posible este estudio.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003  
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 825984

Código de verificación: VDAWVyJ7

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA  
En nombre de MARTA GONZÁLEZ GONZÁLEZ

Fecha: 21/11/2016 12:09:22

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA  
En nombre de JOSE ENRIQUE PIÑERO BARROSO

21/11/2016 12:27:45

## Índice

Abstract	3
Resumen	4
1. Introducción	5
1.1. Amebas de vida libre	5
1.2. <i>Acanthamoeba</i> : ciclo vital, epidemiología, patogénesis.	9
1.3. Glaucoma y tratamiento antiglaucomatoso: el papel de los conservantes en la alteración de la superficie corneal.	12
2. Objetivos	18
3. Materiales y métodos	19
4. Resultados y discusión	22
5. Conclusiones	29
6. Bibliografía	30
Anexos	33

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003  
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 825984

Código de verificación: VDAWVyJ7

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA  
En nombre de MARTA GONZÁLEZ GONZÁLEZ

Fecha: 21/11/2016 12:09:22

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA  
En nombre de JOSE ENRIQUE PIÑERO BARROSO

21/11/2016 12:27:45

### Abstract

**Introduction:** free-living amebae are protozoon widely spread in nature. *Acanthamoeba* is worldwide distributed in sea waters, swimmingpools, air conditioning systems, hospitals, contact lenses or cell cultivation, among others. This ameba is related to clinic pathologies such us granulomatous amebic encephalitis or *Acanthamoeba* keratitis, being this known as a emergent infection. The relationship between *Acanthamoeba* and eye drops in glaucoma diagnosed patiens is our subject of study.

**Objectives:** to determine the presence of *Acanthamoeba* in chronic users of antihypertensive eye drops.

**Methods:** a prospective study is carried out on a group of patients with glaucoma diagnoses applying the Schirmer test. Fourty samples are taken to be cultivated in the laboratory on non-nutrient agar plates. Once cultivation is done, PCR applies.

**Results:** *Acanthamoeba* growth has not been identified, nevertheless bacterium (7,5%) and fungal (5%) growth was observed.

**Conclutions:** we cannot find a relationship between *Acanthamoeba* and chronic use of antihypertensive eyedrops.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003  
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 825984

Código de verificación: VDAWVYJ7

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA  
En nombre de MARTA GONZÁLEZ GONZÁLEZ

Fecha: 21/11/2016 12:09:22

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA  
En nombre de JOSE ENRIQUE PIÑERO BARROSO

21/11/2016 12:27:45

## Resumen

**Introducción:** las amebas de vida libre son protozoos ampliamente diseminados en la naturaleza. *Acanthamoeba*, concretamente, se encuentra distribuida mundialmente en aguas de mar y piscinas, aire acondicionado, hospitales, lentes de contacto y cultivos celulares, entre otros. Esta ameba se relaciona con cuadros clínicos potencialmente graves como la encefalitis amebiana granulomatosa o la queratitis amebiana, siendo esta última una patología emergente. Frente a la acción tóxica que genera la administración crónica de los colirios antiglaucomatosos en la superficie corneal, se estudia la presencia de *Acanthamoeba* en pacientes diagnosticados de glaucoma.

**Objetivo:** determinar la presencia de *Acanthamoeba* en superficie ocular de usuarios crónicos de colirios antiglaucomatosos .

**Métodos:** se realiza un estudio prospectivo de pacientes que acuden a la consulta para el control de la presión intraocular. Mediante tiras estériles, poniendo en práctica el test de Schirmer, se tomarán cuarenta muestras que posteriormente serán procesadas para su estudio microbiológico. Tras el cultivo en placas de agar no nutritivo, se realiza su amplificación por PCR.

**Resultados:** tras la realización del cultivo, no se identificó crecimiento de *Acanthamoeba* ni otra ameba de vida libre. En cambio, sí se apreció crecimiento en cultivos tanto bacteriano en 7,5% de las muestras, como de hongos, en 5%.

**Conclusiones:** no podemos determinar que el efecto tóxico que ejercen los colirios, particularmente los conservantes, sobre la córnea predisponga a la infección por *Acanthamoeba*.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <a href="http://sede.ull.es/validacion">http://sede.ull.es/validacion</a>	
Identificador del documento: 825984	Código de verificación: VDAWVYJ7
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de MARTA GONZÁLEZ GONZÁLEZ	Fecha: 21/11/2016 12:09:22
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de JOSE ENRIQUE PIÑERO BARROSO	21/11/2016 12:27:45

## 1. Introducción

### 1.1 Amebas de vida libre

Las amebas de vida libre son seres vivos pertenecientes al reino Protozoa. Fueron descubiertas por el alemán August Johann Rösel von Rosenhof en 1757, principalmente gracias a la invención del microscopio, que permitió observar microorganismos parásitos que, debido a su pequeño tamaño, no habían podido ser previamente visualizados. No obstante, el estudio de los protozoos empieza tras el descubrimiento de Pasteur, a finales del siglo XIX, que confirmó que las enfermedades pueden ser causadas por una bacteria. Estos trabajos se acompañarían de acontecimientos de vital importancia para el desarrollo del estudio de los microorganismos tales como el descubrimiento de los virus por Pierre Paul Emile Roux, la introducción de los métodos de prevención en enfermedades causadas por microorganismos por Robert Koch y la relación establecida por Patrick Manson entre los vectores y la transmisión de parásitos<sup>1</sup>.

Las infecciones de diversas amebas de vida libre patógenas y oportunistas se han relacionado con enfermedades potencialmente graves en humanos y otros animales. Dentro de ellas señalamos: *Acanthamoeba spp*, *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* y *Entamoeba histolytica*.

Los principales cuadros clínicos asociados a la infección de amebas de vida libre son: meningocefalitis amebiana primaria (MAP), encefalitis amebiana granulomatosa (EAG), queratitis acanthamebiana o amebiana, dermatitis acanthamebiana o acanthamebiasis cutánea y dermatitis asociada a *B. mandrillaris*.

#### 1) Meningoencefalitis amebiana primaria (MAP)

Se trata de una infección producida por *Naegleria fowleri*<sup>2</sup> que desencadena un cuadro agudo y fulminante que afecta a personas inmunocompetentes. La enfermedad se asocia a la previa exposición a aguas de piscinas, aguas termales, estanques o ríos, fundamentalmente durante los meses de verano, y aparece tras un período de entre 3 y 7 días de incubación. Se trata de una infección que afecta con frecuencia a niños o adultos jóvenes que refieren el antecedente de un baño en aguas frescas o estancadas antes del inicio del cuadro. Se ha asumido que los trofozoitos presentes en el agua penetran a

5

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <a href="http://sede.ull.es/validacion">http://sede.ull.es/validacion</a>	
Identificador del documento: 825984	Código de verificación: VDAWVYJ7
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de MARTA GONZÁLEZ GONZÁLEZ	Fecha: 21/11/2016 12:09:22
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de JOSE ENRIQUE PIÑERO BARROSO	21/11/2016 12:27:45

través del neuroepitelio olfatorio ocasionando una meningoencefalitis necrosante y purulenta. No obstante, este hecho no está establecido y la información que tenemos sobre la patogénesis de esta amebiasis se ha recogido de la experimentación animal e *in vitro*. El número de casos publicado en la literatura se ha estimado en 133 en EEUU desde 1962 hasta 2014<sup>3</sup>, y se han registrado casos en Australia, Europa y Asia.

Los síntomas comienzan de forma brusca con fiebre leve y malestar general, que en ocasiones se acompaña de rinitis y odinofagia. Estos síntomas progresan con rapidez apareciendo cefaleas, vómitos, rigidez de nuca y signos de irritación meníngea. El cuadro se prolonga hasta la aparición de desorientación o coma, provocando el fallecimiento del paciente por insuficiencia respiratoria unos diez días después del comienzo de los síntomas. El diagnóstico de esta patología es complicado porque el pequeño número de casos comunicados hace difícil que el personal médico esté familiarizado con la infección. Se debe tener la sospecha clínica e investigar las amebas en las muestras de LCR y muestras fijadas y teñidas con Giemsa, Hematoxilina Eosina o tinción tricrómica, que permite reconocer con facilidad los parásitos teñidos. Las técnicas de inmunofluorescencia pueden ser de utilidad. En cuanto al tratamiento, sólo los pacientes con MAP diagnosticada precozmente tienen posibilidades de ser tratados con éxito. Los fármacos de elección son la combinación de anfotericina B, miconazol y rifampicina<sup>4</sup>.

## 2) Encefalitis amebiana granulomatosa (EAG)

*Balamuthia mandrillaris* y varias especies del género *Acanthamoeba* generan una encefalitis amebiana granulomatosa que, de manera característica, afecta a niños pequeños, pacientes debilitados, desnutridos e inmunocomprometidos. La enfermedad corresponde a una encefalitis necrosante y hemorrágica aguda, subaguda o crónica. La puerta de entrada es el tracto respiratorio o la piel y por vía hematógena alcanza el sistema nervioso central<sup>5</sup>. El reconocimiento de esta enfermedad en las últimas décadas se debe, en gran parte, al estudio del VIH como factor inmunosupresor y al comportamiento de estos parásitos como potenciales agentes oportunistas causantes de infecciones de alta mortalidad y morbilidad.

Las manifestaciones clínicas son variables, pero en la mayoría de los pacientes

6

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <a href="http://sede.ull.es/validacion">http://sede.ull.es/validacion</a>	
Identificador del documento: 825984	Código de verificación: VDAWVYJ7
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de MARTA GONZÁLEZ GONZÁLEZ	Fecha: 21/11/2016 12:09:22
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de JOSE ENRIQUE PIÑERO BARROSO	21/11/2016 12:27:45

se presenta como una encefalopatía focal o difusa con signos de irritación meníngea cuyos síntomas más comunes son: alteraciones del estado mental, letargo, cefalea, hemiparesias y meningismo. También puede acompañarse de fiebre, náuseas, vómitos, anorexia, ataxia y afasia e incluso lesiones cutáneas ulceradas.

El diagnóstico de EAG se realiza por sospecha clínica en base a la historia del paciente y sus síntomas, y se confirma con la identificación de la ameba en cultivos y muestras de LCR. El empleo de tinciones como la Hematoxilina Eosina, Giemsa, Papanicolaou y tinciones tricómicas son de utilidad a la hora de demostrar la existencia de trofozoitos. Sin embargo, en la actualidad no existe un tratamiento efectivo para esta enfermedad, aunque el más aceptado es la combinación de ketoconazol, rifampicina y cotrimoxazol<sup>6</sup>.

### 3) Dermatitis acanthamebiana (DA)

La dermatitis acanthamebiana o acanthamebiasis cutánea (DA) es una inusual infección oportunista de la piel producida por *Acanthamoeba*. Puede ser primaria o secundaria a una infección diseminada (por ejemplo, puede acompañar o preceder en meses a la encefalitis amebiana granulomatosa). Ha sido descrita en individuos inmunocompetentes, pero afecta sobre todo a inmunocomprometidos, ya sea por desnutrición, patologías cuyo tratamiento se basa en una terapia inmunodepresora, pacientes oncológicos, y, en especial, enfermos de VIH. Las lesiones corresponden a procesos inflamatorios que afectan la epidermis, dermis e hipodermis, de características granulomatosas, y en las que se aprecia un componente necrosante, fundamentalmente en las lesiones ulceradas y extensas. En la forma diseminada de la infección se han observado afectaciones en SNC, piel, riñón, próstata, útero y otras localizaciones inusuales como hueso, senos paranasales y oído<sup>7</sup>. El tratamiento de elección para esta patología consiste en tratamiento tópico con itraconazol, 5-flucitosina, ketoconazol y clorhexidina.

La mortalidad descrita de la dermatitis acanthamebiana sin compromiso del SNC es de aproximadamente un 73%; mientras que cuando está afectado el encéfalo, llega al 100%<sup>8</sup>.

7

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 <i>La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <a href="http://sede.ull.es/validacion">http://sede.ull.es/validacion</a></i>	
Identificador del documento: 825984	Código de verificación: VDAWVYJ7
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de MARTA GONZÁLEZ GONZÁLEZ	Fecha: 21/11/2016 12:09:22
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de JOSE ENRIQUE PIÑERO BARROSO	21/11/2016 12:27:45

#### 4) Queratitis amebiana

Los primeros casos de queratitis por el género *Acanthamoeba* fueron publicados por Nagington y cols. en 1974, en Gran Bretaña, y por Jones y cols. en 1975, en EEUU. La queratitis se corresponde con un proceso inflamatorio crónico producido por *Acanthamoeba* spp, que afecta en primer lugar a la córnea y posteriormente puede extenderse a conjuntiva y otras estructuras oculares produciendo una queratitis necrosante progresiva que sólo se ha visto en humanos, cerdos o hamsters, siendo otros animales refractarios a la infección. Los síntomas de presentación derivan de una úlcera o abrasión corneal. Comienza con dolor creciente, epífora y fotofobia, y avanza generando un marcado deterioro de la agudeza visual que puede finalizar en ceguera. El examen ocular revela enrojecimiento y defectos del epitelio corneal, que pueden volverse persistentes y profundizar hasta dañar las subsecuentes estructuras oculares.

Una de las características distintivas de este cuadro con respecto a otros producidos por amebas y comentados anteriormente, es que se trata de una infección que afecta sin distinción a individuos inmunocompetentes e inmunocomprometidos. El principal factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad es el uso de lentes de contacto, aunque también se ha asociado a traumatismos corneales. Las lentes de contacto alteran el epitelio corneal mediante abrasiones<sup>9</sup> y cambios en la actividad fisiológica y metabólica celular, que son el primer paso para que se produzca la infección por *Acanthamoeba*, pues sin daño corneal previo es muy poco probable que tenga lugar este proceso. Gracias a diversos defectos, por tanto, el parásito logra introducirse en el epitelio y contacta con la glicoproteína manosa, que es la que le permite adherirse a las células epiteliales y penetrar en el estroma corneal. En conclusión, las lentes funcionan como vehículo de transmisión y entrega de la *Acanthamoeba* a la superficie ocular. Todo ello se ve favorecido, además, por la gran afinidad que presenta esta ameba por la superficie de las lentes de contacto (principalmente blandas, algo que se atribuye al tipo de polímero de silicio que conforma las lentes de hidrogel de silicona)<sup>10,11</sup>. Se calcula que la adhesión de la ameba tiene lugar en los diez primeros segundos después de la exposición<sup>12</sup>, no obstante, se verá beneficiada por tiempos de exposición prolongados y concentraciones de inóculo mayores<sup>13,14</sup>.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <a href="http://sede.ull.es/validacion">http://sede.ull.es/validacion</a>	
Identificador del documento: 825984	Código de verificación: VDAWVYJ7
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de MARTA GONZÁLEZ GONZÁLEZ	Fecha: 21/11/2016 12:09:22
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de JOSE ENRIQUE PIÑERO BARROSO	21/11/2016 12:27:45

Si no se sospecha el diagnóstico, el tratamiento convencional conlleva un mayor deterioro en un periodo que abarca desde semanas a varios meses, en especial si se ha instaurado una terapia corticoesteroides. El diagnóstico puede realizarse por los siguientes medios: biopsia, cultivos, PCR<sup>15</sup>, hibridación *in situ* fluorescente<sup>16</sup> o citometría de flujo.

Con respecto al tratamiento, algunos pacientes han sido tratados con éxito, pero aún se carece de un tratamiento óptimo. Son de elección las biguanidas (clorhexidina al 0,02%) o polihexametilenbiguanida (0,02%) asociadas o no a diamidinas como el isetionato de propamidina (Brolene®) al 1% o la hexamidina al 1%. Recientemente se ha descrito el papel de las estatinas (atorvastatina, fluvastatina y simvastatina) y voriconazol en el tratamiento de la *Acanthamoeba*, tanto en su forma quística como vegetativa<sup>17</sup>. Cuando ha habido una extensa destrucción corneal es necesario realizar una queratoplastia con injerto o trasplante de córnea<sup>18</sup>.

La queratitis amebiana ha comenzado a constituir una infección importante, estimándose que existen entre 1 y 33 casos por millón de personas (todas ellas portadoras de lentes de contacto) al año en EEUU.

#### 1.2. *Acanthamoeba*: ciclo vital, epidemiología, patogénesis.

El protozoo *Acanthamoeba* fue descrito por primera vez en 1930 por A. Castellani tras observar su desarrollo en cultivos de levaduras de *Cryptococcus paraosus*<sup>19</sup>, pero no fue hasta 1958 cuando se demostró el potencial patogénico de estas amebas en animales. El responsable de ello, Clyde Culbertson, le indujo una encefalitis a ratones tras la inoculación de *Acanthamoeba* que contaminaba las células en cultivo durante la producción de la vacuna contra la poliomielitis. Los primeros casos de los que se tiene constancia de la presencia de este parásito datan de 1948 y 1960. En el primer caso, un soldado japonés de 22 años murió en Nueva Guinea a causa de un parásito similar a *Iodamoeba buetschlii*<sup>20</sup>, según se registró en la autopsia. Con posterioridad, este agente fue considerado como *Naegleria* y *Acanthamoeba*. El segundo caso de infección humana tuvo lugar en Arizona. J.W. Kernoham y col. publicaron el caso de una niña de 6 años de edad que falleció por una lesión cerebral a causa de un patógeno descrito como *I. buetschlii*, que después se corrigió a *Acanthamoeba spp*<sup>21</sup>. Ambos casos, y sus correspondientes correcciones, se deben a

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <a href="http://sede.ull.es/validacion">http://sede.ull.es/validacion</a>	
Identificador del documento: 825984	Código de verificación: VDAWVYJ7
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de MARTA GONZÁLEZ GONZÁLEZ	Fecha: 21/11/2016 12:09:22
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de JOSE ENRIQUE PIÑERO BARROSO	21/11/2016 12:27:45

ulteriores comprobaciones realizadas que permitieron reconocer la capacidad patogénica de las amebas de vida libre.

#### 1) Ciclo vital de *Acanthamoeba*

El ciclo de vida de las diferentes especies de *Acanthamoeba* presenta dos estadios diferenciados: una forma vegetativa o trofozoito y una forma quística.

Los trofozoitos son irregulares y presentan múltiples proyecciones pseudopodiales retráctiles, filamentosas o espinosas llamadas acantopodios. Su tamaño varía en función de la especie, siendo el promedio de 20 a 40  $\mu$ . El citoplasma es abundante, de aspecto granular y vacuolar y contiene un núcleo claro, central y esférico, con un prominente y denso nucleolo redondeado. El trofozoito es la forma infectante, metabólicamente activa, y se alimenta por fagocitosis de bacterias, algas y levaduras a través de sus pseudópodos. También pueden hacerlo por medio de la captación de nutrientes disueltos en el ambiente por pinocitosis<sup>22</sup>.

Los quistes de *Acanthamoeba* son esféricos o poligonales y tienen una doble pared<sup>23</sup>. La parte exterior es el ectoquiste, compuesto por proteínas y polisacáridos, y la interna es el endoquiste, que posee celulosa<sup>24</sup>. Su tamaño es variable, pero por lo general abarcan de 15 a 25  $\mu$ m. El citoplasma es granular y contiene numerosas vacuolas distribuidas alrededor del núcleo. La formación del quiste ocurre bajo condiciones ambientales adversas tales como la falta de alimento, la desecación o los cambios de temperatura y de pH. Estos quistes permanecerán inmóviles, perdiendo su movimiento característico pseudopoidal, y metabólicamente inactivos siempre que las condiciones sean desfavorables, dando como resultado un proceso denominado enquistamiento. Cuando el ambiente resulta apropiado para la reproducción y alimentación, se reanuda la actividad por un proceso llamado exquistamiento o desenquistamiento, pasando el quiste de un estado latente a un estado metabólicamente activo. Es por ello que podemos concluir que las amebas tienen la capacidad de transformarse en quistes inactivos con la finalidad de sobrevivir en un ambiente hostil y resurgir, cuando se den las condiciones óptimas, como trofozoitos.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <a href="http://sede.ull.es/validacion">http://sede.ull.es/validacion</a>	
Identificador del documento: 825984	Código de verificación: VDAWVyJ7
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de MARTA GONZÁLEZ GONZÁLEZ	Fecha: 21/11/2016 12:09:22
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de JOSE ENRIQUE PIÑERO BARROSO	21/11/2016 12:27:45

## 2) Epidemiología

El número de infecciones causadas por *Acanthamoeba* es relativamente bajo, a pesar de la distribución mundial del parásito, pues se trata de uno de los protozoos más frecuentes encontrados en la naturaleza. Se ha aislado en tierra, polvo, aire, agua dulce natural y tratada, agua de mar, piscinas<sup>25</sup>, aguas residuales, sedimentos, aire acondicionado, hospitales, lentes de contacto y cultivos celulares. Se ha hallado en la vegetación y en animales, incluyendo especies de peces, anfibios, reptiles y mamíferos (ovejas, perros, monos y caballos). Asimismo, se ha vinculado a la superficie epitelial de la cavidad nasal en humanos inmunocompetentes<sup>26,27,28</sup> e inmunosuprimidos<sup>29</sup>. La puerta de entrada puede ser múltiple, pero se asocia a fisuras de la piel que se han contaminado del suelo o a aspiraciones de quistes que son propagados por el aire y penetran a través de las vías respiratorias. Una vez que esto ocurre, las amebas circulan por la vía hematogena hasta alojarse en el sistema nervioso central y otros órganos. Además de infecciones sistémicas, producen queratitis amebiana, infección en la que el parásito penetra en la superficie corneal, en su mayoría, a causa de un traumatismo de la córnea previo o del incumplimiento en la higiene y uso de las lentes de contacto blandas (éstas predisponen a escoriaciones, traumatismos accidentales durante su colocación y anoxia). Del mismo modo, los estuches de lentes que no se limpian con frecuencia pueden abocar en el desarrollo de biopelículas bacterianas que son una fuente de alimento para las amebas. En el año 2004 se estimó un número de casos de queratitis por *Acanthamoeba*, en todo el mundo, mayor de 3000<sup>30</sup>.

Se han descrito diecisiete especies de *Acanthamoeba*, pero sólo cinco se han asociado a infecciones sistémicas en el hombre: *A. polyphaga*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti* y *A. healyi*.

## 3) Patogénesis de la infección por *Acanthamoeba*

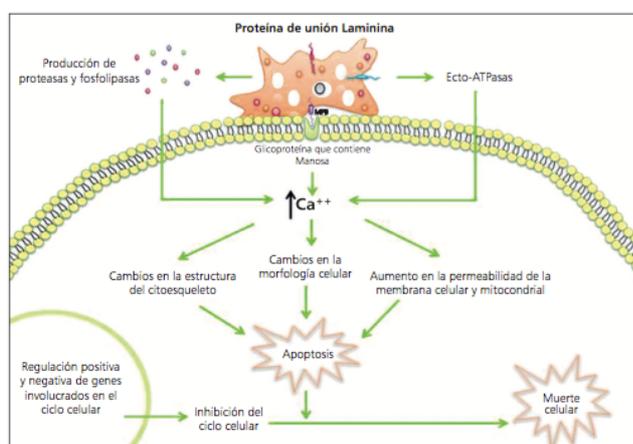
La patogénesis de la *Acanthamoeba* es un proceso complejo que requiere la coexistencia de diversos factores para que se desencadene la enfermedad. Cuando el parásito logra penetrar en el epitelio corneal expresa una proteína transmembranal de aproximadamente 400 kDa denominada *Mannose-binding protein* (MBP), que le permite adherirse a las células huésped por medio de la unión a glicoproteínas que contienen manosa y se encuentran en estas células diana. Se trata de una proteína

11

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <a href="http://sede.ull.es/validacion">http://sede.ull.es/validacion</a>	
Identificador del documento: 825984	Código de verificación: VDAWVyJ7
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de MARTA GONZÁLEZ GONZÁLEZ	Fecha: 21/11/2016 12:09:22
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de JOSE ENRIQUE PIÑERO BARROSO	21/11/2016 12:27:45

constituida por múltiples subunidades de 130 kDa y cuya secuencia contiene 6 exones y 5 intrones<sup>31</sup>. Esta MBP contiene en su matriz extracelular la proteína de unión a laminina, cuya unión inicial conlleva la subsecuente producción de enzimas hidrolíticas, proteasas y fosfolipasas, que producen un efecto citopático y genera un aumento de la concentración de  $Ca^{2+}$ . El aumento de  $Ca^{2+}$  altera la estructura del citoesqueleto, la permeabilidad de la membrana celular y mitocondrial, la morfología celular y, finalmente, provoca la muerte de la célula huésped por apoptosis. De este modo penetran las amebas invadiendo el estroma corneal.

Este parásito también ejerce su acción patogénica bloqueando genes importantes en el proceso de división celular, lo que induce la muerte de la célula y evita la regeneración tisular.



Resumen de la patogénesis de *Acanthamoeba* (imagen tomada de Castrillón, J. C. y Orozco, L. P. (2013). *Acanthamoeba spp.* como parásitos patógenos y oportunistas. *Rev. Chilena Infecto.* (30/2), 147-155.

### 1.3. Glaucoma y tratamiento antiglaucomatoso: el papel de los conservantes en la alteración de la superficie corneal.

La mayoría de los fármacos hipotensores oculares se administran por vía tópica en forma de colirios (formulación que se instila en el ojo para fines diagnósticos o terapéuticos en forma líquida). Una vez que el colirio es distribuido en el ojo, se va a combinar con la película lagrimal precorneal, manteniéndose las moléculas del fármaco en contacto con el epitelio corneal. Sólo un porcentaje del 1 al 5% de principio activo

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <a href="http://sede.ull.es/validacion">http://sede.ull.es/validacion</a>	
Identificador del documento: 825984	Código de verificación: VDAWVYJ7
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de MARTA GONZÁLEZ GONZÁLEZ	Fecha: 21/11/2016 12:09:22
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de JOSE ENRIQUE PIÑERO BARROSO	21/11/2016 12:27:45

penetra en los tejidos intraoculares. Esta absorción dependerá de:

- A. Del peso molecular del principio activo: si es mayor, menor será su absorción.
- B. De las características físico-químicas del colirio (lipofilia, hidrofilia).
- C. De la integridad del epitelio corneal.

La administración tópica puede ser en forma de multidosis o de monodosis. Los que se presentan en envases multidosis llevan un conservante que evita su contaminación por microorganismos. El más utilizado es el cloruro de benzalconio (CBA, derivado del amonio cuaternario), cuya concentración varía en función del preparado del que se trate. Los estudios experimentales y clínicos tienen en los conservantes el principal factor que altera la superficie ocular, produce cambios en la película lagrimal, genera lesiones en el epitelio córneo conjuntival y metaplasia conjuntival. Asimismo, pacientes que fueron tratados de forma crónica con antiglaucomatosos con conservantes mostraron infiltración de la conjuntiva de células inflamatorias (linfocitos, macrófagos), en cambio, esto no se observó en pacientes que fueron tratados con antiglaucomatosos sin conservante<sup>32,33</sup>. Las modificaciones histopatológicas reportadas de estos fármacos con conservante se resumen en<sup>34</sup>:

- Reducción del número de células mucosas (células caliciformes).
- Queratinización epitelial.
- Metaplasia escamosa.
- Pérdida de microvellosidades.
- Aumento del número de desmosomas.
- Distrofia bullosa del epitelio.
- Aumento del número de fibroblastos subepiteliales.
- Fibrosis subepitelial.
- Reducción de los espacios intravasculares.
- Aumento de linfocitos y plasmocitos subepiteliales.
- Engrosamiento de la membrana basal.

El mecanismo exacto que produce los cambios inflamatorios y la toxicidad por parte de los conservantes no está determinado, pero diferentes estudios señalan que el uso de colirios sin conservantes (fundamentalmente CBA)<sup>35,36</sup> evita el desarrollo de enfermedades oculares concomitantes, tales como hiperemia conjuntival, disminución de la producción y función de la lágrima y queratitis punteada superficial. El CBA

13

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 <i>La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <a href="http://sede.ull.es/validacion">http://sede.ull.es/validacion</a></i>	
Identificador del documento: 825984	Código de verificación: VDAWVyJ7
Firmado por: <i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de MARTA GONZÁLEZ GONZÁLEZ</i>	Fecha: 21/11/2016 12:09:22
<i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de JOSE ENRIQUE PIÑERO BARROSO</i>	21/11/2016 12:27:45

resulta tóxico para las células de forma dosis dependiente. Para evitar sus efectos se han desarrollado presentaciones sin conservantes, bien en monodosis o en multidosas, que impiden la contaminación del colirio gracias a una membrana porosa (ABAK®, Thea®) o por otros mecanismos (COMOD ®) y mejoran la adherencia al tratamiento por parte de los usuarios.

Existen tres conservantes cuyos efectos adversos parecen menores que el CBA: Purite ® (complejo de oxi-cloro), Polyquad® (polyquaternium-1, derivado del amonio cuaternario) y SofZia® (tampón iónico)<sup>37</sup>.

Los fármacos antiglaucomatosos y sus respectivos conservantes se detallan a continuación:

<b>Categoría farmacológica</b>	<b>Principio Activo</b>	<b>Nombre comercial</b>	<b>Conservante (y concentración)</b>
<b>Derivados de las prostaglandinas</b>	Bimatoprost 0,01%	Lumigan 0,1 ®	CBA 0,02%
		Lumigan 0,3 ®	CBA 0,005%
	Latanoprost 0,005%	Xalatan ®	CBA 0,02%
		Monoprost ®	No contiene
		Latanoprost ®	CBA 0,02%
	Tafluoprost 0,0015%	Saflutan ®	No contiene
	Travoprost 0,004%	Travatan ®	Polyquad
<b>Parasimpaticomiméticos</b>	Pilocarpina	Pilocarpina 2% ®	CBA 0,01%

14

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 <i>La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <a href="http://sede.ull.es/validacion">http://sede.ull.es/validacion</a></i>	
Identificador del documento: 825984	Código de verificación: VDAWVYJ7
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de MARTA GONZÁLEZ GONZÁLEZ	Fecha: 21/11/2016 12:09:22
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de JOSE ENRIQUE PIÑERO BARROSO	21/11/2016 12:27:45

		Isoptocarpina 1% ®	CBA 0,01%	
<b>Betabloqueantes (No selectivos)</b>	Maleato de Timolol 0,25 – 0,5%	Timofтол ® 0,25- 0,5%	CBA 0,011%	
		Timabak ® 0,25- 0,5%	No consta	
		Timolol ®	No consta	
		Cusimolol ® 0,25- 0,5%	CBA 0,01%	
	Maleato de timolol 0,1%	Timogel 0,1% ®	CBA 0,005%	
	Levobunolol 0,5%	Betagan ®	CBA 0,001%	
	Carteolol 1 – 2%	Elebloc 1 – 2% ®	CBA 0,005%	
			Mikelan ® 1 – 2%	CBA 0,005%
			Arteoptic ® 1-2%	CBA 0,01%
			Arteoptic ® 2%	No contiene
<b>(Selectivos Beta 1)</b>	Betaxolol 0,25- 0,5%	Betotic 0,25 ®	CBA 0,01%	
<b>Alfa agonistas (selectivos)</b>	Apraclonidina 0,5- 1%: 0,5%	Iopimax 0,5% ®	CBA 0,01%	

15

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <a href="http://sede.ull.es/validacion">http://sede.ull.es/validacion</a>	
Identificador del documento: 825984	Código de verificación: VDAWVYJ7
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de MARTA GONZÁLEZ GONZÁLEZ	Fecha: 21/11/2016 12:09:22
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de JOSE ENRIQUE PIÑERO BARROSO	21/11/2016 12:27:45

		Iopimax 1% ®	No contiene
	Brimonidina 0,2%	Alphagan ®	CBA 0,005%
		Brimonidina ®	CBA 0,005%
<b>Inhibidores de la Anhidrasa Carbónica</b>	Brinzolamida 1%	Azopt ®	CBA 0,01%
	Dorzolamida 2%	Trusopt ®	CBA 0,0075%
		Dorzolamida 2% ®	CBA 0,0075%
<b>Combinaciones de fármacos</b>	Bimatoprost 0,01% - Timolol 0,5%	Ganfort ®	CBA 0,005%
	Brimonidina 0,2% - Timolol 0,5%	Combigan ®	CBA 0,005%
	Brinzolamida 1% - Timolol 0,5%	Azarga ®	CBA 0,1%
	Dorzolamida 2% - Timolol 0,5%	Cosopt ®	CBA 0,0075%
		Cosopt PF ®	No contiene
		Dorzolamida/timolol ®	CBA 0,0075%
	Latanoprost	Xalacom ®	CBA 0,02%

16

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <a href="http://sede.ull.es/validacion">http://sede.ull.es/validacion</a>	
Identificador del documento: 825984	Código de verificación: VDAWVyJ7
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de MARTA GONZÁLEZ GONZÁLEZ	Fecha: 21/11/2016 12:09:22
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de JOSE ENRIQUE PIÑERO BARROSO	21/11/2016 12:27:45

	0,005% - Timolol 0,5%		
		Latanoprost/timolol ®	CBA 0,02%
	Travoprost 0,004% - Timolol 0,5%	Duotrav ®	Polyquad

17

<p>Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003  La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <a href="http://sede.ull.es/validacion">http://sede.ull.es/validacion</a></p>	
Identificador del documento: 825984	Código de verificación: VDAWVyJ7
Firmado por: <i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> En nombre de <i>MARTA GONZÁLEZ GONZÁLEZ</i>	Fecha: 21/11/2016 12:09:22
<i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> En nombre de <i>JOSE ENRIQUE PIÑERO BARROSO</i>	21/11/2016 12:27:45

## 2. Objetivos

El presente estudio tiene como objetivo principal determinar si la administración crónica de colirios antihipertensivos en la superficie ocular para el tratamiento del glaucoma favorece la presencia de *Acanthamoeba*. Asimismo, se pretende comprobar otra serie de factores como:

- El papel de los colirios antiglaucomatosos como posibles factores desencadenantes de la infección por *Acanthamoeba*.
- De los fármacos más empleados, cuál se asocia a un mayor crecimiento de *Acanthamoeba*.
- Determinar el genotipo prevalente de *Acanthamoeba* en las muestras.
- Exponer otros posibles métodos de recogidas de muestras.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 <i>La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <a href="http://sede.ull.es/validacion">http://sede.ull.es/validacion</a></i>	
Identificador del documento: 825984	Código de verificación: VDAWVj7
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de MARTA GONZÁLEZ GONZÁLEZ	Fecha: 21/11/2016 12:09:22
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de JOSE ENRIQUE PIÑERO BARROSO	21/11/2016 12:27:45

### 3. Material y métodos

- a) Diseño del estudio: estudio prospectivo experimental tipo ensayo clínico.
- b) Sujetos del estudio: el tamaño muestral del estudio fue de 40 muestras tomadas de 20 pacientes.

En este estudio se trabajó con pacientes diagnosticados previamente (por el facultativo responsable) de glaucoma cuando acudieron a su cita de control de la presión intraocular en el servicio de oftalmología. Para investigar la existencia de *Acanthamoeba* se utilizaron, para la recogida de muestras, tiras de papel de Schirmer (*Test de Schirmer Plus*®). A su vez se especificó, en la ficha de cada paciente, la edad, el género y las enfermedades oculares concomitantes, si las había.

#### *Criterios de inclusión*

Se incluyeron en el estudio los pacientes que cumplieron los siguientes requisitos:

- Consentimiento informado firmado (el paciente acepta entrar de forma libre y voluntaria al estudio).
- Edad comprendida entre 55 y 85 años.
- Diagnóstico definitivo previo de glaucoma que requiere el uso de colirios hipotensores para su regulación.

#### *Criterios de exclusión*

No se incluyeron en este estudio individuos sin patología glaucomatosa, ya que el objetivo principal de la investigación es determinar si el uso de colirios antiglaucomatosos predispone a la infección por *Acanthamoeba*. Tampoco se incluyeron aquellos individuos portadores de lentes de contacto, pues se trata del principal factor de riesgo para padecer la infección.

A los pacientes que cumplieron todos los criterios de inclusión, y ninguno de exclusión, se les solicitó el consentimiento informado por escrito.

- c) Variables del estudio.

La variable principal del estudio es la existencia de *Acanthamoeba* en pacientes

19

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <a href="http://sede.ull.es/validacion">http://sede.ull.es/validacion</a>	
Identificador del documento: 825984	Código de verificación: VDAWVyJ7
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de MARTA GONZÁLEZ GONZÁLEZ	Fecha: 21/11/2016 12:09:22
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de JOSE ENRIQUE PIÑERO BARROSO	21/11/2016 12:27:45

glaucomatosos que usan colirios para controlar la presión intraocular.

Las variables secundarias son:

- Ojo en el que se realiza la toma de muestra (derecho o izquierdo).
- Sexo.
- Edad.
- Utilización de humectante ocular.
- Presencia de patología de superficie ocular: blefaritis estafilocócica, blefaritis seborreica, queratoconjuntivitis sicca, conjuntivitis alérgica y triquiasis. Para la determinación de la sequedad ocular se tiene en cuenta el BUT o tiempo de ruptura lagrimal (si es inferior a cinco segundos será patológica).
- Se determina la presión intraocular.
- Uso de lentes de contacto.
- Uso de tratamientos tópicos no humectantes de forma recurrente (fármacos antiglaucomatosos u otros).
- Cirugía previa oftálmica (cataratas, cirugía palpebral).
- Presencia de obstrucción de vía lagrimal.
- Colirio utilizado para regular la presión intraocular: betabloqueantes, agonista alfa adrenérgicos, inhibidores de la anhidrasa carbónica, prostaglandinas, combinación betabloqueantes - prostaglandinas, combinación betabloqueantes - alfaadrenérgicos.
- Método de la toma de la presión intraocular: tonómetro de Perkins o tonómetro de Goldmann.

d) Obtención y manejo de muestras.

En la recogida de muestras se procedió a tomar una muestra por paciente. Para ello se siguió la siguiente metodología:

- Antes de la toma de muestra nos poníamos guantes estériles (se cambiarían con cada nuevo paciente).
- No se utilizó antiséptico local en superficie ocular ni en borde palpebral, pues tratamos de conservar la flora propia del paciente.
- Se procedía a colocar la tira de Schirmer en el tercio externo del párpado

20

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 <i>La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <a href="http://sede.ull.es/validacion">http://sede.ull.es/validacion</a></i>	
Identificador del documento: 825984	Código de verificación: VDAWVyJ7
Firmado por: <i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de MARTA GONZÁLEZ GONZÁLEZ</i>	Fecha: 21/11/2016 12:09:22
<i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de JOSE ENRIQUE PIÑERO BARROSO</i>	21/11/2016 12:27:45

inferior, en saco conjuntival, con pinzas estériles. Es importante que no se contacte con la piel del párpado inferior, para evitar la contaminación y que la toma sea únicamente ocular. No se empleó anestésico durante este proceso (*Test de Schirmer tipo I*), garantizando de esta forma que la muestra tomada pertenece a la flora conjuntival del paciente. La tira permanecía cinco minutos impregnándose de las lágrimas del paciente. Pasado el tiempo recomendado, se retiraba la tira con pinzas estériles y se introducía en tubos estériles, con la finalidad de ser procesadas para su estudio microbiológico.



Test de Schirmer.

e) Estudio en laboratorio

Tras la toma de muestras se procedía al estudio de la presencia o no de *Acanthamoeba*. Para ello se cultivaba, en primer lugar, la tira de Schirmer en placas de agar no nutritivo. Se determinaba también si existe crecimiento fúngico en la muestras. Posteriormente se procede a la caracterización molecular de las amebas de vida libre.

*Aislamiento y cultivo de las amebas.*

Las tiras obtenidas mediante el test de Schirmer fueron sembradas de forma invertida sobre placas de Petri con agar no nutritivo al 2%. Las placas se sellaron con Parafilm® y fueron incubadas a temperatura ambiente, permitiendo el crecimiento de los patógenos y no-patógenos. Tras tres o cuatro días se retiraban las membranas y se mantenían las placas durante una o dos semanas. Posteriormente, las placas fueron

21

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003  
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 825984

Código de verificación: VDAWVYJ7

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA  
En nombre de MARTA GONZÁLEZ GONZÁLEZ

Fecha: 21/11/2016 12:09:22

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA  
En nombre de JOSE ENRIQUE PIÑERO BARROSO

21/11/2016 12:27:45

monitorizadas mediante microscopio invertido, para comprobar la presencia de amebas

#### 4. Resultados y discusión

Se tomaron un total de 40 muestras oculares, correspondiendo 22 de ellas a 11 mujeres y 18 a 9 hombres. Las edades de los pacientes de los que se tomaron las muestras oscilaba entre 55 años y 84 años, resultando una edad media de 72,3 años y una desviación estándar de 6,73.

A. Resultados obtenidos de la ficha elaborada al paciente en el momento de la toma de la muestra.

##### 4.1. Patología de superficie ocular

En la siguiente tabla se muestran los datos sobre la patología de superficie ocular que presentaron los pacientes analizados.

Patología de superficie ocular					
No presenta	Blefaritis estafilocócica	Blefaritis seborreica	Queratoconjuntivitis sicca	Conjuntivitis alérgica	Triquiasis
18	6	8	10	Ninguno	5
Patología de superficie ocular (patologías simultáneas)					
Blefaritis estafilocócica y triquiasis		Blefaritis seborreica y triquiasis		Blefaritis seborreica y queratoconjuntivitis sicca	
2		1		4	

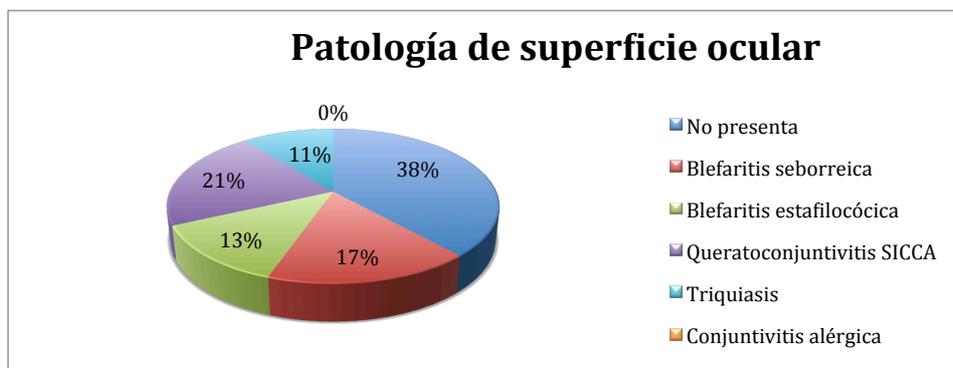
Expresando estos resultados en porcentaje, teniendo en cuenta la existencia de pacientes que presentan más de una patología, obtenemos el siguiente resultado:

- No presenta ninguna: 38,29% de las muestras.
- Presentan blefaritis seborreica: 17,02%
- Presentan blefaritis estafilocócica: 12,76%
- Presentan queratoconjuntivitis sicca: 21,27%

22

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <a href="http://sede.ull.es/validacion">http://sede.ull.es/validacion</a>	
Identificador del documento: 825984	Código de verificación: VDAWVYJ7
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de MARTA GONZÁLEZ GONZÁLEZ	Fecha: 21/11/2016 12:09:22
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de JOSE ENRIQUE PIÑERO BARROSO	21/11/2016 12:27:45

- Conjuntivitis alérgica: 0%
- Triquiasis: 10,63%



De estos pacientes, los que presentaban patologías de superficie ocular asociada:

- Blefaritis estafilocócica y triquiasis: 5%
- Blefaritis seborreica y triquiasis: 2,5%
- Blefaritis seborreica y SICA: 10%

4.2. Cálculo de la presión intraocular (PIO): 16,15 mmHg.

4.3. Uso de lentes de contacto: de los pacientes analizados no existía ninguno que utilizara lentes de contacto.

4.4. Uso de tratamientos tópicos crónicos sin ser humectante.

El grado de utilización de tratamientos tópicos crónicos, sin ser humectantes, entre los pacientes analizados, se muestra en la siguiente tabla.

<b>Uso Tratamientos Tópicos Crónicos (sin ser humectante)</b>	
Sí usa	No usa
39	1

De los datos obtenidos se concluye que un 97,5% sí usa un tratamiento tópico crónico no humectante mientras que el 2,5% restante no lo usa.

23

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <a href="http://sede.ull.es/validacion">http://sede.ull.es/validacion</a>	
Identificador del documento: 825984	Código de verificación: VDAWVYJ7
Firmado por: <i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> En nombre de <i>MARTA GONZÁLEZ GONZÁLEZ</i>	Fecha: 21/11/2016 12:09:22
<i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> En nombre de <i>JOSE ENRIQUE PIÑERO BARROSO</i>	21/11/2016 12:27:45

#### 4.5. Cirugía previa

Los datos de cirugía previa entre los pacientes analizados se muestran en la siguiente tabla.

Cirugía previa	
No	Sí
24	16

El 60% de los pacientes no refiere haber tenido ninguna cirugía previa, mientras que el 40% restante contesta que sí.

#### 4.6. Obstrucción de la vía lagrimal

En cuanto a los datos obtenidos sobre obstrucción de la vía lagrimal, encontramos el siguiente resultado.

Obstrucción de la vía lagrimal	
No	Sí
35	5

El 87,5% no presenta obstrucción de dicha de la vía lagrimal, mientras que el restante 12,5% sí presenta este problema.

#### 4.7. Cirugía oftálmica previa

Los datos referentes a la existencia en los pacientes analizados de una cirugía oftálmica previa se muestran en la siguiente tabla.

Cirugía oftálmica previa		
No	Cataratas	Cirugía palpebral
24	16	Ninguno

En este apartado procedimos a la valoración de la cirugía palpebral y cataratas como cirugía previa. En el 60% de los pacientes este hecho no se produjo, mientras que en el 40% de los casos habían sufrido una cirugía de cataratas y ninguno había sido sometido a una cirugía palpebral.

24

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003  
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 825984

Código de verificación: VDAWVYJ7

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA  
En nombre de MARTA GONZÁLEZ GONZÁLEZ

Fecha: 21/11/2016 12:09:22

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA  
En nombre de JOSE ENRIQUE PIÑERO BARROSO

21/11/2016 12:27:45

#### 4.8. Colirio empleado para el tratamiento de la PIO

Los colirios utilizados en el grupo de pacientes estudiados se muestran en la siguiente tabla:

Colirio empleado para el tratamiento de la PIO	
No usa	1
Betabloqueante	12
Alfa-agonista	2
Inhibidores de la Anhidrasa Carbónica	Ninguno
Prostaglandina	16
Combinación Betabloqueante - Prostaglandina	19
Combinación Betabloqueante - Alfa agonista	2
Combinación Betabloqueante – Inhibidor Anhidrasa Carbónica	Ninguno
Vía oral	Ninguno

Se concluye que:

- No usa: 1,92%
- Betabloqueante: 23,07%
- Alfa-agonista: 3,84%
- Inhibidores de la Anhidrasa Carbónica: 0%
- Prostaglandinas: 30,76%
- Combinación Betabloqueante - Prostaglandina: 36,53%
- Combinación Betabloqueante - Alfa-agonista: 3,84%
- Combinación Betabloqueante - Inhibidor de la Anhidrasa Carbónica: 0%
- Vía oral: 0%

25

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003  
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 825984

Código de verificación: VDAWVyJ7

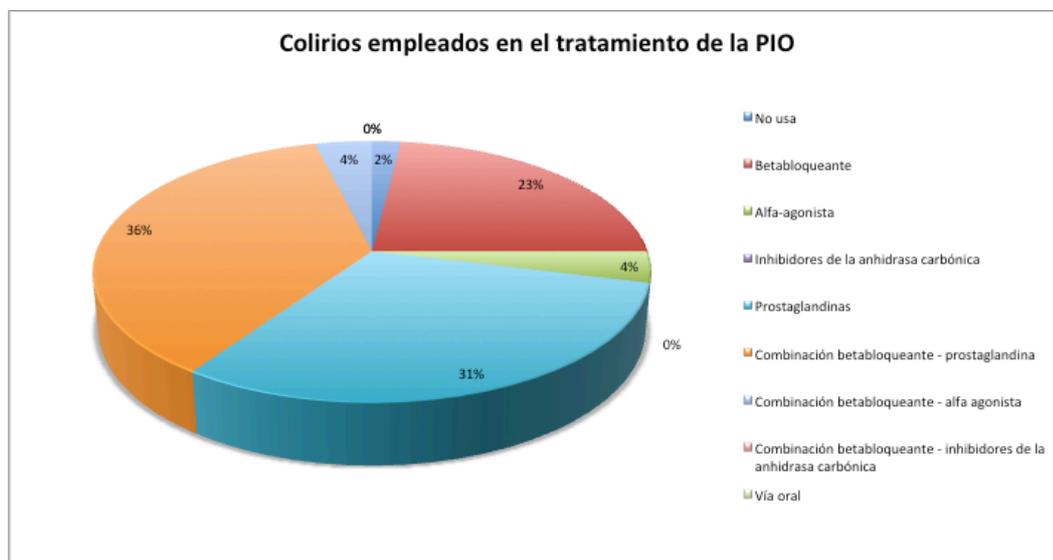
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA  
En nombre de MARTA GONZÁLEZ GONZÁLEZ

Fecha: 21/11/2016 12:09:22

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA  
En nombre de JOSE ENRIQUE PIÑERO BARROSO

21/11/2016 12:27:45

Estos datos se muestran en el siguiente diagrama:



#### 4.9. Método empleado para la toma de PIO

Los datos referentes al método empleado para la toma de PIO se muestra en la siguiente tabla.

<b>Método de la toma de PIO empleado</b>	
Perkins	Goldmann
18	22

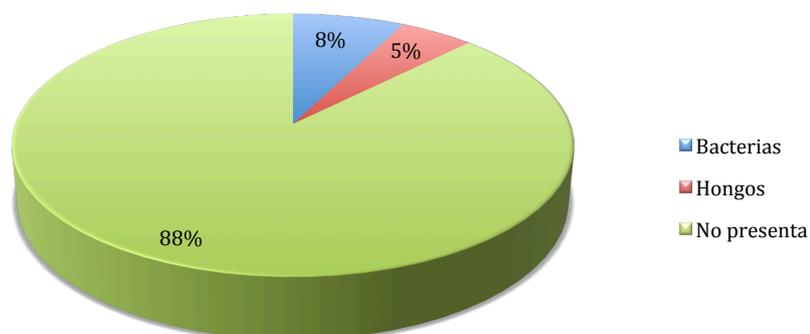
El método empleado en un 55% de los pacientes es el tonómetro de Goldmann, siendo en un 45% de los casos el tonómetro de Perkins.

#### B. Resultados obtenidos de los cultivos realizados en el laboratorio.

Del total de 40 muestras analizadas, en un 7,5% se produjo un crecimiento bacteriano, en un 5% hubo crecimiento fúngico y en ninguna de las muestras analizadas se produjo resultado positivo para el crecimiento de amebas de vida libre.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <a href="http://sede.ull.es/validacion">http://sede.ull.es/validacion</a>	
Identificador del documento: 825984	Código de verificación: VDAWVYJ7
Firmado por: <i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> En nombre de <i>MARTA GONZÁLEZ GONZÁLEZ</i>	Fecha: 21/11/2016 12:09:22
<i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> En nombre de <i>JOSE ENRIQUE PIÑERO BARROSO</i>	21/11/2016 12:27:45

## Resultados de laboratorio



Los resultados obtenidos en este estudio están basados en una muestra de 40 casos distribuidos entre 11 mujeres y 9 hombres y cuya media de edad se corresponde con 72,3 años. Los resultados obtenidos no permiten confirmar el papel de los colirios antiglaucomatosos como posibles factores desencadenantes de la infección por *Acanthamoeba*. Aún tratándose de una muestra relativamente pequeña, nuestro trabajo no permitió establecer en ninguna de las muestras analizadas la presencia de este tipo de organismo. Sí es preciso tener en cuenta que, de los voluntarios que participaron en el estudio, ninguno era usuario de lentes de contacto, el principal factor de riesgo para padecer queratitis amebiana. Pese a ello, hay una clara afectación de la superficie corneal que se traduce en el alto porcentaje de patologías de superficie ocular que se obtiene en el estudio, presentándose incluso en un 17,5% de los pacientes patología simultánea. Sabemos que existe una clara relación entre padecer alguna patología de superficie ocular y la presencia de *Acanthamoeba*. La tesis doctoral del Dr. Pedro Rocha<sup>39</sup>, *Parasitosis ocular por Acanthamoeba*, arroja unos resultados que señalan que, del 100% de las muestras tomadas, un 18% fueron positivas para el protozoo y, a su vez, el 94% de los ojos en los que se encontró *Acanthamoeba* presentaba patología de

27

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003  
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 825984

Código de verificación: VDAWVYJ7

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA  
En nombre de MARTA GONZÁLEZ GONZÁLEZ

Fecha: 21/11/2016 12:09:22

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA  
En nombre de JOSE ENRIQUE PIÑERO BARROSO

21/11/2016 12:27:45

superficie ocular. En este estudio se han tenido en cuenta las patologías de superficie ocular previamente citadas, pero el factor principal causante de toxicidad que hemos propuesto lo constituye el uso crónico de fármacos antiglaucomatosos, especialmente por la acción de los conservantes. Sin embargo, ante los datos obtenidos tras el cultivo de las muestras tomadas, podríamos afirmar que en los pacientes analizados el tratamiento tópico no predispone a la infección por *Acanthamoeba*. Así y todo habría que resaltar que sí se pudo observar crecimiento bacteriano y fúngico en un 7,5% y 5% de las muestras, respectivamente.

28

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 <i>La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <a href="http://sede.ull.es/validacion">http://sede.ull.es/validacion</a></i>	
Identificador del documento: 825984	Código de verificación: VDAWVYJ7
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de MARTA GONZÁLEZ GONZÁLEZ	Fecha: 21/11/2016 12:09:22
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de JOSE ENRIQUE PIÑERO BARROSO	21/11/2016 12:27:45

## 5. Conclusiones

- a) No se estableció relación entre pacientes con glaucoma y la presencia de *Acanthamoeba*.
- b) No se estableció asociación entre el uso de colirios antiglaucomatosos y la posible aparición de infecciones por *Acanthamoeba*.
- c) Se observan infecciones bacterianas y fúngicas en pacientes glaucomatosos tratados con colirios.
- d) Se establece una asociación entre el uso de colirios antiglaucomatosos y la presencia de patología de superficie ocular.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003  
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 825984

Código de verificación: VDAWVyJ7

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA  
En nombre de MARTA GONZÁLEZ GONZÁLEZ

Fecha: 21/11/2016 12:09:22

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA  
En nombre de JOSE ENRIQUE PIÑERO BARROSO

21/11/2016 12:27:45

## 6. Bibliografía

1. Cox, F. E. G. (2002). History of Human Parasitology. *Clinical Microbiology Reviews* (15/4), 595-612.
2. Vélez, M. C., Zapata, A. L. S., Ortiz, D. C., Trujillo, M., Restrepo, A., Garcés, C. (2013). Reporte de caso y revisión de la literatura de caso de paciente con meningoencefalitis por amebas de vida libre. *Infectio* (17/3), 153-159.
3. Mukhtar, F., Wazir, M. S. (jul.-sep.2015). *Naegleria fowleri*: The Brain Eating Amoeba or an Enigma? *J Ayub Med Coll Abbottabad*. (27/3), 735-736.
4. Seidel, J. S., Harmatz, P., Visvesvara, G. S., Cohen, A., Edwards, J., Turner, J., et al. (1982). Successful treatment of primary amebic meningoencephalitis. *N Engl J Med* (306), 346-48.
5. Kidelen, A. F., Laube, U. (2004). *Balamuthia mandrillaris*, an opportunistic agent of granulomatous amebic encephalitis, infects the brain via the olfactory nerve pathway. *Parasitol Res* (94), 49-52.
6. Singhal, T., Bajpai, A., Kalra, V., Kabra, S. K., Samantaray, J. C., Satpathy, G., Gupta, A. K. (2001). Successful treatment of *Acanthamoeba* meningitis with combination oral antimicrobials. *Pediatr Infect Dis J* (20), 623-627.
7. Visvesvara, G. S., Moura, H., Schuster, F. L. (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol* (50), 1-26.
8. Torno, M. S., Babapour, J. R., Gurevitch, A. (2000). Cutaneous acanthamoebiasis in AIDS. *J Am Acad Dermatol* (42), 351-354.
9. Martínez, A. J., Janitschke, K. (1985). *Acanthamoeba*, An opportunistic microorganism: a review. *Infection* (13), 251-256.
10. Beattie, T. K., Tomlinson, A., McFadyen, A. K., et al. (2003). Enhanced attachment of *Acanthamoeba* to extended - wear silicone hydrogel contact lenses: a new risk factor for infection? *Ophthalmology* (110), 765-771.
11. Beattie, T. K., Tomlinson, A., Seal, D. V. (2003). Surface treatment or material characteristic: the reason for the high level of *Acanthamoeba* attachment to silicone hydrogel contact lenses. *Eye Contact Lens*. (29), 40-43.
12. Sharma, S., Ramachandran, L., Rao, G. N. (1995). Adherence of cysts and trophozoites of *Acanthamoeba* to unworn rigid gas permeable and soft contact lenses. *CLAO J*. (21), 247-451.
13. Kelly, L. D., Xu, L. (1995). The effect of *Acanthamoeba* concentration on adherence to four types of unworn soft contact lenses. *CLAO J*. (21), 27-30.
14. Sehgal, R., Saini, J., Singh, K. D., et al. (2002). *Acanthamoeba* adherence to soft contact lens and human corneal stroma. *Indian J Pathol Microbiol*. (45), 63-67.
15. Ortega-Rivas, A., Lorenzo-Morales, J., Martínez, E., Villa, M., Clavel, A., Valladares, B., del Castillo, A. (2005). A specific primer pair for the diagnosis and identification of *Acanthamoeba astronyxis* by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. *J Parasitol* (91), 122-126.
16. Stothard, D. R., Hay, J., Schroeder-Diedrich, J. M., Seal, D. V., Byers, T. J. (1999). Fluorescent oligonucleotide probes for clinical and environmental detection of *Acanthamoeba* and the T4 18S rRNA gene sequence type. *J Clin Microbiol* (37), 2687-2693.
17. Martín-Navarro, C. M., López-Arencibia, A., Sifaoui, I., Reyes-Batlle, M.,

30

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <a href="http://sede.ull.es/validacion">http://sede.ull.es/validacion</a>	
Identificador del documento: 825984	Código de verificación: VDAWVyJ7
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de MARTA GONZÁLEZ GONZÁLEZ	Fecha: 21/11/2016 12:09:22
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de JOSE ENRIQUE PIÑERO BARROSO	21/11/2016 12:27:45

- Valladares, B., Martínez-Carretero, E., Piñero, J. E., Sutherland, K. M., Lorenzo-Morales, J. (may 2015). Statins and Voriconazole Induce Programmed Cell Death in *Acanthamoeba castellanii* *Antimicrobial Agents Chemotherapy* (59/5), 2817-2824.
18. Marciano-Cabral, F., Cabral, G. (2003). *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev* (16), 273-307.
  19. Castrillón, J. C., Orozco, L. P. (2013). *Acanthamoeba* spp. como parásitos patógenos y oportunistas. *Rev. Chilena Infecto.* (30/2), 147-155.
  20. Derrick E H. (1948). A fatal case of generalized amoebiasis due to a protozoon closely resembling, Eif not identical with Iodamoeba buetschlii. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (42) 191-198.
  21. Kernoham, J. W., Magath, T. B., Schloss, G. T. (1960). Granuloma of brain probably due to Endolimax williamsi (Iodamoeba buetschlii). *Arch Pathol* (70), 576-580.
  22. Visvesvara, G. S. (1991). Classification of *Acanthamoeba*. *Rev Infect Dis* (13/5), 369-372.
  23. Band, R. N., Mohrlök, S. (1973). The cell cycle and induced amitosis in *Acanthamoeba*. *J Protozool* (20), 654-657.
  24. Weisman, R. A. (1976). Differentiation in *Acanthamoeba castellanii*. *Ann Rev Microbiol* (30), 189-219.
  25. Muñoz, V., Reyes, H., Toche, P., Cárcamo, C., Gottlieb, B. (2003). Aislamiento de amebas de vida libre en piscinas públicas de Santiago de Chile. *Parasitol Latinoam* (58), 106-111.
  26. Cerva, L., Serbus, C., Skocil, V. (1973). Isolation of limax amoebae from the nasal mucosa of man. *Folia Parasitol.* (20), 97-103.
  27. Michel, R., Röhl, R., Schneider, H. (1982). Isolation of free – living amoebae from nasal mucosa of healthy individuals. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abr. Orig. B* (176), 155-159.
  28. Rivera, F., Rosas, I., Castillo, M., *et al.* (1986). Pathogenic and free-living protozoa cultured from the nasopharyngeal and oral regions of dental patients: II. *Environ. Res.* (39), 364-371.
  29. De Jonckheere, J. F. (1991). Ecology of *Acanthamoeba*. *Rev Infect Dis* (13 Suppl 5), 385-387.
  30. Stehr–Green, J. K., Bailey, T. M., Visvesvara, G. S. (1989). The epidemiology of *Acanthamoeba* keratitis in the United States. *Am. J. Ophthalmol.* (107), 331-336.
  31. Garate, M., Cao, Z., Bateman, E., Panjwani, N. (jul 2004). Cloning and Characterization of a Novel Mannose-binding Protein of *Acanthamoeba*. *The Journal of Biological Chemistry* (279), 29849-29856.
  32. Broadway, D. C., Grierson, I., O'Brien, C., Hitchings, R. A. (1994). Adverse effects of topical antiglaucoma medication I. The conjunctival cell profile. *Arch Ophthalmol.* (112/11), 1437-1445.
  33. Baudouin, C. (1996). Side effects of antiglaucomatous drugs on the ocular surface. *Curr Opin Ophthalmol.* (7/2), 80-86.
  34. Asbell, P. A., Potapova, N. (jan 2005). Effects of topical antiglaucoma medications on the ocular surface. *Ocul Surf.* (3/1), 27-40.
  35. Bagnis, A., Papadia, M., Scotto, R., Traverso, C. E. (oct 2011). Antiglucoma drugs: The role of preservative-free formulations. *Saudi J Ophthalmol.* (25/4), 389-394.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <a href="http://sede.ull.es/validacion">http://sede.ull.es/validacion</a>	
Identificador del documento: 825984	Código de verificación: VDAWVYJ7
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de MARTA GONZÁLEZ GONZÁLEZ	Fecha: 21/11/2016 12:09:22
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de JOSE ENRIQUE PIÑERO BARROSO	21/11/2016 12:27:45

36. Mohamed, Y. H., Uematsu, M., Onizuka, N., Ueki, R., Inoue, D., Fujikawa, A., Sasaki, H., Kitaoka, T. (mar 2016). Acute Corneal Toxicity of Combined Antiglaucoma Topical Eyedrops. *Curr Eye Res.* (22), 1-5.
37. Villegas Pérez, M. P., Gómez Ramírez, A. M., García Medina, J. J., Martínez García, A., Gómez Fernández, J. J., Miralles de Imperial y Mora-Figueroa, J. (2013). *Mecanismos de actuación de los fármacos hipotensores, fisiopatología de la terapéutica médica.* En García-Sánchez, J., Honrubia, F. M., García-Feijoo, J., Pablo, L. (eds.), *Diagnóstico y tratamiento del glaucoma primario de ángulo abierto* (283-306). Madrid: Sociedad Española de Oftalmología.
38. Dyková, I., de Buron-Connors, I., Roumillat, W. A., Fiala, I. (2011). *Henneguya cynoscioni* sp. n. (Myxosporea: Bivalvulida), an agent of severe cardiac lesions in the spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus* (Teleostei: Sciaenidae). *Folia Parasitol.* (58), 169-177.
39. Rocha Cabrera, P. (2014). Parasitosis ocular por *Acanthamoeba* (tesis doctoral inédita). La Laguna: Universidad de La Laguna.

<p>Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003          La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <a href="http://sede.ull.es/validacion">http://sede.ull.es/validacion</a></p>	
Identificador del documento: 825984	Código de verificación: VDAWVYJ7
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de MARTA GONZÁLEZ GONZÁLEZ	Fecha: 21/11/2016 12:09:22
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de JOSE ENRIQUE PIÑERO BARROSO	21/11/2016 12:27:45

## 7. Anexo I



El estudio de investigación titulado: “Presencia de Acanthamoeba en superficie ocular en pacientes glaucomatosos.”, con código 2016\_16, del que es Investigador Principal el Dr. JOSE ENRIQUE PIÑERO BARROSO, e investigadores colaboradores el Dr. PEDRO ROCHA CABRERA, el Dr. JACOB LORENZO MORALES y Dña. MARTA GONZALEZ GONZALEZ, ha sido evaluado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario de Canarias en su sesión del 31 de marzo de 2016, y considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del Protocolo con los objetivos del estudio.

El procedimiento para obtener el consentimiento informado, incluyendo la hoja de información para los sujetos y el consentimiento informado, es adecuado.

La capacidad del Investigador y los medios disponibles son adecuados para llevar a cabo el estudio y no interfiere con el respeto a los postulados éticos.

Por todo ello, el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario de Canarias **Autoriza** la realización de este estudio.

La Laguna, a 31 de marzo de 2016.

Firmado:



Dra. CONSUELO MARIA RODRIGUEZ JIMENEZ  
Secretaría del Comité Ético de Investigación Clínica  
Hospital Universitario de Canarias

Ofra, s/n. La Cuesta  
38320 La Laguna. Santa Cruz de Tenerife.  
Tel.: 922 67 80 00 - Fax: 922 65 38 08

261259

33

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003  
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 825984

Código de verificación: VDAWVyJ7

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA  
En nombre de MARTA GONZÁLEZ GONZÁLEZ

Fecha: 21/11/2016 12:09:22

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA  
En nombre de JOSE ENRIQUE PIÑERO BARROSO

21/11/2016 12:27:45

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003  
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 825984

Código de verificación: VDAWVyJ7

Firmado por: *UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA*  
En nombre de *MARTA GONZÁLEZ GONZÁLEZ*

Fecha: 21/11/2016 12:09:22

*UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA*  
En nombre de *JOSE ENRIQUE PIÑERO BARROSO*

21/11/2016 12:27:45