

El conejo como modelo animal para la reproducción de la infección corneal por *Acanthamoeba polyphaga*

The rabbit as animal model of corneal infection by *Acanthamoeba polyphaga*

Fecha de recepción: 30/01/2006
Fecha de aceptación: 25/04/2006

BERNARDO QUIJANO¹, MYRIAM CONSUELO LÓPEZ²,
LIGIA INÉS MONCADA², CRISANTO DE JESÚS MORENO¹

RESUMEN

Objetivo. Evaluar el conejo inmunosuprimido sistémica y tópicamente, como modelo animal en infecciones de la córnea por *Acanthamoeba castellanii* y *Acanthamoeba polyphaga*. **Materiales y métodos.** El trabajo se realizó en dos etapas. La primera fue exploratoria, para observar la virulencia de las dos especies de *Acanthamoeba*, para las córneas de conejos. Se seleccionaron dos machos de raza Nueva Zelanda, de un mes de edad y 2 kg de peso. Los ojos de cada animal se inocularon con diferentes concentraciones de trofozoítos obtenidos de cultivo axénico. Como en esta fase la especie que mostró mayor virulencia fue *A. polyphaga*, en la segunda fase se les aplicó una concentración de 10^6 trofozoítos de esta especie, previa inmunosupresión tópica con betametasona subconjuntival y acetato de prednisolona, y sistémica mediante aplicación intramuscular de dexametasona. La inoculación de *A. polyphaga* se realizó a los 15 días después de la inmunosupresión, con 1×10^6 trofozoítos en el ojo derecho de 20 conejos; el ojo izquierdo se tomó como control. A los 90 días después de la infección, se sacrificaron los conejos, se enuclearon los ojos y se diseccionó la córnea para el estudio histopatológico. **Resultados.** La manifestación clínica fue una opacidad que persistió hasta los 90 días después de la inoculación. En la histopatología se encontró una reacción inflamatoria inespecífica, con macrófagos, linfocitos y monocitos rodeados por material eosinofílico, hallazgo diferente a lo registrado por otros autores, pero no se observaron quistes ni trofozoítos. **Conclusión.** A pesar del esquema de inmunosupresión utilizado y de que la cepa de *A. polyphaga* invadió las córneas de hámster *in vitro*, no fue posible hacerlo en el conejo. La opacidad de la córnea no coincide con la respuesta descrita por otros autores.

Palabras clave: *Acanthamoeba polyphaga*, modelo, queratoconjuntivitis.

Infectio 2006; 10(2): 79-84

ABSTRACT

The purpose of this work was to evaluate both the systemic and topical immunosuppressed rabbit as an animal model for corneal infections by *Acanthamoeba castellanii* and *A. polyphaga*. **Materials and methods.** The study was carried out in two phases, an initial exploratory one to observe the virulence of the two *Acanthamoeba* species studied, for which two male New Zealand rabbits were used, and in the second one rabbits were inoculated with *A. polyphaga* trophozoites, which showed the greatest virulence in the first phase, after immunosuppressive topical treatment with subconjunctival betametasone and topical prednisolone acetate. *A. polyphaga* was inoculated 2 weeks after immunosuppression with 1×10^6 trophozoites in the right eye of 20 rabbits; the left eye was left as a control. 90 days post-inoculation the rabbits were euthanized, their eyes enucleated and studied through histopathology. **Results.** The clinical presentation was a corneal opacity persisting until 90 days post-inoculation. The histological study showed an unspecific inflammatory reaction, with macrophages, lymphocytes and monocytes, surrounded by eosinophilic material, findings that differ to those reported by other authors, but no trophozoites nor cysts were observed. The corneal opacity did not coincide with the response described by other authors. **Conclusion.** Despite the immunosuppressive drug regime used, the experimental infection could not be achieved in rabbits. The corneal opacity did not coincide with the response described by other authors.

Key words: *Acanthamoeba polyphaga*, rabbit, animal model

¹ Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia.

² Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia.

INTRODUCCIÓN

Las amibas de vida libre son organismos que tienen comportamiento de tipo oportunista, lo que significa que viven en diferentes ambientes, pero en algunas ocasiones pueden infectar a los humanos y producirles patologías.

Las amibas de vida libre se describieron en 1841 y hasta la fecha sólo se han registrado cuatro géneros que pueden producir patología en el hombre y los animales: *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia* y *Sappinia* (1). El género que se encuentra con mayor frecuencia produciendo patología en humanos, y del que se han podido obtener la mayoría de los aislamientos, especialmente en el globo ocular, es *Acanthamoeba*, con las especies *A. castellani*, *A. polyphaga*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. rhyodes*, *A. lugdunensis*, *A. quina* y *A. griffini* (2).

Se han aislado especímenes pertenecientes al género *Acanthamoeba* en equipos de aire acondicionado, en fuentes de agua como piscinas, agua de acueductos, agua embotellada, soluciones para la limpieza de lentes de contacto y, también, en la mucosa oral o nasal de individuos sintomáticos y asintomáticos. Las amibas de este género presentan estadios de trofozoítos y quistes. Los trofozoítos, que son la forma invasiva, miden entre 15 y 45 μm y producen patología, mientras que los quistes son la forma de resistencia que adopta el microorganismo en condiciones ambientales adversas, especialmente ante cambios bruscos de temperatura. En los cortes histopatológicos de los pacientes con queratitis por *Acanthamoeba* se pueden ver quistes que se encuentran rodeados de una reacción inflamatoria; los quistes miden entre 12 y 16 μm de diámetro, pueden tener forma de estrella, esférica o poligonal, y presentan uno o más opérculos. De acuerdo con el tamaño de los quistes, el número de opérculos y la tolerancia a la temperatura, se pueden dividir en 15 fenotipos diferentes, según la secuencia de ADN de 18S; más del 90% de las cepas que se han aislado produciendo patologías pertenecen a los grupos T3 y T4 (1, 3).

La infección ocular causada por amibas de vida libre produce cuadros inespecíficos de queratoconjuntivitis y ulceraciones de la córnea, de evolución tórpida y de difícil manejo, que fácilmente pueden terminar en perforación ocular y endoftalmitis si no se hace un diagnóstico temprano (4). Estudios recientes con escáner confocal sugieren que la queratitis se produce con mayor frecuencia de lo que se creía

(5). Las manifestaciones clínicas de la enfermedad pueden confundirse con las de otras entidades como la infección por *Herpes simplex* y otros tipos de queratitis, lo que dificulta el diagnóstico diferencial, retarda el tratamiento y, por tanto, empeora el pronóstico (6).

En la actualidad, no hay consenso sobre la eficacia de los fármacos empleados y la utilidad de los corticosteroides en el manejo de las queratitis ulcerativas por *Acanthamoeba* y tampoco existe un esquema de tratamiento bien establecido. En un análisis retrospectivo, Rabinovich *et al.* (7) encontraron que el uso de corticosteroides tópicos fue el único factor importante en la falla del tratamiento, mientras que autores como Bacon *et al.* (8) y Lindquist *et al.* (9) reportaron éxito terapéutico con esquemas de tratamiento que incluyeron el uso de corticosteroides tópicos. En contraposición, D'Aversa *et al.* (10) recomiendan evitar su aplicación y sugieren que, al inhibir la respuesta inflamatoria del hospedero, se reduce la efectividad de los tratamientos su éxito.

Con el fin de lograr un mejor conocimiento de la enfermedad que permita establecer un esquema adecuado de diagnóstico y tratamiento, se hace necesario realizar investigación en animales de experimentación en búsqueda de un buen modelo animal, en el cual la infección y la enfermedad sean adecuadamente reproducibles.

Hasta el momento, no se ha establecido un modelo animal. Autores como Font *et al.* (11), Larkin *et al.* (12), Cote *et al.* (13) y Badenoch *et al.* (14) han informado la utilidad de diferentes animales, incluido el conejo, para el estudio de queratitis por *A. polyphaga* y *A. culbertsoni* que se adhieren a las corneas cultivadas *in vitro*, en contraste con *A. castellani* que no muestra adherencia a estos especímenes.

El objetivo del presente trabajo es evaluar el comportamiento del conejo con inmunosupresión sistémica y tópica como modelo animal en infecciones corneales por *A. polyphaga*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo animal. El estudio se realizó siguiendo las normas de ética para investigación en animales establecidas por el bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia, el cual contempla las normas nacionales, Ley 84 de 1989 e internacionales (15-17).

Por las similitudes que existen entre el ojo del conejo y el del humano y la facilidad de manipulación, se escogió este animal como modelo (18, 19) para el desarrollo de queratitis por *A. polyphaga*, *A. castellani* o ambas. Los conejos utilizados fueron machos, de raza Nueva Zelanda de un mes de edad, con un peso de 2.500 g.

Cepas de *A. castellani* y *A. polyphaga*. Las cepas de las dos especies de amibas fueron donadas por Víctor Tsutsumi del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados de la Ciudad de México (CINVESTAV) (20).

Metodología. El trabajo se realizó en dos etapas. La primera fase fue de tipo exploratorio, para la cual se utilizaron dos conejos de raza Nueva Zelanda seleccionados en forma aleatoria. En esta fase se inocularon trofozoitos de *A. castellani* obtenidos de cultivo axénico en medio de Chang, en los dos ojos de uno de ellos, y trofozoitos de *A. polyphaga* en los dos ojos del otro ejemplar, con el objetivo de establecer la virulencia de las dos cepas y de esta manera escoger la que mostrara mayor agresividad.

El procedimiento se realizó bajo anestesia general, por administración de una mezcla de 0,25 mg de diazepam y 0,01 mg de fentanil por vía intramuscular, de acuerdo con los protocolos del bioterio. En cada ojo se aplicó una gota de anestésico tópico (oxibuprocaina 0,4%) y una gota de maleato de timolol 0,5%, para provocar hipotensión ocular.

Se practicó desbridamiento del epitelio corneal central con hoja de bisturí No. 11, bajo microscopio con un aumento de 6X, en ambos ojos de cada conejo; luego se irrigó la superficie corneal con solución salina estéril al 0,85% y, finalmente, se dispensó 1 µl de suspensión del medio de cultivo con los trofozoitos de *A. castellani* o *A. polyphaga* (con una concentración promedio de 10^5 trofozoitos/ml) sobre el estroma desnudo del ojo derecho de cada conejo y 0,5 µl de la misma suspensión (con una concentración promedio de 5×10^4 trofozoitos/ml) sobre el estroma del ojo izquierdo. El área de inoculación fue de 3 mm, aproximadamente, en cada ojo en la zona central de la córnea, equidistante del limbo esclerocorneal.

La recuperación anestésica se hizo de acuerdo con las normas del bioterio (12-14), después de lo cual se aplicó una gota de anestésico tópico (oxibuprocaina 0,4%) en cada ojo, cada 8 horas.

Aunque algunos autores, como Font (11), consideran al conejo como un modelo animal adecuado para la reproducción de queratitis por *Acanthamoeba*, las observaciones hechas en la primera fase del estudio no coincidieron con tales reportes, porque no se logró reproducir la infección en los animales inoculados. Por lo tanto, en la segunda fase los conejos se sometieron a un esquema de inmunosupresión tópica y sistémica, previo a la inoculación con *A. polyphaga*, que pareció demostrar mayor virulencia que en la primera fase del estudio.

El esquema de inmunosupresión se realizó según el protocolo del bioterio, (12-14) mediante la administración de betametasona subconjuntival (4 mg) y acetato de prednisolona 0,12% tópico, una gota cada 8 horas, durante 8 días. La inmunosupresión sistémica se hizo con dexametasona, 10 mg/kg de peso por vía intramuscular, durante 3 días. La anestesia se aplicó de la misma forma y con el mismo esquema utilizado en la primera fase.

El día 15 después de la inmunosupresión sistémica, se realizó la inoculación del ojo derecho de 20 conejos con 0,5 ml de una suspensión de trofozoitos de *A. polyphaga* en solución salina estéril con una concentración de 1×10^6 trofozoitos de amebas/ml. El ojo izquierdo no se inoculó y se dejó como control para cada ejemplar. La inoculación se hizo en el estroma anterior con jeringa de insulina, dirigiendo la aguja desde la periferia hacia el centro de la córnea para tener mayor certeza de reproducir la enfermedad.

Después de la inoculación, se hicieron evaluaciones clínicas los días 1, 3, 7 y 10, y después semanalmente hasta el día 90. Los ojos inoculados se examinaron con aumento de 6X en condiciones adecuadas de iluminación y con el haz de luz de una linterna.

La opacidad corneal resultante se clasificó según la escala establecida para otros modelos animales por Larkin *et al.* (12).

- G 0 = normal
- G I = opacidad visible solamente al disponer una fuente de luz de manera oblicua
- G II = opacidad visible que no oscurece los vasos del iris
- G III = opacidad visible que oscurece los vasos del iris

A los 60 días después de la inoculación, se sacrificaron los conejos de acuerdo con los protocolos nacionales e internacionales de eutanasia (6, 15, 17), se enuclearon los globos oculares, las córneas se disecaron y posteriormente se fijaron en formaldehído tamponado, para su posterior procesamiento y estudio histopatológico.

RESULTADOS

Como criterios de patogenicidad se consideraron los establecidos por Khan (22) en lo concerniente al número de acantopodios.

Primera fase. Se observó que las opacidades corneales provocadas en el conejo inoculado con *A. castellani* desaparecieron de ambos ojos en forma definitiva al primer día después de la inoculación, con reepitelización normal de la córnea sin dar ningún signo de infección activa, mientras que, en el inoculado con *A. polyphaga*, las opacidades desaparecieron al tercer día, pero a partir del quinto día se empezó a observar una leve opacidad del estroma posterior en el ojo izquierdo, aparente sólo al examen con fuente de luz oblicua dirigida al iris, que se clasificó como G I y que persistió hasta el momento de su sacrificio; no se evidenció ningún otro signo de infección activa similar a los descritos en humanos.

Segunda fase. Las opacidades encontradas en el ojo derecho de los 20 conejos inoculados con *A. polyphaga* se clasificaron como G I.

Como estas opacidades no constituían un buen criterio de infección activa para iniciar las pruebas terapéuticas, y ante la ausencia de otros signos clínicos que sugirieran progresión de la enfermedad ni similitud alguna con la evolución natural observada en humanos, se decidió dejar evolucionar la entidad sin la introducción de ningún tratamiento hasta el día 90 después de la inoculación. Este día también se definió de acuerdo con los estudios previos en animales.

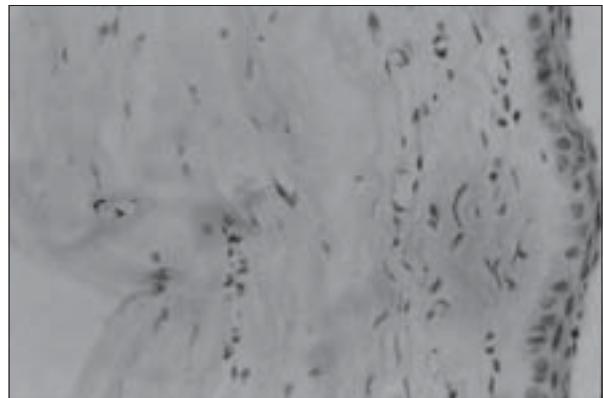
Las opacidades persistieron hasta el día 90, sin mostrar modificación alguna en sus características iniciales ni aparición de signos inflamatorios asociados u otras manifestaciones clínicas que sugirieran progresión de la enfermedad; por esta razón, se consideró que no se había logrado reproducir la infección corneal, no se instauró ningún tratamiento y se

decidió realizar el sacrificio de los animales e interrumpir el protocolo.

Histopatología. En todos los especímenes, la tinción del tejido corneal con hematoxilina-eosina mostró una reacción inflamatoria inespecífica con presencia de macrófagos, linfocitos y monocitos (figura 1), rodeados por material eosinofílico y áreas de adelgazamiento estromal localizadas en el sitio de la inoculación. No se observaron quistes ni trofozoitos de *Acanthamoeba* en ninguno de los 20 especímenes estudiados.

Figura 1

Tinción del tejido corneal con hematoxilina-eosina. 100X



DISCUSIÓN

El modelo animal escogido ha mostrado su utilidad en la reproducción de infecciones corneales por *Acanthamoeba* spp. con características similares a las observadas en humanos (13). McClellan *et al.* (23) han observado que la inyección intramuscular de dexametasona tiene un profundo efecto en la incidencia, gravedad y cronicidad de la queratitis y que dicha enfermedad en hámster tratados con dexametasona es significativamente más grave que en aquéllos que no reciben el corticoide. Los autores concluyen que la inmunosupresión previa con dexametasona atenúa la respuesta del sistema inmune al parásito y facilita su patogenicidad.

El mismo modelo animal también ha sido útil para reproducir infecciones oculares por adenovirus (queratoconjuntivitis), en las cuales ha sido evidente que, cuando el conejo se ha sometido a inmunosu-

presión con un corticoide tópico como el acetato de prednisolona al 1%, ha ocurrido un incremento notorio en la replicación del virus, pues su administración deprime la respuesta inmune del animal e impide que pueda controlar la infección (24, 25).

Luego de haber observado que *Acanthamoeba* no se adhirió a la córnea desepitelizada de los conejos en la fase exploratoria del estudio, se decidió someter a los animales de la segunda fase a un protocolo de inmunosupresión tópica y sistémica para atenuar su respuesta inmune y realizar la inoculación intraestromal para garantizar la colonización tisular, según lo recomendado por Larkin (12). No obstante, tampoco se logró reproducir la infección.

En este estudio la infección no fue reproducible, no obstante las condiciones de inmunosupresión local y sistémica previamente instauradas, a diferencia de lo encontrado por Deng *et al.* (23), quienes pudieron reproducir la enfermedad en 6 conejos a los que se le había suministrado 3 días antes dexametasona, a pesar de que el esquema de tratamiento con corticosteroides fue más fuerte en el presente trabajo.

La opacidad corneal observada en los conejos no fue representativa y no coincide con la respuesta prevista y descrita en otros estudios. Font *et al.* (11) encontraron inflamación y necrosis después de la administración de esteroides tópicos o subconjuntivales, antes de la inoculación intraestroma de *A. castellani*. La respuesta inflamatoria encontrada en los estudios histopatológicos es de tipo celular, principalmente de células mononucleares, lo que estaría de acuerdo con una respuesta inmune al parásito o a sus lipoproteínas más que al trauma provocado por la inoculación, pues en este último caso la respuesta se caracterizaría por predominio de células polimorfonucleares y por desaparición temprana de las mismas, del escenario de la inflamación.

Van Klink *et al.* (24) informan que, cuando se toma el hámster chino como modelo animal para queratitis por *Acanthamoeba castellani*, no hay respuesta del tipo de hipersensibilidad retardada. Sin embargo, los estudios de histopatología realizados en este trabajo muestran una buena respuesta inflamatoria.

Las observaciones hechas no permiten establecer si la atenuación de la respuesta inflamatoria es consecuencia del efecto inmunosupresor de los

esteroides, como ha sido descrito por autores como Romanowski *et al.* (25). Ellos reportaron, además de una potente acción antiinflamatoria, un gran efecto inmunosupresor sobre la respuesta del huésped o si, por el contrario, es el resultado de la disminución en la virulencia de la cepa utilizada, o sencillamente que la cepa con la que se trabajó no es una cepa virulenta como lo proponen Walochnick *et al.* (2). En nuestro estudio, a pesar de haberse incrementado factores importantes de riesgo tales como la desepitelización corneal, la inmunosupresión sistémica y local y el aumento en la concentración del inóculo, no fue posible reproducir la enfermedad, no obstante que la cepa de *A. polyphaga* en un experimento *in vitro* con córneas de hámster, mostró adhesión a la superficie de las células epiteliales y posterior daño a las células epiteliales (20).

Recientemente, se han implementado dos métodos especiales para diferenciar cepas patógenas y no patógenas de *Acanthamoeba*; la actividad extracelular de las proteasas y las secuencias tipo de ADN ribosómico 18S, ya que las características morfológicas parecen no ser seguras pues se ha visto que aún en quistes derivados de un mismo clon hay variación intraespecífica (2, 27).

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia, por la financiación del proyecto, al personal del bioterio Central y del laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina y a Víctor Tsutsumi del CINVESTAV.

REFERENCIAS

1. **SCHUSTER FL, VISVESVARA GS.** Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animales. *Intern J Parasitol.* 2004;34: 1001-27.
2. **WALOCHNIK J, HALLER-SCHOBER AM, KÖLLI H, PICHER O, OBWALLER A, ASPÖCK H.** Discrimination between clinically relevant and nonrelevant *Acanthamoeba* strains isolated from contact lens-wearing keratitits patients in Austria. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:3932-6.
3. **DUDLEY R, MATIN A, ALSAM S, SISSONS J, MARGHOSOOD AH, KHAN NA.** *Acanthamoeba* isolates belonging to T1, T2, T3, T4 but no T7 encyst in response to increased osmolarity and cists do not bind to human corneal epithelial cells. *Acta Tropica.* 2005;95:100-8.
4. **PARK DH, PALAY DA, DAYA SM.** The role of topical corticosteroids in the management of *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea.* 1997;16:27-83.
5. **KINNEAR F.** *Acanthamoeba* pathogenicity for corneal cells. *J Inf.* 2004;49:310-6.
6. **KIRKNESS CM, HAY J, SEAL DV, AITKEN D.** *Acanthamoeba* keratitis. *Ophthalmol Clin North Am.* 1994;7:605-16.
7. **RABINOVICH T, WEISSMAN SS, OULER HB, SHEPPARD JD, TEIKARI J.** *Acanthamoeba* keratitis: clinical signs and analysis of outcome. *Rev Infect Dis.* 1991;13(Suppl.5):S427.
8. **BACON AS, FRAZER DG, DART JKG, MATHESON M, FICKER LA, WRIGHT P.** A review of 72 consecutive cases of *Acanthamoeba* keratitis, 1984-1992. *Eye.* 1993;7:719-25.
9. **LINDQUIST TK, SHER NA, DOUGHMAN DJ.** Clinical signs and medical therapy of early *Acanthamoeba* keratitis. *Am J Ophthalmol.* 1968;106:73-7.
10. **D'AVERSA G, STERN GA, DRIEBE WT.** Diagnosis and successful medical treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *Arch Ophthalmol.* 1995;113:1120-3.
11. **FONT RL, TAPERT MJ, ROBINSON NM, VISVESVARA GS, MURPHY D, OSATO MS.** An animal model of *Acanthamoeba* keratitis: further studies with emphasis on the early phase destruction of the trophozoites. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1982;22(S):-163.
12. **LARKIN DFP, EASTY DL.** Experimental *Acanthamoeba* keratitis: I. Preliminary findings. *British Journal of Ophthalmology.* 1990;74:551-5.
13. **COTE MA, IRVINE JA, RAO NA.** Evaluation of the rabbit as a model of *Acanthamoeba* keratitis. *Rev Infect Dis.* 1991;13(Suppl. 5):443-4.
14. **BADENOCH PR, JOHNSON AM, CHRISTY PE, COSTER DJ.** Pathogenicity of *Acanthamoeba* and *Corynebacterium* in the rat cornea. *Arch Ophthalmol.* 1990;108:107-12.
15. **CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE.** Guide Teo. The care and use of experimental animals. Vol 1. Ottawa: Canadian Council on Animal Care; 1993.
16. **MRAD DE OSORIO A, CARDOZO CA.** Utilización de animales de laboratorio en la experimentación biológica. Santa Fe de Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2000.
17. <http://www.programamckee.or.cr/manuales/eutanasia.pdf>. Consultado 10-02-06
18. **PANJWANI N, ZHAO Z, BAUM J, HAZLETT LD, YANG Z.** *Acanthamoeba* bind to rabbit corneal epithelium *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997;38:1858-64.
19. **SAID NA, SHOEIR AT, PANJWANI N, GARATE M, CAO Z.** Local and systemic humoral immune response during acute and chronic *Acanthamoeba* keratitis in rabbits. *Curr Eye Res.* 2004; 29:429-9.
20. **OMANA-MOLINA M, NAVARRO-GARCÍA F, GONZÁLEZ-ROBLES A, SERRANO-LUNA JJ, CAMPOS-RODRÍGUEZ R, MARTÍNEZ-PALOMO A, TSUTSUMI V, SHIBAYAMA M.** Induction of morphological and electrophysiological changes in hamster cornea after *in vitro* interaction with trophozoites of *Acanthamoeba* spp. *Infection and Immunity.* 2004;72:3245-51.
21. **CHANG S, SMOLL.** Free living amebas. Cultivation, quantification, identification, clasification, pathogenesis and resistance. *Curr Topics.* 1971;201:53.
22. **KHAN NA, JARROLL EL, PAGET TA.** Molecular ad physiological differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba*. *Curr Microbiol.* 2002;45:197-202.
23. **MCCLELLAN K, HOWARD K, NIEDERKON JY, ALIZADEH H.** Effect of steroids on *Acanthamoeba* cysts and trophozoites. *Invest Ophtalmol Vis Sci.* 2001;42:2885-93.
24. **VAN KLINK F, ALIZADEH H, HE Y, MELLON JA, SILVANY RE, MCCULLEY JP, NIEDERKON JY.** The role of contact lenses, trauma and Langerhans cells in a Chinese hamster model of *Acanthamoeba* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Scien.* 1993;34:1937-44.
25. **ROMANOWSKI EG, ROBA LA, WILEY L.** Short-term treatment with a potent topical corticosteroid of an acute ocular adenoviral infection in the New Zeland white rabbit. *Cornea.* 2001;20:657-60.
26. **DENG X, GUO X, PANG G, TIAN X.** Establishment of a rabbit model of *Acanthamoeba* keratitis. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi.* 1999;17(5):308-10. Consultado en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd/08/05>.
27. **KHAN NA, JARROLL EL, PANJWANI N, PAGET TA.** Proteases as markers for differentiation of pathogenic and nonpathogenic species of *Acanthamoeba*. *J Clin Microbiol.* 2000;38:2858-61.