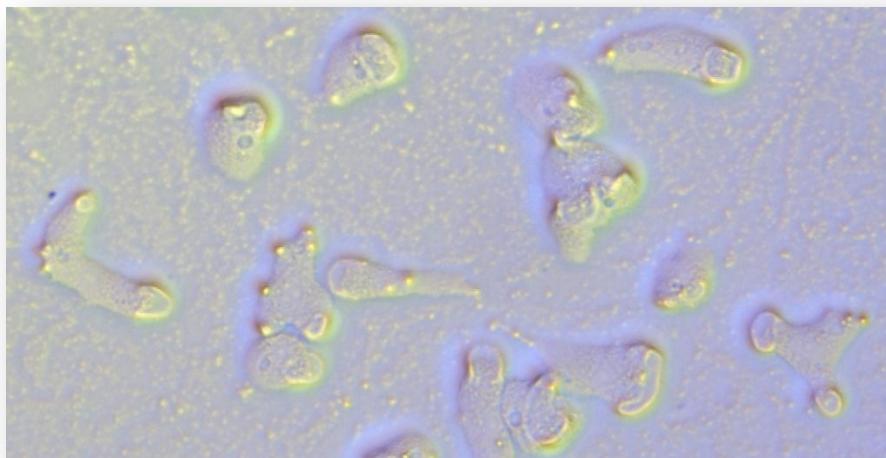




**Universidad**  
Zaragoza

## Trabajo Fin de Grado

Evaluación de la sensibilidad de *Acanthamoeba* spp. a diferentes compuestos y propuesta de alternativas para el tratamiento de la queratitis amebiana



Autor

Jorge Belloc Alcón

Directoras

Dra. M<sup>a</sup> Pilar Goñi Cepero

Dra. M<sup>a</sup> Teresa Fernández Rodrigo

Grado en Biotecnología – Facultad de Ciencias

2016

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer la acogida brindada por el grupo emergente B124 ‘Parasitología, Autocuidados y Salud Ambiental’ para realizar este trabajo con ellos. Así como a Ángel Ortíles y Begoña Calvo, quienes son parte del grupo que está llevando a cabo este estudio de forma más amplia.

Gracias a mis directoras, Pilar y Maite, no solo por guiarme y transmitirme su conocimiento, también por su ayuda en el laboratorio y durante la preparación de la memoria. Sin ellas este trabajo no hubiera tenido éxito.

Y gracias a todo el personal del departamento por cuidar de mí y por su ayuda incondicional siempre que la he necesitado.

## ABREVIATURAS

<b>ABC</b>	ATP – Binding Cassette
<b>Cel</b>	Celulasa
<b>Clx</b>	Clorhexidina
<b>Cp</b>	Ciprofloxacino
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>MBP</b>	Proteínas de Unión a Manosa
<b>MNN</b>	Medio No Nutritivo
<b>PAS</b>	Solución salina de Neff's modificada
<b>PHMB</b>	Polihexametil Biguanida
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>Pm</b>	Paromomicina
<b>PPYG</b>	Protease Peptone, Yeast extract and Glucose
<b>QA</b>	Queratitis por <i>Acanthamoeba</i> spp.
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>Tm</b>	Tobramicina
<b>Vp</b>	Verapamil

# ÍNDICE

	Página
1. RESUMEN / ABSTRACT.....	1
2. INTRODUCCIÓN	
2.1 Características del género <i>Acanthamoeba</i> spp.....	2
2.2 Queratitis por <i>Acanthamoeba</i> spp. (QA).....	2
2.3 Mecanismo de patogenicidad.....	3
2.4 Diagnóstico .....	4
2.5 Tratamientos existentes.....	5
2.5.1 Tratamiento tópico con antimicrobianos.....	5
2.5.2 Queratoplastia.....	6
2.6 Nuevos tratamientos contra la queratitis .....	6
2.6.1 Cross-linking .....	7
2.6.2 Small interfering RNAs (siRNAs).....	7
2.6.3 Estatinas .....	7
2.6.4 Infusiones de plantas .....	7
2.6.5 Fármacos con actividad antiamebiana .....	8
2.7 Justificación del trabajo.....	9
3. OBJETIVO DEL TRABAJO .....	9
4. MATERIALES Y MÉTODOS	
4.1 Material biológico: cepas de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	9
4.2 Cultivo de las amebas .....	9
4.3 Fármacos / Antimicrobianos .....	10
4.4 Metodologías.....	10
4.4.1 Ensayos cualitativos en portaobjetos excavado .....	10
4.4.2 Ensayos cuantitativos en medio líquido.....	11
4.4.3 Análisis de datos .....	12
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
5.1 Tobramicina, ciprofloxacino y verapamil .....	12
5.2 Ensayos cualitativos en portaobjetos excavado.....	15
5.3 Combinaciones de fármacos .....	17
5.3.1 Ciprofloxacino + Voriconazol + Clorhexidina .....	18
5.3.2 Ciprofloxacino + Voriconazol + Celulasa.....	20
5.4 Posibles estudios posteriores .....	21
6. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS.....	22
7. BIBLIOGRAFÍA.....	23
ANEXOS	

## 1. RESUMEN / ABSTRACT

La queratitis causada por *Acanthamoeba* spp. es una enfermedad que genera graves problemas en la córnea del paciente debido, principalmente, a la dificultad para establecer un diagnóstico y a la ausencia de un tratamiento eficaz. Este trabajo tiene como objetivo la valoración de posibles líneas terapéuticas para conseguir esta eficacia.

Para ello se han llevado a cabo ensayos cualitativos, visualizando la morfología de amebas en contacto con los tratamientos (biguanidas, aminoglicósidos, quinolonas, voriconazol, productos naturales y celulosa), mediante microscopía óptica. Para aquellos compuestos que dieron resultados positivos se evaluó su actividad amebicida en medio líquido.

Los resultados mostraron que el tratamiento constituido por la combinación de los fármacos ciprofloxacino, voriconazol y clorhexidina es altamente activo contra *Acanthamoeba* spp., alcanzando una disminución en su concentración de 2,7 logaritmos decimales respecto a una muestra control.

Este tratamiento podría llegar a convertirse en una alternativa frente a las terapias actuales contra la enfermedad. Los demás compuestos probados no presentaron actividad suficiente para considerarlos efectivos.

*Acanthamoeba spp. keratitis causes serious problems in the cornea of patients with this disease, mainly due to the difficulty to diagnose it and a lack of an effective treatment. This study has been performed in order to evaluate different strategies to achieve high effective therapies.*

*For that purpose, qualitative assays were carried out, analyzing amoeba morphology after the treatments (biguanides, aminoglycosides, quinolones, voriconazole, natural products and cellulose) by using optical microscopy. For those compounds which gave positive results, their amoebicidal activity was analysed in liquid medium.*

*Results showed that the treatment which combines ciprofloxacin, voriconazole and chlorhexidine is highly active against *Acanthamoeba* spp., reaching a 2.7 decimal logarithms concentration decrease compared to a control sample.*

*This treatment could become an alternative to the current therapies against the disease. The other compounds did not were active enough to consider them as being effective.*

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Características del género *Acanthamoeba* spp.

*Acanthamoeba* spp. es la ameba más frecuentemente aislada en el suelo y en todo tipo de aguas, incluyendo el agua de red y sistemas artificiales de agua, y en general en ambientes húmedos, por lo que es considerada uno de los protozoos más ubicuos y que está en permanente contacto con el ser humano y los animales. En su ciclo se pueden encontrar dos estadios morfológicos: trofozoíto y quiste (figura 1).

El trofozoíto es la forma infectante, que se alimenta y multiplica y mide entre 15 a 35  $\mu\text{m}$ . Posee citoplasma, mitocondrias, lisosomas, ribosomas y vacuolas. Su movilización es a través de pseudópodos filamentosos llamados acanthopodios. Poseen núcleo central con un núcleolo prominente y redondo.

El quiste es la forma de resistencia que le permite permanecer viable hasta 14 días o más en soluciones desinfectantes. Mide entre 15 a 28  $\mu\text{m}$  y se forma cuando las condiciones del medio ambiente no son adecuadas, como respuesta a la desecación, al efecto de medios físicos o químicos de desinfección y a la presencia de antimicrobianos. El quiste tiene una doble pared (el endoquiste y el exoquiste) y la celulosa es su principal componente (Castrillón & Orozco, 2013).

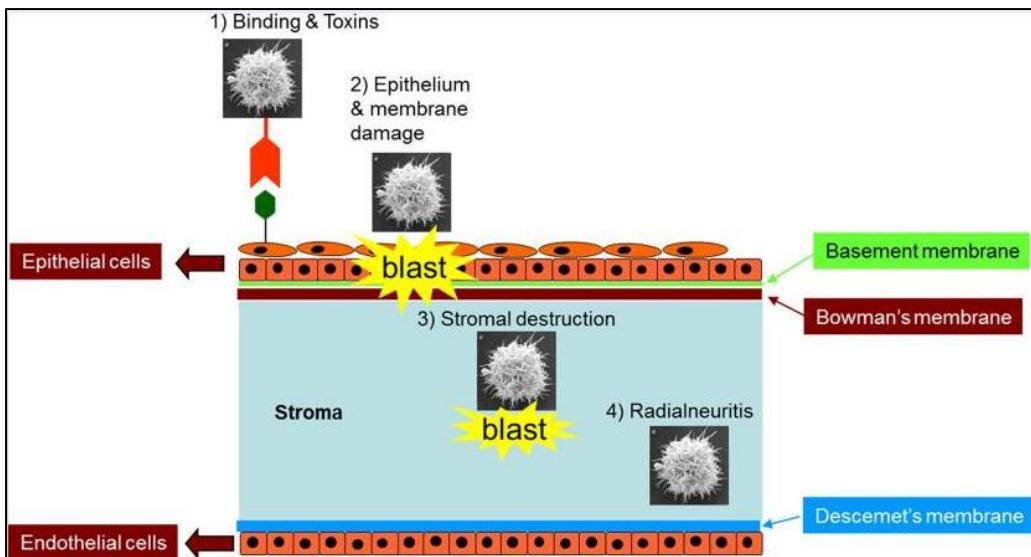
La dificultad para la determinación de la especie, hace que se haya establecido una clasificación de *Acanthamoeba* spp. basada en el análisis molecular de una región del 18S rRNA a partir del cual se han registrado 20 genotipos diferentes denominados T1-T20 (Corsaro et al., 2015). *Acanthamoeba* spp. causa enfermedades en el hombre y los animales, como son la encefalitis amebiana granulomatosa, acantamebiasis cutánea y queratitis amebiana, habiéndose visto involucrada mayoritariamente la *Acanthamoeba* genotipo T4 (Booton et al., 2009; Risler et al., 2013) siendo éste al que pertenecen las dos cepas estudiadas en este trabajo.

### 2.2 Queratitis por *Acanthamoeba* spp. (QA)

La queratitis es una enfermedad caracterizada por la inflamación de la córnea produciendo intenso dolor ocular, enrojecimiento, lagrimeo y fotofobia, pudiendo llegar a ocasionar ulceración crónica de la córnea e infecciones profundas que presentan mayor gravedad. Hay queratitis bacterianas, víricas, fúngicas y amebianas. La queratitis amebiana puede adquirirse por múltiples causas siendo la más frecuente la ocasionada por la entrada de *Acanthamoeba* spp. al organismo a través de traumas oculares provocados generalmente por lentes de contacto expuestas a aguas contaminadas o por falta de la higiene adecuada en las soluciones desinfectantes (Gomes et al., 2016).



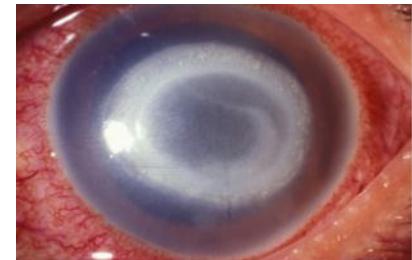
**Fig. 1.** Quiste y trofozoíto de *Acanthamoeba* spp. al microscopio óptico (x600).



**Fig. 2.** Proceso de daño corneal por *Acanthamoeba* spp. 'Blast' se refiere a 'daño'. Imagen tomada de Lorenzo-Morales et al., 2015.

La infección comienza cuando *Acanthamoeba* spp. se adhiere al epitelio corneal, produciendo su ruptura por lisis e ingestión de las células epiteliales. A continuación invade el estroma y ataca a los queratocitos lisándolos, todo ello provoca en la córnea una queratitis necrosante progresiva así como profundas grietas y exfoliación del epitelio (figura 2). Este daño induce una intensa respuesta inflamatoria que se manifiesta en los pacientes como un infiltrado epitelial en forma de anillo en el estroma corneal, como consecuencia de la proliferación de neutrófilos y macrófagos de la respuesta inmunitaria (figura 3) (Knickelbein et al., 2013).

No obstante, estudios recientes en el Reino Unido, Japón y Nueva Zelanda han demostrado la existencia de usuarios de lentes de contacto portadores asintomáticos de *Acanthamoeba* spp. sugiriendo que el sistema inmunitario innato constituye una barrera importante frente a la infección y el microorganismo es extremadamente virulento sólo en algunas ocasiones (Lorenzo-Morales et al., 2015). Así pues, el desarrollo de la infección es dependiente de la virulencia de la ameba, de la inmunidad del hospedador y del estado fisiológico de la córnea siendo el traumatismo corneal una condición inicial en la queratitis.



**Fig. 3.** Anillo en el estroma corneal por queratitis de *Acanthamoeba* spp. Copyright Instituto Barraquer de América – Bogotá D.C. (Colombia)

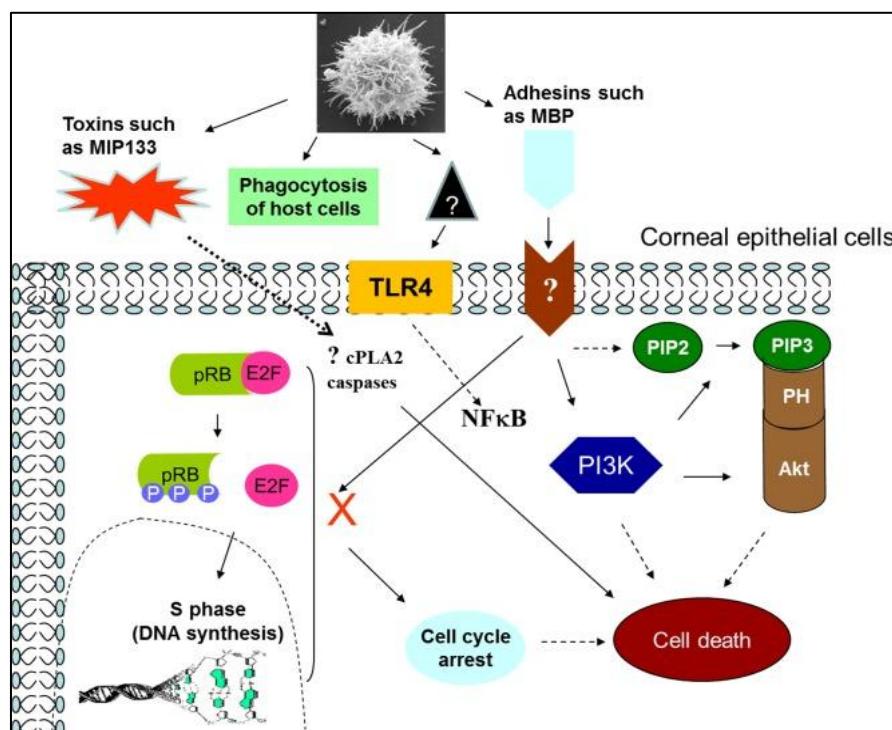
### 2.3 Mecanismo de patogenicidad

La habilidad de *Acanthamoeba* spp. para producir infección en el ojo está determinada por diversos factores, un conocimiento más amplio de su patogénesis puede ayudar a encontrar terapias alternativas frente a QA.

La capacidad de adhesión de la ameba es el primer paso para que tenga lugar la secuencia de eventos patogénicos propios de una queratitis. *Acanthamoeba* spp. presenta proteínas de

unión a manosa (MBP) en su superficie que le permiten unirse al epitelio corneal. El huésped, por su parte, también posee receptores que permiten la unión del parásito cuyo mecanismo de reconocimiento es un área todavía sin explorar. La unión de la ameba a las células huésped interfiere con vías de señalización intracelular (figura 4) que utilizando chips de ADNA o 'microarrays' y ensayos con anticuerpos han demostrado que llevan al arresto del ciclo (Sissons et al., 2004) y a la muerte celular (Sissons et al., 2005).

La adhesión de *Acanthamoeba* spp. conduciría a una segunda etapa en la patogénesis que comprende procesos como la fagocitosis de células epiteliales o la liberación de toxinas. Otros elementos que contribuirían a la patogénesis son las ecto-ATPasas implicadas en la activación de la ruta de las caspasas y la actividad neuraminidasa de *Acanthamoeba* spp. clave para su colonización produciendo daño en el epitelio corneal rico en ácido siálico.



**Fig. 4.** Muerte de célula epitelial de la córnea mediada por *Acanthamoeba* spp. Imagen tomada de Lorenzo-Morales et al., 2015.

Además, existen factores que contribuyen de forma indirecta a la patogenicidad de *Acanthamoeba* spp.: características morfológicas, osmotolerancia, crecimiento a diferentes pH, capacidad para diferenciarse a quiste, quimiotaxis, formación de biofilms en las lentillas. Finalmente, circunstancias propias del huésped, como su inmunidad, son un factor importante en el desarrollo de la infección (Lorenzo-Morales et al., 2015).

## 2.4 Diagnóstico

El diagnóstico de la QA resulta problemático, ya que suele comenzar como una queratitis bacteriana y de hecho, por sus síntomas, se suele confundir con una queratitis bacteriana, vírica o fúngica. La microscopía confocal *in vivo* ha emergido como una herramienta no invasiva, pero la confirmación del diagnóstico debe proceder de ensayos de laboratorio siendo los más utilizados la observación al microscopio de quistes y trofozoítos y el cultivo de un

raspado corneal. Como problemas que tienen estas técnicas cabe mencionar la dificultad en la observación de los quistes y el tiempo que tarda en crecer el cultivo, que puede llegar a un mes, y que puede retrasar considerablemente el tratamiento. Se han desarrollado también técnicas basadas en PCR para la detección simultánea de diferentes géneros de amebas de vida libre patógenas (Siddiqui et al., 2012).

## 2.5 Tratamientos existentes (Lorenzo-Morales et al., 2015)

Un tratamiento adecuado para la QA debe de cumplir simultáneamente varios preceptos: que consiga erradicar completamente *Acanthamoeba* spp., ya que la permanencia de un solo quiste puede hacer resurgir la infección, que consiga la erradicación en un tiempo razonablemente corto, que sea capaz de actuar frente a la mayoría de las cepas y no solo frente a unas pocas y que sea lo menos tóxico posible para el paciente.

Ningún agente quimioterapéutico ha sido descrito como tratamiento único y efectivo contra la QA debido a los muchos factores implicados en la patogenicidad, que hacen prácticamente imposible establecer una correlación entre eficacia *in vitro* e *in vivo*. El bajo número de casos descritos de QA, la patogenicidad variable entre cepas y la naturaleza fluctuante del proceso de la enfermedad hacen aún más complicado el determinar cuál es el tratamiento más efectivo. Por otro lado, la instauración de una terapia inicial adecuada es muy importante, ya que comenzar un tratamiento erróneo puede dar lugar a un periodo de evolución más prolongado y como consecuencia a un mayor daño y a la pérdida de la visión y del ojo. Actualmente, son varias las alternativas desarrolladas para tratar la QA y grupos de investigación trabajan en todo el mundo buscando alternativas eficientes y seguras frente a estos agentes.

### 2.5.1 Tratamiento tópico con antimicrobianos

La opción más extendida hasta la fecha y que constituye el tratamiento de primera línea contra la QA consiste en administrar por vía tópica agentes antimicrobianos de manera intensiva sobre todo al principio para lograr una rápida lisis de los trofozoítos y que el menor número de ellos reviertan a quistes. Durante los dos primeros días, se aplican cada hora y posteriormente, según la respuesta del paciente, la frecuencia va reduciéndose. La duración de la terapia puede comprender desde las 4 semanas de duración hasta 6 o 12 meses, siendo esta última opción la más habitual.

Los agentes con la mejor y más constante actividad amebicida entre los fármacos estudiados hasta la fecha son las biguanidas, la polihexametil biguanida(PHMB) y la clorhexidina, ambas activas contra un amplio espectro de patógenos. A pH fisiológico presentan cargas positivas que provocan su unión a la membrana plasmática cargada negativamente induciendo la agregación de los fosfolípidos, aumentando la fluidez y permeabilidad y facilitando la liberación de los componentes intracelulares. En última instancia, el microorganismo muere por lisis celular. La PHMB es efectiva a bajas concentraciones (0,02%) y la clorhexidina por su parte se suele emplear al 0,02% en combinación con diaminas aromáticas como isetionato de propamidina (Brolene®) al 0,1%. Las diaminas afectan a la permeabilidad y desnaturalizan enzimas y proteínas del citoplasma. Otra diamina también disponible es la hexamidina al 0,1%.

Sin embargo, a pesar de constituir el tratamiento más activo, la exposición de las células de la córnea tanto a las biguanidas como a las diaminas de forma prolongada resulta tóxica ocasionando problemas para el paciente. Por otro lado, se han obtenido buenos resultados únicamente con ciertas cepas tanto clínicas como ambientales de *Acanthamoeba* spp.

Dado que las amebas se alimentan de bacterias, los aminoglucósidos neomicina y paromicina (antibióticos inhibidores de síntesis de proteínas mediante su unión a la subunidad 30S del ribosoma) constituyen otra alternativa por vía tópica junto con los imidazoles con actividad antifúngica (miconazol y clotrimazol, ambos al 1%), los cuales son oxidados por sistemas dependientes del citocromo P450 y alteran el metabolismo del ergosterol, disminuyéndolo y aumentando la permeabilidad de la membrana plasmática de *Acanthamoeba* spp. Aun así, estos compuestos han presentado baja actividad frente a los quistes.

Por lo tanto, la eliminación de los quistes debido a su elevado grado de resistencia parece ser la clave para desarrollar una terapia efectiva contra la QA. Actualmente, para erradicar totalmente los quistes, hay tres opciones disponibles: tratamiento con peróxido de hidrógeno 3% durante 6 a 24 horas, poliaminopropil biguanida 0,0015% durante 4 horas de incubación, y povidona yodada 0,06% durante 4 horas (Lorenzo-Morales et al., 2013). Los 3 compuestos anteriormente nombrados están presentes en soluciones desinfectantes de lentillas y han sido eficaces *in vitro* contra los quistes, aunque en un ensayo *in vivo* podrían dañar las células de la córnea.

### **2.5.2 Queratoplastia**

Son frecuentes los fenómenos de resistencia a los tratamientos debido a que la doble pared del quiste que actúa como barrera protectora frente a los biocidas, asimismo, la continua exposición al antimicrobiano, que suele ser efectivo frente a los frágiles trofozoítos, ejerce una presión selectiva favoreciendo la presencia de quistes frente al resto de la población amebiana. Por tanto ante una infección severa, si el tratamiento tópico resulta fallido y la resistencia persiste, se recurre al trasplante total de la córnea (queratoplastia penetrante) para así retirar totalmente los tejidos afectados. Esta intervención es recomendada si a pesar de haber administrado la máxima cantidad de antiamebianos la córnea queda muy delgada o incluso presenta perforaciones afectando a la visión. Tras la operación, el tratamiento médico debe continuar durante varios meses puesto que existe riesgo de no eliminar todas las amebas y que colonicen la nueva córnea. Desafortunadamente, la queratoplastia es poco eficaz dándose algunos casos de recurrencia y pudiendo los pacientes llegar a perder el ojo, por tanto, el tratamiento con antimicrobianos siempre será preferible al quirúrgico.

## **2.6 Nuevos tratamientos contra la queratitis**

Los tratamientos actuales se han mostrado poco efectivos contra los quistes y son largos, y por tanto agresivos. Además de la falta de un tratamiento efectivo y consolidado, nuevas cepas de *Acanthamoeba* spp. que resultan resistentes frente a los múltiples tratamientos constituyen otro de los principales problemas. Es por ello que se están desarrollando nuevos métodos en la búsqueda de una solución definitiva contra la QA.

### 2.6.1 Cross-linking

El cross-linking consiste en someter a la córnea a una radiación ultravioleta con el fin de fortalecer la resistencia biomecánica y frenar el queratocono: un cambio de la forma redonda de la córnea a cónica provocado por su anormal delgadez que causa problemas de visión. Se administra riboflavina como agente fotosensibilizador, puesto que cuando es activada por la radiación UVA genera especies de oxígeno reactivas induciendo un cambio en las propiedades del colágeno y que da lugar a la formación de enlaces covalentes en el estroma corneal aumentando la resistencia a la degradación (Fernández, 2014). Se ha descrito que el cross-linking es efectivo frente a gran variedad de infecciones producidas por bacterias, virus y hongos. Por otra parte, informes de casos clínicos han mostrado un panorama prometedor con pacientes que han logrado recuperarse, sin embargo, los estudios *in vitro* en los que se utiliza cross-linking en combinación con riboflavina no han conseguido ejercer un efecto amebicida (Del Buey et al., 2012). En definitiva, no hay ensayos clínicos convincentes como para incluir el cross-linking en el protocolo para tratar la QA.

### 2.6.2 Small interfering RNAs (siRNAs)

La identificación de genes específicos de *Acanthamoeba* spp. como potenciales dianas terapéuticas para no dañar al huésped, ha puesto de manifiesto que sería posible el uso de siRNAs como agentes amebicidas para tratar las infecciones con eficacia. Aqeel et al., en 2013, silenciaron la xilosa isomerasa y la celulosa sintasa, enzimas importantes para el enquistamiento, consiguiendo inhibirlo pero sin afectar a la viabilidad.

### 2.6.3 Estatinas

HMG-CoA reductasa es la enzima involucrada en la conversión de HMG-CoA a mevalonato, un precursor del colesterol en humanos y del ergosterol en plantas, hongos, y protozoos. En *Acanthamoeba* spp. el ergosterol es el principal esterol de la membrana en trofozoítos y quistes. Por tanto, si dicha enzima es inhibida, podría aumentar la permeabilidad de la membrana plasmática.

Este mismo razonamiento plantea la posible utilidad de las estatinas como tratamiento contra *Acanthamoeba* spp. ya que se unen al sitio activo de HMG-CoA reductasa, inhibiéndola e impidiendo la síntesis de colesterol. Actualmente, estos compuestos se utilizan como tratamiento complementario para personas con problemas cardiovasculares.

En ensayos de laboratorio, las estatinas han mostrado un comportamiento amebicida *in vitro*, pero no se puede garantizar que será efectivo *in vivo* puesto que otros estudios para comprobar su eficacia contra parásitos han mostrado que los fármacos actúan *in vitro* pero *in vivo* no inhiben el crecimiento (Martín-Navarro et al., 2013).

### 2.6.4 Infusiones de plantas

Desde tiempos ancestrales, los aceites esenciales de diversas plantas se han utilizado para diferentes propósitos tales como la cocina, cosméticos y la medicina. Los aceites esenciales presentan propiedades antimicrobianas que nos pueden ser útiles a la hora de tratar enfermedades oculares y podrían constituir una terapia basada en una sustancia natural (Cannas et. al, 2015).

## 2.6.5 Fármacos con actividad antiamebiana

Existen numerosas moléculas con actividad antibacteriana y/o antifúngica principalmente, que podrían presentar un posible efecto antiamebiano constituyendo un tratamiento alternativo.

El hecho de establecer una terapia contra la QA basada en fármacos ya comercializados supondría una gran ventaja, porque la seguridad de dichas sustancias ya está verificada y se ahorraría tiempo y dinero.

### ▪ **Tobramicina**

La tobramicina es un antibiótico de uso tópico frecuente. Es un aminoglucósido destinado a bacterias gram negativas del tracto genital de la mujer que cobra importancia en la recepción neonatal debido a su uso como profilaxis antibiótica contra las conjuntivitis bacterianas de los neonatos. Fue probado como agente antiamebiano en la Tesis doctoral llevada a cabo por García A en 2013, en la que se consiguió la degradación de trofozoítos.

### ▪ **Verapamil**

Se trata de un bloqueador de los canales de calcio, indicado para el tratamiento de la hipertensión, angina de pecho y trastornos del ritmo cardíaco. Cuando en el trabajo realizado por García A en 2013, se utiliza conjuntamente con tobramicina, actúa como inhibidor de bombas de eflujo, aumentando la sensibilidad de *Acanthamoeba* spp. frente a tobramicina. Dicha bomba de eflujo fue caracterizada como un transportador ATP-binding cassette (ABC).

### ▪ **Ciprofloxacino**

Es un antibiótico del grupo de las fluoroquinolonas, cuyo mecanismo de acción consiste en el bloqueo de la replicación mediante su unión covalente a la DNA girasa. Tiene efecto bactericida de amplio espectro (gram positivas y gram negativas). La actividad de las fluoroquinolonas frente a algunos parásitos como toxoplasma y malaria ha sido propuesta, lo que junto al efecto que sobre su actividad presentan los inhibidores de bombas de eflujo, las hace candidatas a ser probadas frente a *Acanthamoeba* spp.

### ▪ **Voriconazol**

Fármaco antifúngico derivado de los triazoles que, al igual que el resto de los imidazoles que ya se utilizan actualmente, actúa alterando el metabolismo del ergosterol lo que provoca el aumento de la permeabilidad de la membrana y la inhibición del enquistamiento.

### ▪ **Celulasa**

Es una enzima producida con ligeras diferencias químicas por hongos y bacterias que se encarga de descomponer celulosa transformándola en monómeros de glucosa. Su acción resultaría útil para degradar la doble pared de los quistes.

### ▪ **Combinaciones de fármacos**

La elevada resistencia que presentan los quistes plantea la posibilidad de combinar la acción de varios fármacos para acabar con *Acanthamoeba* spp. El efecto de dichas combinaciones de agentes ha sido evaluado en este trabajo.

## 2.7. Justificación del trabajo

La incidencia de queratitis por *Acanthamoeba* spp. no es muy elevada y está ocasionada por un cúmulo de circunstancias, no obstante, estudios recientes han demostrado un número mayor de casos de queratitis por *Acanthamoeba* spp. en todo el mundo con una incidencia entre 17 y 70 casos por millón de usuarios de lentes de contacto (Ku et al., 2009).

Las terapias existentes hasta la fecha se han mostrado lentas, agresivas e ineficaces, lo que se añade a un diagnóstico que normalmente se produce con retraso debido a diversos factores, que incluyen el desconocimiento de los profesionales sanitarios que tardan en establecer la sospecha, la presencia concomitante de otras infecciones y la difícil consecución de los fármacos que se utilizan para el tratamiento. La consecuencia del retraso en el tratamiento y su falta de efectividad puede dar lugar a la pérdida de visión e incluso del ojo. De aquí la importancia de hallar un tratamiento efectivo que resulte inocuo para el paciente y gane en eficacia, pudiéndose incluso acortar en el tiempo para favorecer la adherencia al mismo.

## 3. OBJETIVO DEL TRABAJO

Este trabajo forma parte de un estudio mucho más amplio que persigue la búsqueda de un tratamiento eficaz para la queratitis amebiana.

Objetivo general: llevar a cabo el cribado de fármacos de uso habitual en colirios y posibles combinaciones de ellos, para determinar su utilidad como amebicidas en queratitis amebianas.

Objetivos concretos:

- determinar cualitativamente, en base a la disminución de población o al daño celular causado, la actividad de los fármacos de uso habitual para el tratamiento de la QA, en comparación con tratamientos alternativos y posibles combinaciones de ellos.
- determinar cuantitativamente la actividad de aquellos fármacos y combinaciones que hayan sido evaluados positivamente en el objetivo anterior.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Material biológico: cepas de *Acanthamoeba* spp.

Se han utilizado dos cepas de *Acanthamoeba* spp. genotipo T4 (Fernández, 2014):

- ❖ P31: cepa ambiental aislada de una piscina de Zaragoza, seleccionada por su elevada resistencia a desinfectantes y por su alta patogenicidad *in vitro* e *in vivo*.
- ❖ G: cepa clínica procedente de un paciente infectado por QA, seleccionada por su elevada patogenicidad *in vitro* e *in vivo*.

### 4.2 Cultivo de las amebas

#### Medios de cultivo

Las amebas fueron cultivadas en dos medios diferentes en función del procedimiento llevado a cabo:

- ❖ **Medio no nutritivo (MNN):** 50 ml de solución salina de Neff's Modificada (PAS), 950 ml agua destilada, 15 g de agar bacteriológico tipo europeo. Es un medio sólido. En la superficie de la placa de Petri con MNN se distribuyeron 100  $\mu$ l de suspensión de *Escherichia coli* (ATCC 25922) inactivada por calor a 65°C durante 10 minutos, que actúa como nutriente para las amebas.
- ❖ **PPYG:** 20 g proteasa peptona, 5 g extracto levadura, 5 g glucosa, 50 ml solución PAS, 950 ml agua destilada. Es un medio líquido. Cada alícuota de PPyG (4 ml) en el momento de inocular *Acanthamoeba* spp. en ella fue suplementada con 25  $\mu$ l ampicilina 50 mg/ml, 15  $\mu$ l fungizona 10 mg/ml y 50  $\mu$ l ceftriaxona 10 mg/ml.

PAS: NaCl 2'4g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0'08g, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0'08g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2'84g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2'72g / 1 litro de agua destilada.

La esterilización de los medios se llevó a cabo en autoclave a 1 atmósfera de presión, 121°C, durante 10 minutos para PPyG y 15 minutos para MNN.

#### Condiciones de cultivo

Incubación a 30°C en estufa BINDER durante al menos un mes, con revisión del estado de los cultivos antes de su uso.

### **4.3 Fármacos / Antimicrobianos**

Los fármacos, antimicrobianos y compuestos alternativos que se han utilizado en este trabajo con el fin de hallar un tratamiento contra la QA son los siguientes:

- Tobramicina (Tm) (SIGMA-ALDRICH®, USA)
- Ciprofloxacino (Cp) (SIGMA-ALDRICH®, USA)
- Voriconazol (Vor) (SIGMA-ALDRICH®, USA)
- Clorhexidina (Clx) (SIGMA-ALDRICH®, USA)
- Verapamil (Vp) (SIGMA-ALDRICH®, USA)
- Celulasa (Cel) de *Aspergillus* spp. (SIGMA-ALDRICH®, USA)
- Sulfato de paromomicina (Pm) (SIGMA-ALDRICH®, USA)
- Isetionato de propamidina 0,1% (Brolene®, SANOFI, UK)
- Manzanilla Hornimans® en bolsita para infusión
- Té clásico Hornimans® en bolsita para infusión

### **4.4 Metodologías**

#### 4.4.1 Ensayos cualitativos en portaobjetos excavado

Con el objetivo de obtener una primera aproximación del efecto del fármaco sobre *Acanthamoeba* spp. y poder visualizarlo, se realizaron en portaobjetos excavados preparaciones de 10  $\mu$ l de cultivo de la ameba y 10  $\mu$ l de los antimicrobianos a probar a la concentración mayor de las indicadas en la sección 4.4.2, en el caso de que hubiera varias. Se preparó una muestra control con únicamente 10  $\mu$ l de *Acanthamoeba* spp.

Los portaobjetos excavados fueron tapados con un cubreobjetos y sellados con esmalte de base acetona, incubados a 30°C y visualizados con microscopio óptico al cabo de 24 horas.

De esta manera se pudieron seleccionar los antimicrobianos más efectivos contra *Acanthamoeba* spp. y analizarlos más exhaustivamente en un ensayo cuantitativo.

#### 4.4.2 Ensayos cuantitativos en medio líquido

El efecto de los compuestos que mayor capacidad presentaron contra *Acanthamoeba* spp. fue analizado cuantitativamente de acuerdo al siguiente procedimiento. Todos los ensayos fueron llevados a cabo por triplicado.

##### **1º) Siembra en placa de microtitulación**

Se tomaron 3 ml del cultivo con PPYG de *Acanthamoeba* spp. en fase exponencial de crecimiento y se centrifugaron (centrífuga Spectrofuge 24D, Labnet International) a 6000 rpm durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante por decantación y la concentración de amebas en el cultivo fue determinada mediante cámara de recuento Neubauer y microscopio óptico (ZEISS West) tras haber diluido 1:10 la muestra en suero fisiológico estéril.

En función del valor de la concentración, se calculó la dilución necesaria en PPYG para obtener un cultivo de  $10^6$  células/ml. Se inocularon 20  $\mu$ l de dicho cultivo en cada pocillo junto con 80  $\mu$ l de la disolución del antimicrobiano (o antimicrobianos) correspondiente, lo que supone un total de 20000 células/pocillo.

El antimicrobiano fue añadido mediante diluciones seriadas; para ello se prepararon soluciones madre de cada uno de los compuestos al doble de la mayor concentración a utilizar en cada caso. Ochenta microlitros se utilizaron para el ensayo y el resto se diluyó a la mitad con PPYG para obtener la siguiente concentración.

A continuación se detallan los diferentes fármacos ensayados, sus combinaciones y las concentraciones en cada uno de los pocillos:

- Tm 6 / 3 / 1'5 / 0'75 / 0'37 / 0'18 / 0'09 / 0'045 mg/ml
- Tm 6 / 3 / 1'5 / 0'75 / 0'37 / 0'18 / 0'09 / 0'045 mg/ml + Vp 3  $\mu$ M en cada pocillo
- Cp 6 / 3 / 1'5 / 0'75 / 0'37 / 0'18 / 0'09 / 0'045 mg/ml
- Cp 6 / 3 / 1'5 / 0'75 / 0'37 / 0'18 / 0'09 / 0'045 mg/ml + Vp 3  $\mu$ M en cada pocillo
- Vor 2, 1, 0'5, 0'25, 0'12%
- Clx 0'04, 0'02, 0'01, 0'005, 0'0025%
- Cp (mg/ml) + Vor (%): 6,2 / 3,1 / 1'5, 0'5 / 0'75, 0,25 → pasadas 24 h trasladamos el cultivo de cada pocillo a un eppendorf diferente, centrifugamos 10 minutos a 6000 rpm, retiramos por decantación el sobrenadante, devolvemos cada muestra a su pocillo, añadimos Clx 0,04% a cada uno y la cantidad necesaria de PPYG para obtener una concentración final del 0,02% en 100  $\mu$ l y se incubaron otras 24 horas.
- Cp (mg/ml) + Vor (%): 6,2 / 3,1 / 1'5, 0'5 / 0'75, 0,25 + Cel 10U/g en cada pocillo

En el caso de Tm, Cp, Clx y Vor, el valor de la mayor concentración empleada es el doble de la que se suele administrar en colirios a los pacientes.

En todos los ensayos se realizó un control (también por triplicado) utilizando medio PPYG al que no se añadió ningún fármaco.

### **2º) Determinación de la concentración**

Tras 24 horas (48 horas en el caso de Cp + Vor + Clx) de contacto con cada uno de los tratamientos a 30°C, se tomó una alícuota de 10  $\mu$ l de cada pocillo para realizar un conteo mediante cámara de Neubauer.

### **3º) Evaluación de la viabilidad tras el tratamiento**

Veinte  $\mu$ l de los cultivos con aquellos antimicrobianos eficaces contra *Acanthamoeba* spp. fueron sembrados en placa de Petri con MNN + *E. coli* para determinar si los quistes presentes tras la acción del tratamiento eran viables o no. Se mantuvieron en la estufa a 30°C y diariamente se observó la placa al microscopio óptico. En caso de transcurrir 15 días sin experimentar desenquistamiento, fueron considerados no viables (Fernández, 2014).

Todas las imágenes de los cultivos de *Acanthamoeba* spp. fueron tomadas con un microscopio óptico modelo Nikon Eclipse 80i.

#### **4.4.3 Análisis de datos**

Los cálculos de las concentraciones celulares a partir del conteo con cámara de Neubauer, los logaritmos y desviaciones estándar, así como los gráficos representados en el apartado 5 fueron llevados a cabo con Microsoft Excel 2010.

Se han representado gráficamente las concentraciones de fármaco frente a  $\log([]/[]_0)$ , siendo  $[]$  la concentración de amebas a las 24h de contacto con el agente y  $[]_0$  el número de amebas tras 24h en el pocillo control.

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **5.1 Tobramicina, ciprofloxacino y verapamil**

En 2013, García A caracterizó el transportador ATP-binding cassette (ABC), el cual actúa como bomba de eflujo en diferentes cepas de *Acanthamoeba* spp. otorgándole resistencia a antimicrobianos. En dicho ensayo, el transportador ABC resultó ser inhibido por verapamil aumentando el efecto de la tobramicina, con la que se administró simultáneamente afectando a la sensibilidad del protozoo.

Además, estudios previos (Muñoz-Bellido et al., 1999; Jacoby, 2005; y Jumbe et al., 2006) demuestran la alta afinidad que presentan las bombas de eflujo por las quinolonas en distintos microorganismos, aumentándoles ligeramente la resistencia a estos antibióticos.

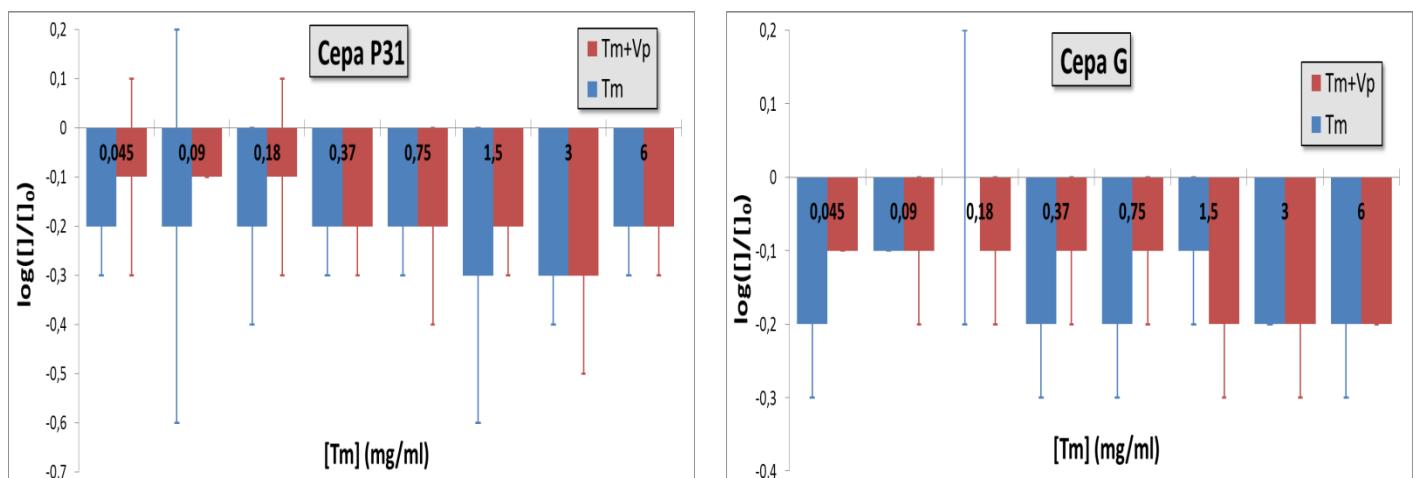
Por estas razones, tobramicina y ciprofloxacino y su combinación con verapamil fueron ensayados en primer lugar y directamente de forma cuantitativa.

### **Tobramicina**

Los resultados de los ensayos con tobramicina no muestran una correlación entre la cantidad de fármaco administrado y la concentración de células para ninguna de las cepas (figura 5). En prácticamente todas las concentraciones hubo una disminución del número de células con respecto al control, no obstante, la reducción fue muy ligera (en torno al 0'2). Esto contrasta con los resultados encontrados por Garcia A, en su trabajo realizado en 2013, que encontró aumento de la sensibilidad en al menos una cepa, muestra de la gran variabilidad entre las cepas de *Acanthamoeba* spp.

Estos primeros resultados cuantitativos nos permiten establecer que valores de  $\log([]/[]_0)$  iguales o más positivos que -0,2 indican que el tratamiento no provoca daño en la células.

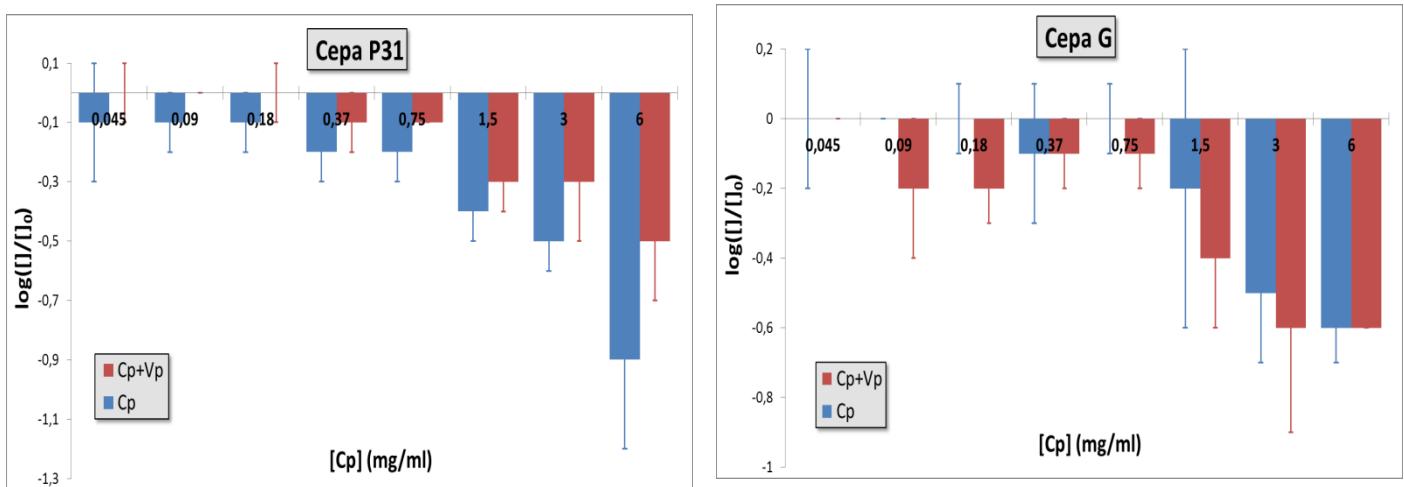
Pero además de la concentración de ameba, el estado morfológico en el que se encuentre tras el tratamiento va a ser un parámetro muy importante de análisis. Aunque la concentración de células sea muy baja tras el tratamiento, la presencia de un solo quiste viable podría dar lugar a una nueva infección. En el caso de tobramicina, a concentraciones de 6 y 3 mg/ml ya se observaron quistes grandes y bien formados, además de trofozoítos pequeños y con 0,75 mg/ml de Tm el aspecto de los trofozoítos era muy similar al del control. Lo que nos permite concluir que tobramicina no es un fármaco adecuado para tratar la QA causada, al menos, por las cepas P31 y G.



**Fig. 5.** Actividad de Tm (azul) y Tm + Vp 3  $\mu$ M (granate) a diferentes concentraciones sobre *Acanthamoeba* spp.

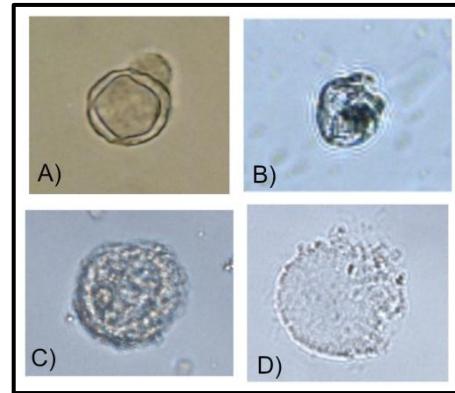
### **Ciprofloxacino**

Tras someter a *Acanthamoeba* spp. al tratamiento con ciprofloxacino los resultados fueron muy satisfactorios. Se logró alcanzar una alta disminución de células en comparación al control (figura 6): -0,9 en el caso de P31 y -0,6 para la cepa G, y la concentración celular fue inversamente proporcional a la concentración de fármaco administrado reflejando de esta manera su acción amebicida.



**Fig. 6.** Actividad de Cp (azul) y Cp + Vp 3  $\mu$ M (granate) a diferentes concentraciones sobre *Acanthamoeba* spp.

En cuanto a la fisonomía de las células tras el tratamiento con 6, 3 y 1'5 mg/ml de Cp no se observaron trofozoítos; y los quistes en estos pocillos (figura 7) presentaban un citoplasma deteriorado (7B y 7C) o en proceso de desintegración (7D). En ellos, además, no se apreciaba la doble pared. Todo ello indica que el fármaco estaba llevando a cabo su acción impidiendo la replicación del DNA, provocando la aparición, en algunos casos, de una serie de formaciones que, por su elevada similitud, podrían tratarse de vesículas apoptóticas. Conforme disminuyó la concentración de Cp, aparecieron trofozoítos, cada vez de mayor tamaño, pudiendo apreciar componentes de su estructura como la doble pared en quistes y las vacuolas o los acanthopodios en los trofozoítos.



**Fig. 7.** Quistes de la cepa G de *Acanthamoeba* spp. tras 24 horas de exposición a 6 mg/ml Cp. (x800) A) corresponde al control.

La exitosa actividad del ciprofloxacino sobre *Acanthamoeba* spp. hizo que este fármaco fuera seleccionado para su uso en combinación con otros (apartado 5.3).

### Verapamil

Las figuras 5 y 6 muestran cómo, de forma generalizada, al añadir verapamil no aumenta el efecto amebicida del tratamiento. En algunos casos del estudio de Cp + Vp sobre la cepa G se observa una mayor disminución de la concentración de células en comparación a Cp, pero este fenómeno es atribuible a circunstancias externas al fármaco como, por ejemplo, la propia variabilidad de los datos.

En caso de que el verapamil actuara como un inhibidor de una posible bomba de eflujo en *Acanthamoeba* spp., la acción del antibiótico se vería potenciada.

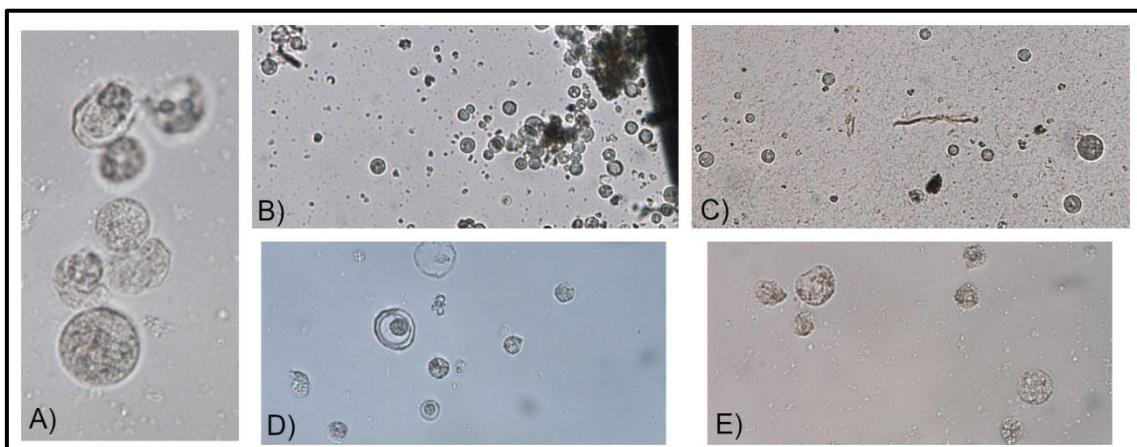
Los resultados encontrados sugieren que las cepas P31 y G podrían no tener estas bombas de eflujo como mecanismo de resistencia o, en caso de que la tengan, su actividad no aporta un nivel de resistencia importante a la cepa, a diferencia de lo ocurrido en la cepa estudiada por García A (2013).

## 5.2 Ensayos cualitativos en portaobjetos excavado

A la vista de los resultados obtenidos en el apartado anterior, se decidió realizar pruebas cualitativas de actividad de otros productos. Algunos de los compuestos ensayados cualitativamente no provocaron el efecto deseado contra *Acanthamoeba* spp., siendo descartados para la siguiente fase del trabajo. Los productos y combinaciones ensayados fueron: voriconazol, voriconazol más ciprofloxacino, voriconazol más paromomicina, clorhexidina, celulasa, Brolene®, infusión de manzanilla e infusión de té.

En la figura 8 puede observarse el efecto de los compuestos descartados (voriconazol más paromomicina, Brolene®, infusión de manzanilla e infusión de té) y cómo en todos los casos las amebas mantuvieron una morfología similar a la de la muestra control (8A), además de la presencia de trofozoítos (que son la forma infectante) y de la elevada concentración de células especialmente en las infusiones (8B y 8C). Las esencias de manzanilla y té fueron aplicadas en infusión acuosa debido a la elevada agresividad que pueden mostrar los aceites esenciales frente a las células del ojo (Sauter et al., 2011; y Vunda et. al, 2012). Es muy probable que estos últimos hubieran ejercido una gran actividad amebicida; pero al aplicar el tratamiento *in vivo* las células de la córnea también habrían sido gravemente dañadas.

Isetionato de propamidina consiguió reducir el citoplasma de los quistes (8D), pero estos son grandes y continúan siendo viables para desenquistarse y proseguir con la infección. En el ensayo con paromomicina + voriconazol (8E), los trofozoítos presentaron deterioro de su citoplasma pero el daño fue insuficiente.



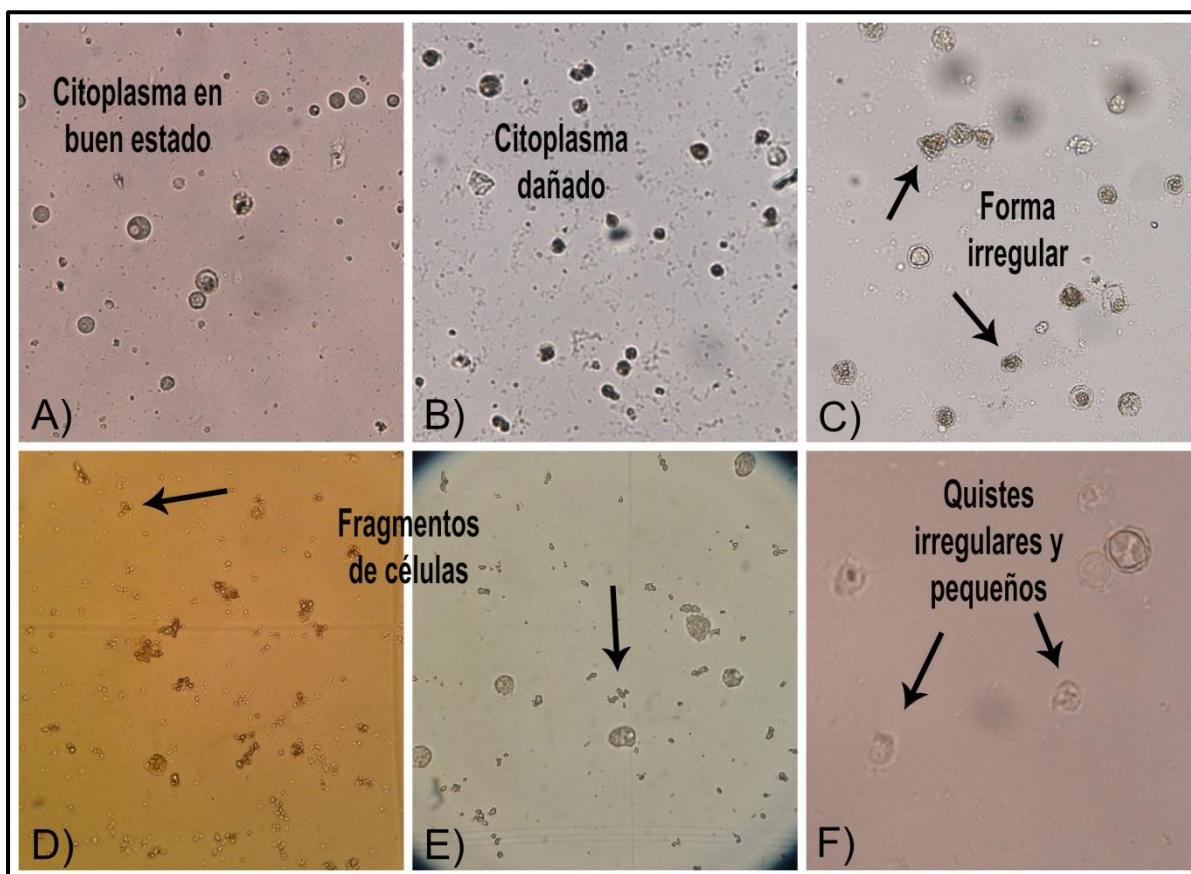
**Fig. 8.** Cultivo de *Acanthamoeba* spp. en portaobjetos excavado tras 24 horas de incubación a 30°C con B) infusión de manzanilla (x100), C) infusión de té (x100), D) isetionato de propamidina (x400), E) paromomicina 6 mg/ml + voriconazol 2% (x400). A) muestra control (x600).

Sin embargo, hubo otros compuestos que en el portaobjetos excavado ocasionaron un mayor efecto contra *Acanthamoeba* spp. (figura 9) y que fueron seleccionados para proseguir su evaluación de forma cuantitativa y ser analizados en combinación con otros. Estos compuestos fueron voriconazol, voriconazol más ciprofloxacino, clorhexidina y celulasa.

El voriconazol fue ensayado de forma individual en primer lugar (9A), pero dado que su acción consiste principalmente en inhibir el enquistamiento no se pudo apreciar daño en las células,

la mayoría de ellas fueron trofozoítos, por esa razón a continuación se llevó a cabo un ensayo de voriconazol en combinación con ciprofloxacino. Al impedir el enquistamiento, el voriconazol podría causar que las células sean más sensibles al daño ocasionado por el ciprofloxacino. Los resultados de este ensayo muestran una población amebiana con el citoplasma deteriorado en prácticamente todos sus miembros excepto unos pocos quistes todavía resistentes (9B). Asimismo, las amebas estaban aún más dañadas en comparación al tratamiento solo con ciprofloxacino puesto que la forma de algunas de ellas empieza a ser irregular (9C). Por este motivo fue escogido para ser estudiado de forma más exhaustiva junto con el ciprofloxacino.

La clorhexidina degradó en gran medida a las células alterando su membrana, muestra de ello son los abundantes fragmentos de ameba distribuidos por el medio de cultivo (9D). Y además, las células que pudieron ser identificadas como resistentes al tratamiento presentaron su interior de color oscuro y su viabilidad es dudosa (9E). En último lugar, la celulasa, con su actividad degradadora de la celulosa (principal componente de la pared del quiste), alteró ligeramente la típica forma redondeada de los quistes y redujo su tamaño (9F), un efecto interesante que se intentó potenciar combinando la celulasa con otros fármacos (apartado 5.3).



**Fig. 9.** Cultivo de *Acanthamoeba* spp. en portaobjetos excavado tras 24 horas de incubación a 30°C con A) Vor 2% (x150), B(x150) y C(x300)) Vor 2% + Cp 6 mg/ml, D y E) Clx 0,04% (x200), F) Cel 10 U/g (x500).

### 5.3 Combinaciones de fármacos

Tras los ensayos cualitativos y una vez visto el efecto de los fármacos de forma individual, consideramos que debíamos estudiar el efecto que provocaban administrados de forma simultánea puesto que si atacamos por diferentes vías a *Acanthamoeba* spp. podríamos conseguir aumentar el daño e incluso llegar a eliminar los quistes que son las formas que presentan mayor resistencia.

Antes de comenzar con el análisis de las combinaciones cabe destacar que previamente se evaluó cuantitativamente al voriconazol y a la clorhexidina.

Tras ser sometidas a la mayor concentración de voriconazol (2%) se observaron trofozoítos en buen estado en el cultivo celular, situación que se repitió en los sucesivos ensayos a menor concentración. La densidad de amebas es en algunos casos mayor que en el pocillo control, y las disminuciones no alcanzan el -0,3 en ninguna de las cepas (figura 11), lo que se considera un valor bajo. Podemos concluir por tanto que el voriconazol por sí mismo no posee actividad amebicida, en este caso. Existen estudios aunque son escasos, en los que se ha empleado voriconazol al 1% como componente adicional a la terapia estándar para tratar la QA y en uno de ellos, tres pacientes con la infección lograron ser curados (Bang et. al, 2010).

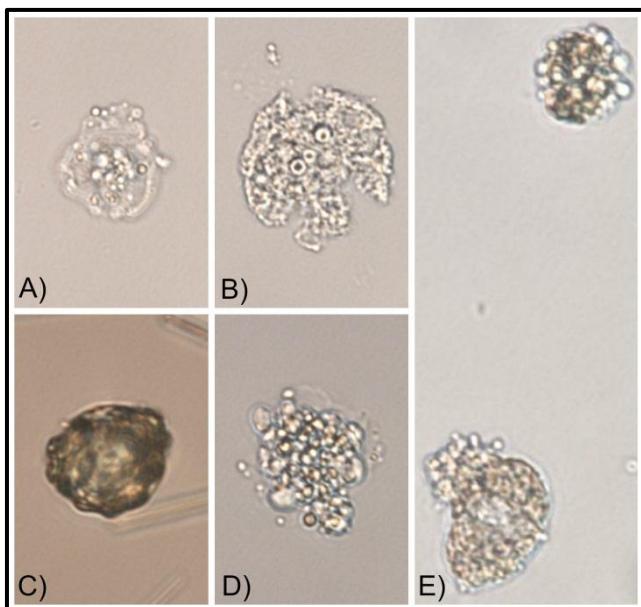
La clorhexidina ejerció un gran efecto contra *Acanthamoeba* spp. no sólo por la disgregación de las células, tal y como se describió en apartado 5.2, sino por el elevado número de ellas que sufrieron dicha acción, lo que se refleja en la figura 10 con un valor de descenso en el logaritmo de la concentración de -0'4 y -0,6 para P31 y G respectivamente. La tendencia de los resultados muestra como a mayor concentración de clorhexidina disminuye más la población celular. El valor positivo en el caso de la cepa G para 0,0025% Clx nos indica que a esa concentración la clorhexidina no afecta a la ameba. El estudio del efecto de la clorhexidina a concentraciones más bajas que la habitual administrada en los tratamientos actuales contra la QA (0,02%), resulta de interés porque unos de los inconvenientes de la terapia con biguanidas es el daño que provocan en las células de la córnea al ser sometidas a ellas durante varios meses (Lorenzo-Morales et al., 2015). Sin embargo, el descenso con 0,01% Clx fue menor en comparación a 0,02% Clx y el estado de las amebas mejoró, apareciendo quistes de gran tamaño y bien formados. Por tanto, la solución para dejar de dañar las células corneales quizás no sea disminuir la concentración de clorhexidina sino que su periodo de aplicación no sea tan duradero y eso puede llegar a conseguirse con la primera de las combinaciones de este trabajo.

De cara a los gráficos que representan los tratamientos combinatorios es importante señalar que solo fueron estudiados con las cuatro concentraciones de Cp y Vor más elevadas: de 0,75 / 0,25 a 6 / 2; y por tanto el valor de la diferencia de logaritmos para el apartado 0,37 / 0,12 (mg/ml / %) tanto con clorhexidina 0,02% como con celulasa 10U no vale 0 sino que no hay dato y por ello no aparece ninguna barra morada ni naranja respectivamente. El rango de concentraciones ensayadas fue disminuido porque los resultados obtenidos hasta este punto del trabajo nos han mostrado que las concentraciones más bajas de fármaco han tenido un efecto muy escaso o prácticamente nulo.

### 5.3.1 Ciprofloxacino + Voriconazol + Clorhexidina

En vista de que al mezclar ciprofloxacino con clorhexidina se forma un precipitado granulado, estos tres fármacos no pudieron ser añadidos al pocillo al mismo tiempo sino que la clorhexidina se administró a las 24 horas habiendo retirado previamente el ciprofloxacino y el voriconazol tal y como se indica en el apartado 4.4.2.

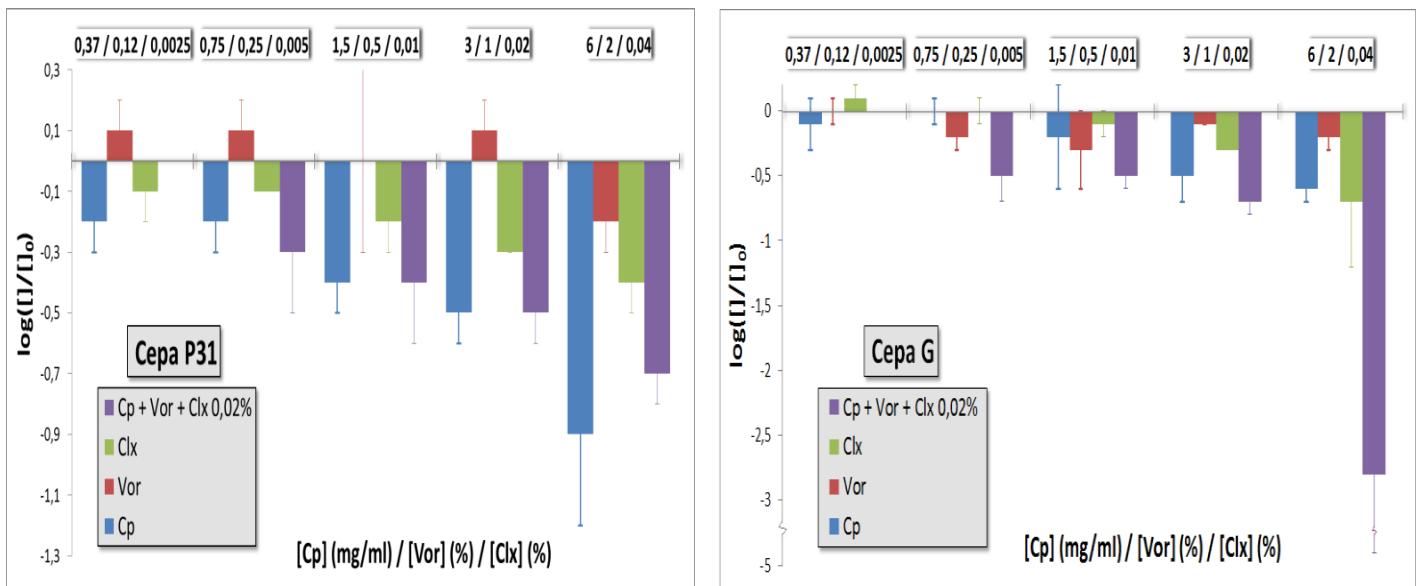
Los resultados obtenidos fueron altamente satisfactorios. En primer lugar porque en todos los tratamientos vistos por el momento, siempre ha habido algún quiste resistente que no ha sido afectado, sin embargo, mediante esta combinación se ejerció un daño de manera mucho más generalizada puesto que todas las células del cultivo presentaron algún u otro tipo de deterioro en cualquiera de las concentraciones ensayadas, y también porque no se observó ni un solo trofozoíto en ninguna de ellas. A 6 / 2 y 3 / 1 (mg/ml Tm / % Vor) el daño fue tan elevado que fue requerido un estudio en medio sólido para determinar su viabilidad; a menores concentraciones el daño fue menor pero todos los quistes continuaban con morfología alterada. Los quistes dañados presentaban tamaño pequeño (menor de 15  $\mu$ m), citoplasma deteriorado, forma irregular debido a la alteración de la pared, fragmentación y/o bacterias adheridas a su superficie que antes se encontraban en el interior (figura 10).



**Fig. 10.** Quistes de *Acanthamoeba* spp. dañados tras tratamiento con 6 mg/ml Cp + 2% Vor + 0,02% Clx (A y B) y 3 mg/ml Cp + 1% Vor + 0,02% Clx (C, D y E) (x800).

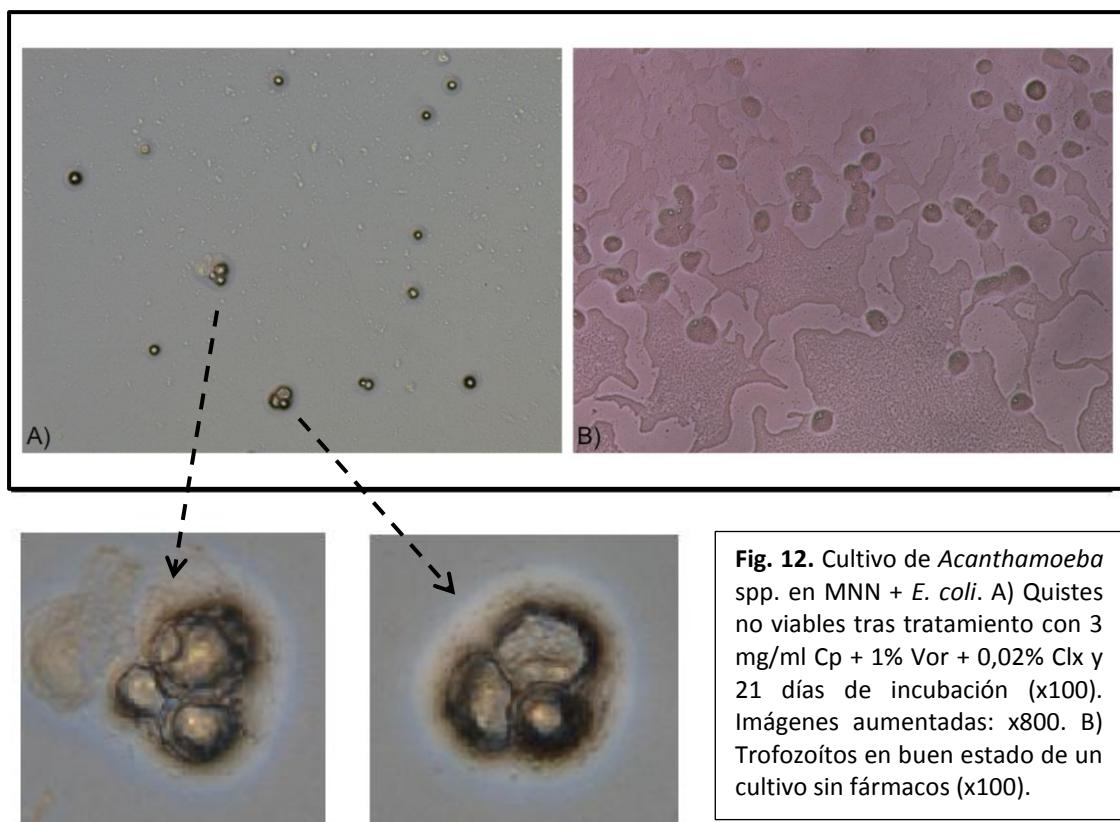
En las gráficas que comparan los diferentes tratamientos (figura 11) se observa un descenso progresivo y significativo de la concentración celular siendo el correspondiente a las máximas concentraciones de fármaco -0,7 para P31 y -2,7 para G; la combinación realizó un gran efecto contra esta última cepa llegando casi a erradicar la presencia de la ameba en el cultivo.

Por otro lado, a pesar de que para la cepa P31 la diferencia de logaritmos sea mayor en el tratamiento solo con ciprofloxacino que para la combinación, el efecto amebicida fue mucho mayor tras la combinación de fármacos que con cada uno de los compuestos por separado.



**Fig. 11.** Actividad de Cp (azul), Vor (granate), Clx (verde) y Cp + Vor + Clx 0,02% (morado) a diferentes concentraciones sobre *Acanthamoeba* spp.

La explicación de ello radica en la viabilidad de las amebas: tras la terapia combinatoria, había células que a pesar de su gran daño presentaban una forma más o menos diferenciable y que por tanto fueron incluidas en el recuento ya que por simple observación es imposible determinar si son viables o no. Para analizar su viabilidad se llevó a cabo un ensayo en medio MNN + *E. coli* sembrando una alícuota del cultivo tras el tratamiento. En caso de que los quistes fueran viables, al inocularlos en la placa y dotarles de un ambiente favorable para su crecimiento, comenzarían a desenquistarse, pasando al estadio de trofozoíto y pudiendo desplazarse por la placa. En caso contrario, no se desenquistarán y permanecerán con la misma morfología que presentaron tras el tratamiento con fármacos (figura 12). Los cultivos fueron visualizados diariamente para determinar si se había producido desenquistamiento.



**Fig. 12.** Cultivo de *Acanthamoeba* spp. en MNN + *E. coli*. A) Quistes no viables tras tratamiento con 3 mg/ml Cp + 1% Vor + 0,02% Clx y 21 días de incubación (x100). Imágenes aumentadas: x800. B) Trofozoítos en buen estado de un cultivo sin fármacos (x100).

El estudio mostró que las células del cultivo con 1,5 y 0,75 mg/ml de ciprofloxacino se desenquistaron antes de 15 días, límite de tiempo a partir del cual fue establecido que serían considerados no viables. En el caso de 6 y 3 mg/ml de ciprofloxacino se desenquistaron el día 17. En cuanto a los tratamientos combinatorios, en ninguno de ellos se observó desenquistamiento tras 21 días de cultivo; a partir de este periodo de tiempo, se dejaron de observar puesto que ya no es seguro que el medio de cultivo se encuentre en condiciones óptimas. Por tanto, ninguno de los quistes incluidos en el recuento para determinar la concentración celular tras el tratamiento combinatorio pudo considerarse viable quedando demostrado de esta manera que la terapia formada por Cp, Vor y Clx resultó más efectiva que únicamente Cp.

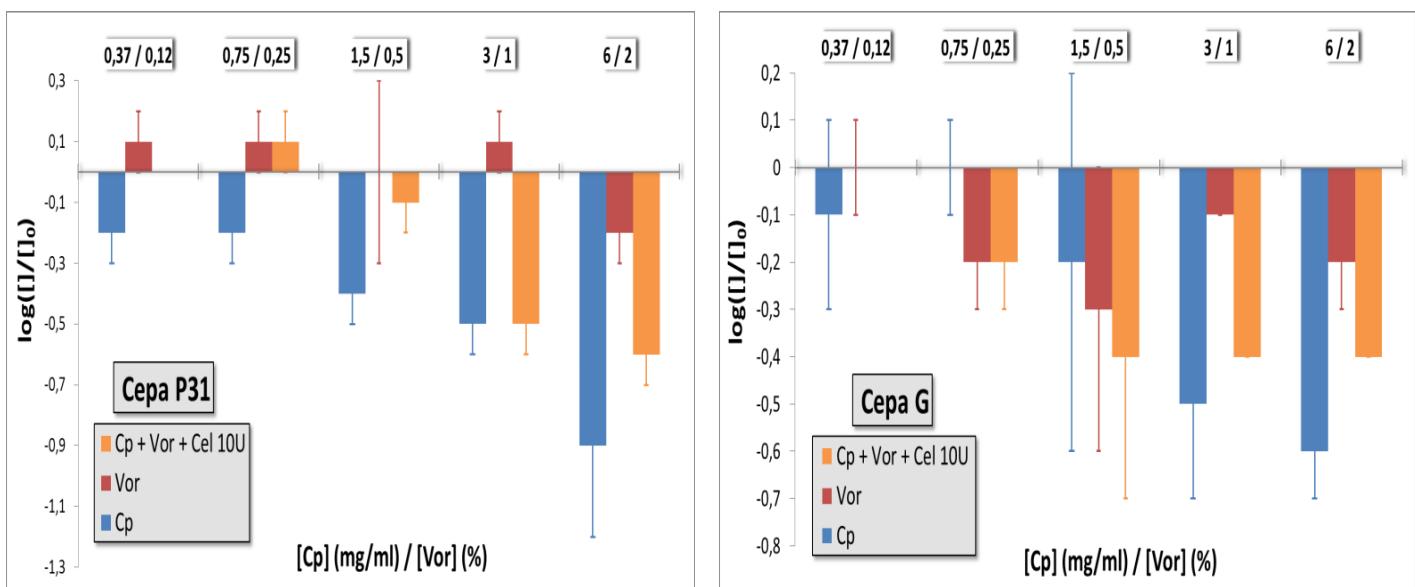
### 5.3.2 Ciprofloxacino + Voriconazol + Celulasa

El compuesto restante que actuó de forma satisfactoria en los ensayos cualitativos fue la celulasa. Su acción va a provocar una ligera ruptura de la pared del quiste que podemos aprovechar para que facilitar la actuación de otros fármacos y que así consigan llegar a su interior y colapsarlo. Dicha acción será llevada a cabo por el ciprofloxacino y el voriconazol actuará inhibiendo el enquistamiento de las amebas. Para ello, los tres compuestos se añadieron de forma simultánea sobre el cultivo.

Sin embargo, la combinación no funcionó como se esperaba. Además de quistes dañados, en el ensayo con 6 / 2 (mg/ml Tm / % Vor) aparecieron otros de tamaño grande y con la morfología adecuada y a la concentración más baja, la presencia de trofozoitos era evidente. La figura 13 muestra cómo el tratamiento combinatorio actuó reduciendo la población amebiana de forma significativa en 6 / 2 y 3 / 1(mg/ml Tm / % Vor) para ambas cepas y además en 1,5 / 0,5 (mg/ml Tm / % Vor) en el caso de la cepa G.

No obstante, para la cepa G la reducción es mucho menor que la obtenida con la combinación que contenía clorhexidina (-0,4 en comparación a -2,7), y en el caso de P31, aunque dicha reducción no sea tan diferente (-0,6 frente a -0,7) el enorme daño sufrido por las amebas al emplear la clorhexidina con respecto a la presencia de quistes en estado sano y trofozoitos en los ensayos con celulasa, resulta clave para considerar que esta combinación también ha sido mucho menos efectiva contra la cepa P31. Por último, en la gráfica también se aprecia la mayor actividad contra *Acanthamoeba* spp. de ciprofloxacino que con esta combinación y cabría preguntarse si la celulasa estaría interfiriendo en la acción de los otros dos compuestos.

Asimismo, al igual que procedimos con la combinación anterior, la viabilidad de los quistes tras la exposición a los fármacos fue analizada. Los resultados de los ensayos en medio sólido corroboraron la ineficacia de este tratamiento en comparación al efecto generado por la combinación con clorhexidina. El tiempo en días registrado tras la inoculación de los cultivos en el medio sólido hasta el desenquistamiento aparece reflejado en la tabla 1.



**Fig. 13.** Actividad de Cp (azul), Vor (granate) y Cp + Vor + Cel 10U (naranja) a diferentes concentraciones sobre *Acanthamoeba* spp.

	Cp (mg/ml) / Vor (%) / Cel (U)			
	0,75 / 0,25 / 10	1,5 / 0,5 / 10	3 / 1 / 10	6 / 2 / 10
P31	2 días	5 días	9 días	12 días
G	3 días	3 días	5 días	10 días

**Tabla 1.** Tiempo en días que tardaron en desenquistarse las cepas P31 y G de *Acanthamoeba* spp. tras 24h de tratamiento y siembra en medio sólido.

#### 5.4 Posibles estudios posteriores

Una vez analizados los resultados de todos los tratamientos *in vitro* contra *Acanthamoeba* spp. estudiados en este trabajo podemos afirmar que el que mayor efecto amebicida presentó fue la combinación de ciprofloxacino, voriconazol y clorhexidina. No obstante, dado que en nuestros ensayos, *Acanthamoeba* spp. ha sido expuesta al fármaco una sola vez, la acción tanto de éste como del resto de tratamientos podría verse aumentada en caso de que fueran administrados de igual manera que los colirios actuales comercializados, esto es, aplicar la solución del fármaco sobre el ojo cada hora los primeros días del tratamiento e ir reduciendo la frecuencia conforme avanzan las semanas. Además, para que la combinación ciprofloxacino, voriconazol y clorhexidina pueda llegar a convertirse en un tratamiento real contra la QA resulta imprescindible realizar un estudio de su citotoxicidad en las células corneales. Por tanto, posteriormente debería realizarse una validación *in vivo* de los resultados obtenidos en este trabajo.

## 6. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

En este trabajo se han evaluado diferentes compuestos antimicrobianos que podrían resultar de interés para el tratamiento de la queratitis producida por *Acanthamoeba* spp. A partir de los resultados obtenidos, se puede concluir que, para las cepas P31 y G:

1. El antibiótico tobramicina posee una actividad amebicida muy débil. Al igual que infusiones de manzanilla y té, y así como la paromomicina.
2. La utilización de inhibidores de bombas de eflujo no supone una ventaja para el tratamiento, sugiriendo que estas bombas pueden no estar presentes en todas las cepas o al menos su actividad no es importante para la resistencia al fármaco.
3. Ciprofloxacino provoca daño celular tanto en quistes como en trofozoítos, estableciéndose como un fármaco clave de cara a diseñar una terapia combinada.
4. La combinación de ciprofloxacino, voriconazol y clorhexidina se presenta como una alternativa eficaz para tratar la QA.
5. La celulasa disminuye el efecto del ciprofloxacino si se combina con ella.

*In this study several antimicrobial compounds that could be interesting as a treatment for *Acanthamoeba* spp. keratitis have been evaluated. Based on the results obtained, for P31 and G strains, it can be concluded that:*

1. *Tobramicine has a very weak amoebicidal activity. The same can be asserted in reference to chamomile and tea infusions, and paromomycin.*
2. *The use of efflux pumps inhibitors is not an advantage for the treatment. This suggests that efflux pumps may not be present in all strains or, at least, its activity is not significant for drug resistance.*
3. *Ciprofloxacin causes cell damage in cysts and trophozoites, becoming a key drug in order to design a mixture therapy.*
4. *The mix of ciprofloxacin, voriconazole and chlorhexidine can be seriously considered as an effective alternative for treating QA.*
5. *Cellulase decreases the effect of ciprofloxacin when they are mixed up.*

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Aqeel Y, Siddiqui R, Khan NA. Silencing of xylose isomerase and cellulose synthase by siRNA inhibits encystation in *Acanthamoeba castellanii*. *Parasitol Res.* 2013; 112(3):1221-7.
- Bang S, Edell E, Eghrari AO, Gottsch JD. Treatment with voriconazole in 3 eyes with resistant *Acanthamoeba* keratitis. *American Journal of Ophthalmology.* 2010; 149(1):66-69.
- Booton GC, Joslin CE, Shoff M, Tu EY, Kelly DJ, Fuerst PA. Genotypic identification of *Acanthamoeba* spp. isolates associated with an outbreak of *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea.* 2009; 28(6):673-6.
- Cannas S, Usai D, Pinna A, Benvenuti S, Tardugno R, Donadu M, Zanetti S, Kaliamurthy J, Molicotti P. Essential oils in ocular pathology: an experiment study. *J Infect Dev Ctries.* 2015; 9(6):650-654.
- Castrillón JC, Orozco LP. *Acanthamoeba* spp. as opportunistic pathogens parasites. *Rev Chilena Infectol.* 2013; 30(2):147-155.
- Corsaro D, Walochnik J, Köhsler M, Rott MB. *Acanthamoeba* misidentification and multiple labels: redefining genotypes T16, T19, and T20 and proposal for *Acanthamoeba micheli* sp. nov. (genotype T19). *Parasitol Res.* 2015; 114(7):2481-90.
- Del Buey MA, Cristóbal JA, Casas P, Goñi P, Clavel A, Mínguez E, Lanchares E, García A, Calvo B. Evaluation of in vitro efficacy of combined riboflavin and ultraviolet a for *Acanthamoeba* isolates. *Am J Ophthalmol.* 2012 Mar; 153(3):399-404.
- Fernández MT. Caracterización molecular de Amebas de Vida Libre e identificación de otros parásitos en aguas de red de la provincia de Zaragoza. Asociación con otros microorganismos y riesgos para la Salud Pública. Tesis doctoral, Universidad de Zaragoza. 2014.
- García A. Amebas de vida libre en muestras ambientales y humanas. Tesis doctoral, Universidad de Zaragoza. 2013.
- Gomes TdS, Magnet A, Izquierdo F, Vaccaro L, Redondo F, Bueno S, Sánchez ML, Angulo S, Fenoy S, Hurtado C, Del Aguilá C. *Acanthamoeba* spp. in Contact Lenses from Healthy Individuals from Madrid, Spain. *PLoS ONE.* 2016; 11(4):e0154246.
- Jacoby GA. Mechanisms of Resistance to Quinolones. *Clinical Infectious Diseases* 2005; 41:S120-6.
- Jumbe NL, Louie A, Miller MH, Liu W, Deziel MR, Tam VH, Bachhawat R, Drusano GL. Quinolone efflux pumps play a central role in emergence of fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(1):310-7.
- Knickelbein JE, Kovarik J, Dhaliwal DK, Chu CT. *Acanthamoeba* keratitis: a clinicopathological case report and review of the literature. *Hum Pathol.* 2013; 44(5):918-22.

Lorenzo-Morales J, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Arnalich-Montiel F, Piñero J, Valladares B. *Acanthamoeba* keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide? *Trends Parasitol.* 2013; 29(4):181-7.

Lorenzo – Morales J, Khan N, Walochnik J. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite.* 2015; 22, 10.

Martín-Navarro CM, Lorenzo-Morales J, Machin RP, López-Arencibia A, García-Castellano JM, de Fuentes I, Loftus B, Maciver SK, Valladares B, Piñero JE. Inhibition of HMG-CoA reductase and the application of statins as a novel effective therapeutic approach against *Acanthamoeba* infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2013; 57(1), 375–381.

Muñoz-Bellido JL, Alonso MA, Martínez JA, Gutiérrez MN, Ortiz G, Segovia M, García-Rodríguez JA. Efflux pump-mediated quinolone resistance in *Staphylococcus aureus* strains wild type for *gyrA*, *gyrB*, *gyrC*, and *gyrD*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43(2):354–356.

Risler A, Coupat-Goutaland B, Pélandakis M. Genotyping and phylogenetic analysis of *Acanthamoeba* isolates associated with keratitis. *Parasitol Res.* 2013 Nov; 112(11):3807-16.

Sauter IP, dos Santos JC, Apel MA, Cibulski SP, Roehe PM, von Poser GL, Rott MB. Amoebicidal activity and chemical composition of *Pterocaulon polystachyum* (Asteraceae) essential oil. *Parasitol Res.* 2011; 109(5):1367-71.

Siddiqui R, Khan N. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasit Vectors.* 2012; 5:6.

Sissons J, Alsam S, Jayasekera S, Kim KS, Stins M, Khan NA. *Acanthamoeba* induces cell-cycle arrest in host cells. *J Med Microbiol.* 2004; 53(Pt 8):711-7.

Sissons J, Kim KS, Stins M, Jayasekera S, Alsam S, Khan NA. *Acanthamoeba castellanii* induces host cell death via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Infect Immun.* 2005; 73(5):2704-8.

Vunda SL, Sauter IP, Cibulski SP, Roehe PM, Bordignon SA, Rott MB, Apel MA, von Poser GL. Chemical composition and amoebicidal activity of *Croton pallidulus*, *Croton ericoides*, and *Croton isabelli* (Euphorbiaceae) essential oils. *Parasitol Res.* 2012; 111(3):961-6.