



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

**INSTITUTO DE OFTALMOLOGIA
FUNDACION CONDE DE VALENCIANA**

**VALORACION DE LA RESPUESTA
INMUNOLOGICA SISTEMICA EN
PACIENTES CON QUERATITIS HERPETICA**

TESIS DE POSTGRADO

Que para obtener el diplomado de especialidad en

OFTALMOLOGIA

Presenta el

Dr. José Alberto Rocha Medina

DIRECTOR DE TESIS

Dra. María del Carmen Jiménez Martínez



México, D.F. 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DR. ENRIQUE GRAUE WIECHERS
PROFESOR DEL CURSO

DRA. CLAUDIA ELENA MURILLO CORREA
JEFE DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION

DRA. MARIA CARMEN JIMENEZ MARTINEZ
DIRECTORA DE TESIS

ASESORES

DRA. CONCEPCION SANTACRUZ VALDES

Médico Adscrito al Departamento de Córnea

Instituto de Oftalmología

Fundación Conde de Valenciana

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología “Fundación Conde de Valenciana”, dirigido por las doctoras María del Carmen Jiménez Martínez y Concepción Santacruz Valdes. Fue apoyado parcialmente por el proyecto CONACYT – SALUD 2005 – 14108 y “Fundación de Asistencia Privada Conde de

Valenciana I.A.P.”

AGRADECIMIENTOS

**A MIS PADRES POR SU APOYO COMPLETO E INCONDICIONAL
A TRAVES DE TODOS ESTOS AÑOS**

**A MI DIRECTORA DE TESIS SIN CUYA AYUDA NADA DE ESTO
HABRIA SIDO POSIBLE**

INDICE

I.	INTRODUCCION	7
II.	MATERIALES Y METODO	9
III.	RESULTADOS	11
IV.	DISCUSION	18
V.	BIBLIOGRAFIA	22

INTRODUCCION

El virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1) es un agente infeccioso con alta prevalencia en la población, encontrándose presente en el 60-90% de los adultos, de ellos el 20% es susceptible de desarrollar una infección ocular (1) denominada queratitis herpética. Es importante señalar que el 20% de estas queratitis evoluciona a una lesión inmunoinflamatoria denominada queratitis estromal herpética (QEH). La inmunopatogénesis de la QEH en humanos es aún poco entendida y la mayoría de nuestro conocimiento actual proviene de modelos animales. (2) En estos modelos se sabe que el herpesvirus puede alcanzar la superficie ocular desde fuentes externas y quedar suspendido en la película lagrimal, (3) desde donde puede infectar las células epiteliales corneales más exteriores y dirigirse a células de capas inferiores que son metabólicamente más activas, donde es capaz de replicarse. (1) Durante este proceso infeccioso se genera una respuesta inflamatoria en el estroma subyacente caracterizada por un infiltrado de leucocitos polimorfonucleares (4) que tiene una duración de 4-5 días; posteriormente entre los 15 y 21 días post-infección aparece una segunda oleada inflamatoria caracterizada por linfocitos T CD4+ Th1 (T helper 1, T cooperadoras 1, por sus siglas en inglés) productores de IFN-g (5). El microambiente inducido por los linfocitos T CD4+ favorece un estado proinflamatorio rico en TNF- α , IL-1 e IL-6 que favorece mayor migración celular y daño corneal; si la replicación viral continúa se establece una infección crónica en los queratocitos, en donde la expresión de los antígenos virales provee un estímulo persistente para que los linfocitos T CD8+ reconozcan a los determinantes antigénicos virales presentes en los queratocitos, destruyéndolos por un mecanismo citotóxico e incrementando el daño corneal, por lo que se ha sugerido que más que una citopatología de origen viral se trata de un daño inmunológico (3) Este proceso inflamatorio persistente en el estroma observado en las QEH experimentales es similar a las QEH humanas en donde hay edema, opacidad corneal y neovascularización lo que en algunos casos puede conducir a ceguera.

Con los datos obtenidos en el modelo animal se postula que en seres humanos ocurre un proceso de migración linfocitaria similar, en este sentido es necesario evaluar la respuesta inmunológica sistémica en pacientes con QEH con la finalidad de conocer si existen periféricamente células competentes con capacidades efectoras, es decir, capaces de producir citocinas similares a las encontradas en el modelo animal y que se encuentran presentes en circulación de pacientes con QEH, lo que fue el objetivo de nuestro estudio.

MATERIAL Y METODOS

Pacientes. Se incluyeron en este trabajo 7 pacientes con diagnóstico clínico de QEH, mayores de 18 años que voluntariamente quisieron participar en este estudio y que dieron su consentimiento informado para la toma de muestra sanguínea. Se incluyeron además 7 individuos sanos (IS) de la misma edad y sexo que los pacientes con QEH, sin alteraciones oculares de tipo infeccioso y que también dieron su consentimiento informado para la toma de muestra sanguínea.

Separación de Células Mononucleares (CMN). Las CMN obtenidas de la muestra de sangre venosa fueron separadas del paquete eritrocitario por centrifugación a 1,750 rpm en Ficoll-hypaque (1.077 de densidad), durante 30 minutos a 4°C. Una vez obtenidas fueron lavadas y su viabilidad fue determinada por exclusión del colorante azul tripano, cuantificándose en un hemocitómetro.

Cultivos celulares. Las CMN fueron cultivadas en placas de 24 pozos, colocando por pozo 1×10^6 células en 1 ml de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 0.5% a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. 24 h después, el medio de cultivo fue cambiado por RPMI-1640 suplementado con SFB al 10%, y los cultivos celulares fueron puestos en presencia de PMA/Ionomicina (25ng/1mg), con o sin brefeldin-A (10 µg/ml). 4 h después, se dio fin al periodo de incubación y las CMN fueron cosechadas. El sobrenadante de cultivo fue congelado a -70°C hasta su utilización.

Determinación de citocinas intracelulares. Una vez cosechadas, las CMN fueron marcadas con anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD4 y CD8 (BD Biosciences Pharmingen, CA, USA), conjugados a un fluorocromo, en un segundo paso las células fueron permeabilizadas

con saponina y marcadas con IFN-g e IL-4 (BD Biosciences Pharmingen, CA, USA) también conjugadas a un fluorocromo, Los resultados fueron analizados por citometría de flujo

Determinación de citocinas en sobrenadante (SN). El SN de los cultivos fue utilizado para determinar la presencia de IL-1b, IL-6 y TNF-a (R&D Systems, MN, USA) mediante un sándwich ELISA cuantitativo según la metodología propuesta por el fabricante. Los resultados fueron leídos en un lector de ELISA (ThermoLabsystems, Helsinki, Finland) a 450nm de longitud de onda y corrección de 540nm.

Análisis estadístico. Se utilizó U-Mann Whitney para comparación entre dos grupos, considerándose una $p < 0.05$ como estadísticamente significativa. El análisis estadístico se realizó con el programa SigmaStat y las gráficas con SigmaPlot.

RESULTADOS

Producción de citocinas intracelulares en las diferentes poblaciones de linfocitos T. El primer objetivo de nuestro estudio fue determinar la producción de citocinas Th1 vs Th2 (IFN-g vs IL-4) en los linfocitos T cooperadores (CD4+) y citotóxicos (CD8+) de pacientes con QEH.

Tabla 1. Citocinas intracelulares en linfocitos T

	LINFOCITOS T CD4+		LINFOCITOS T CD8+	
	Pacientes con QEH	Individuos sanos	Pacientes con QEH	Individuos sanos
IFN-g	15.9 ± 4.5*§	8.1 ± 4.1*	32.8 ± 17.5†	31.2 ± 15.5‡
IL-4	6.5 ± 3.3§	4.4 ± 3.4	5.4 ± 1.8†	6.2 ± 2.1‡

* p=0.024, § p=0.006, † p=0.008, ‡ p=0.007

En el caso de las poblaciones CD4+ se encontró que el porcentaje de células IFN-g+ fue 1.9 veces superior en pacientes con QEH que en IS (p 0.024); en cambio el porcentaje de células IL-4+ fue 1.4 veces superior en pacientes con QEH que en IS, sin ser estadísticamente significativo. Al analizar el porcentaje de linfocitos T CD4+IL-4+ contra el porcentaje de linfocitos T CD4+IFN-g+ en pacientes con QEH, encontramos que los linfocitos Th1 son 2.4 veces más frecuentes que los linfocitos Th2 (p=0.006), sin diferencias significativas entre las poblaciones Th1/Th2 en IS. En la figura 1a y 1b se muestran las imágenes características obtenidas por citometría de flujo en donde se

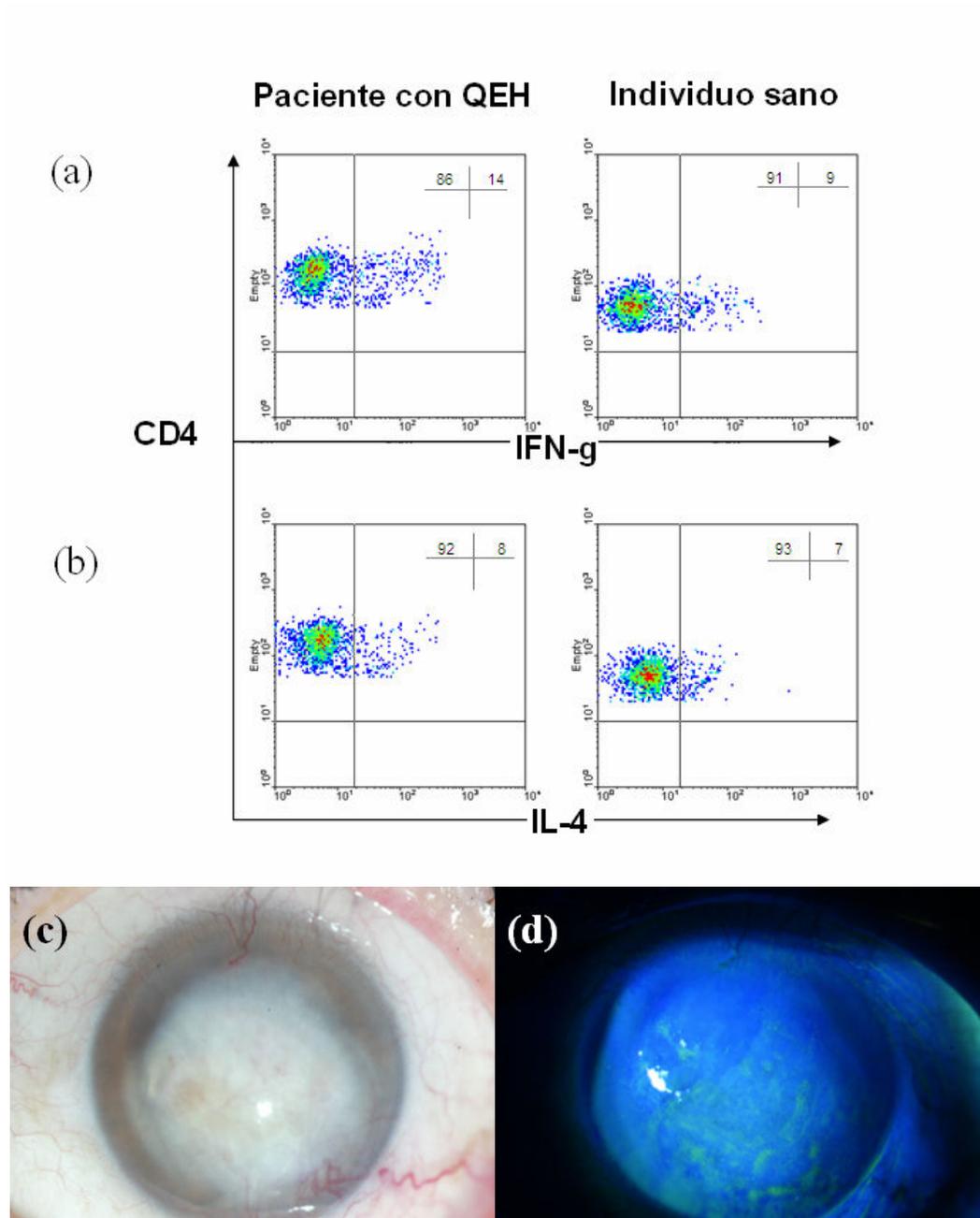


Figura 1. Citocinas intracelulares en linfocitos T CD4+. Citometría de flujo que muestra la frecuencia de linfocitos T CD4+ (eje de las Y) y de (a) células IFN-g+ o (b) células IL-4 (eje de las X) de un paciente con queratitis estromal herpética (QEH) (Figura representativa de 7) y un individuo sano (Figura representativa de 7). El análisis fue hecho exclusivamente en la ventana para CD4.

(c) Paciente con queratitis estromal, se observa una opacidad blanquecina con infiltrado inflamatorio y vascularización importante, sin compromiso epitelial con inclusión del estroma anterior, medio y posterior.

(d) Paciente con queratitis estromal y tinción con fluoresceína, se puede observar que no existe involucro en la superficie epitelial

observa que el número de linfocitos T CD4+IFN-g+ es superior en individuos con QEH. En las figuras 1c y 1d se muestra una imagen característica de lesión estromal herpética y tinción con fluoresceína, respectivamente.

En el caso de las poblaciones CD8+ no se encontraron cambios en el porcentaje de células IFN-g+ siendo prácticamente similar en pacientes con QEH e IS, mientras que el porcentaje de células IL-4+ fue 0.9 veces menor en pacientes con QEH que en IS, sin ser estadísticamente significativo. Al analizar el porcentaje de linfocitos T CD8+IL-4+ contra el porcentaje de linfocitos T CD8+IFN-g+ en pacientes con QEH, encontramos que los linfocitos Tc1 (T cytotoxic 1, T citotóxicos 1, por sus siglas en inglés) son 6 veces más frecuentes que los linfocitos Tc2 (p=0.008); de la misma

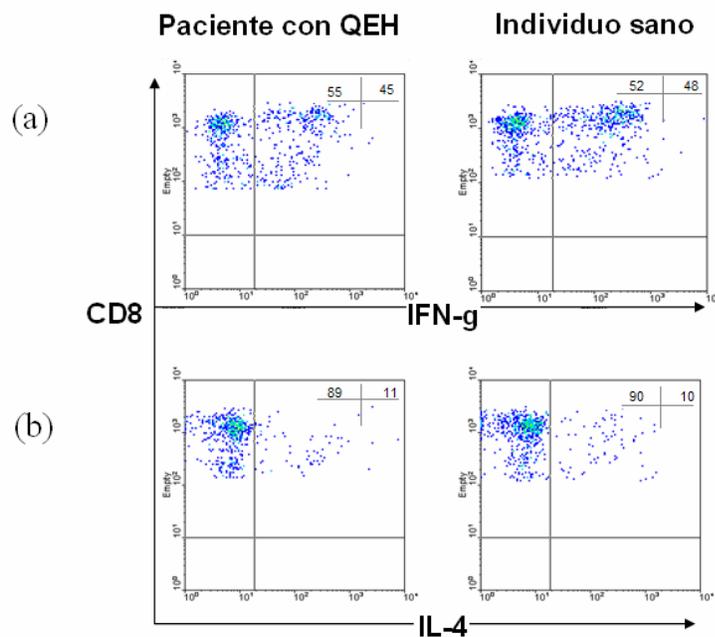


Figura 2. Citocinas intracelulares en linfocitos T CD8+. Citometría de flujo que muestra la frecuencia de linfocitos T CD8+ (eje de las Y) y de (a) células IFN-g+ o (b) IL-4+ (eje de las X) de un paciente con queratitis estromal herpética (QEH) (Figura representativa de 7) y un individuo sano. El análisis fue hecho exclusivamente en la ventana para CD8.

manera, observamos que la frecuencia de linfocitos Tc1 en IS fue 5 veces superior que los linfocitos Tc2 ($p=0.007$). En la figura 2a y 2b se muestran las imágenes características obtenidas por citometría de flujo en donde se observa que el número de linfocitos T CD8+ IFN- γ + y CD8+IL-4+ es similar en pacientes con QEH e IS con predominio de Tc1 en ambos grupos. Los resultados en porcentaje encontrados para las distintas poblaciones celulares en pacientes con QEH e IS se resumen en el cuadro 1.

Citocinas proinflamatorias en sobrenadante (SN) de cultivo. Un segundo objetivo de este estudio fue conocer si la cooperación inducida por los linfocitos T tenía alguna repercusión en la producción de citocinas proinflamatorias. Al determinar la concentración de citocinas encontramos que las células estimuladas (CE) de pacientes con QEH producen 13.12 veces más TNF- α que las células no estimuladas (CNE) ($p<0.001$), mientras que en el grupo control se encontró que las CE producen 19.5 veces más TNF- α que las CNE ($p<0.001$); sin embargo al comparar la producción basal en CNE de TNF- α en ambos grupos de estudio encontramos que en pacientes con QEH la producción de TNF- α es 1.7 veces superior que en IS. En la figura 3a se observa la producción de TNF- α en ambas poblaciones de estudio, tanto en las CE, como en las CNE; en la figura 3b se observa la producción basal de TNF- α en ambos grupos de estudio. En la tabla 2 se resumen los datos de las concentraciones de TNF- α encontradas en pacientes con QEH e IS.

Tabla 2. Citocinas en sobrenadante de CMN

	Pacientes con QEH		Individuos sanos	
	CNE	CE	CNE	CE
TNF-a	285 ± 128*	3740 ± 760*	172 ± 56§	3364 ± 536§
IL-1b	53 ± 12†	107 ± 20†‡	37 ± 7	54 ± 9‡
IL-6	328 ± 55¥	481 ± 54¥	272 ± 75	505 ± 136

*p<0.001, § p<0.001, † p=0.038, ‡ p=0.029, ¥ p=0.026

En el caso de la determinación de la concentración de IL-1b encontramos que las CE de pacientes con QEH producen 2 veces más IL-1b que las CNE (p=0.038), mientras que en IS se encontró que las CE producen 1.4 veces más IL-1b que las CNE (p=0.029). Al comparar la

producción de IL-1b posterior al estímulo policlonal

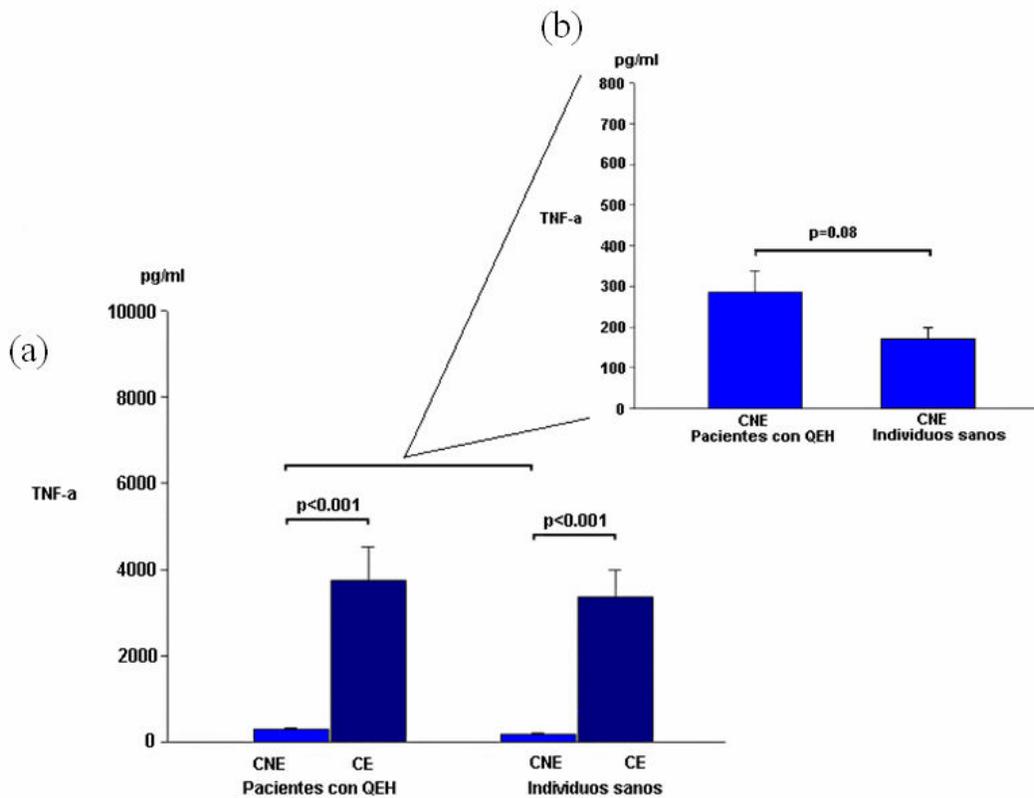


Figura 3. TNF-a en sobrenadante de células mononucleadas. Gráfica que muestra las concentraciones en pg/ml de TNF-a obtenidas en los cultivos celulares en (a) células estimuladas (CE) y en células no estimuladas (CNE) en pacientes con queratitis estromal herpética (QEH) e individuos sanos. (b) Muestra solamente la concentración basal de TNF-a en pacientes y controles sanos.

encontramos que en pacientes con QEH la producción de IL-1b es 1.9 veces superior que en IS ($p=0.029$). En la figura 4a se observa la producción de IL-1b en ambas poblaciones de estudio, tanto en las CE, como en las CNE. En el cuadro 2 se resumen los datos de las concentraciones de IL-1b encontradas en pacientes con QEH e IS.

La concentración de IL-6 también fue determinada en ambos grupos de estudio y encontramos que las CE de pacientes con QEH producen 1.2 veces más IL-6 que las CNE ($p=0.026$),

mientras que en IS se encontró que las CE producen 0.5 veces más IL-6 que sus CNE. En la figura 4b se observa la producción de IL-6 en ambas poblaciones de estudio, tanto en las CE, como en las CNE. En la tabla 2 se resumen los datos de las concentraciones de IL-6 encontradas en pacientes con QEH e IS.

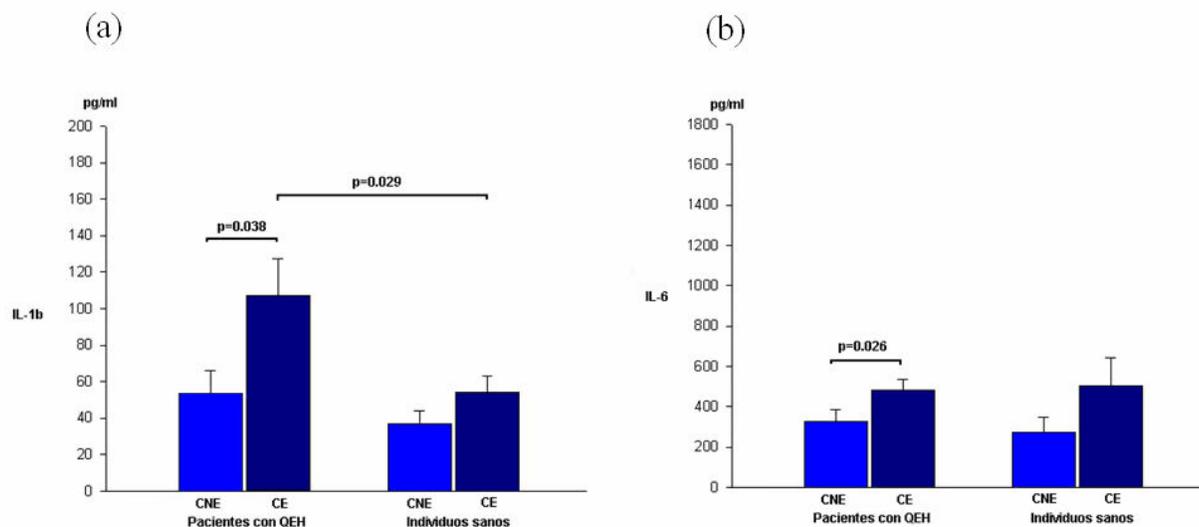


Figura 4. IL-1 e IL-6 en sobrenadante de células mononucleadas. Gráfica que muestra las concentraciones en pg/ml de (a) IL-1 e (b) IL-6 obtenidas en los cultivos celulares en células estimuladas (CE) y en células no estimuladas (CNE) en pacientes con queratitis estromal herpética (QEH) e individuos sanos.

DISCUSION

El estudio de la respuesta inmunológica en individuos con QEH inició a principios de los 80's en donde se evaluaba la activación de linfocitos T, mediante la formación de rosetas *in vitro* (6, 7) sin embargo estos ensayos se interrumpieron en virtud de que se pudieron desarrollar modelos animales de queratitis herpética (4, 8, 9) que actualmente se siguen utilizando (10) y que han brindado información suficiente para entender parte de la patogenia inmunitaria en queratitis herpética. De tal manera que es conocido que sin los linfocitos T no se desarrolla el mecanismo fisiopatológico que genera el daño corneal, a pesar de que exista replicación viral. (8, 11) La serie de acontecimientos que inducen la participación de linfocitos T en la patogénesis corneal inicia con los casos en donde aparece una infección primaria del epitelio corneal y se genera una reacción inflamatoria, caracterizada por un infiltrado de leucocitos polimorfonucleares (PMN) y macrófagos. (11, 12) Los PMN y macrófagos además de eliminar partículas virales, producen quimiocinas que atraen a linfocitos T al área afectada, en donde algunas de las células infectadas expresan moléculas de MHC con antígenos virales acoplados, los cuales son reconocidos por los linfocitos T CD8+ que llegan a la lesión. (13) Simultáneamente, los macrófagos y otras células presentadoras de Ag (CPA) como las de Langerhans, capturan a las partículas virales en la córnea y transportan antígenos virales a los ganglios linfáticos en donde se los presentan a los linfocitos T CD4+ que después migrarán en forma activada a córnea (14) gracias a los productos de los PMN y macrófagos presentes en el estroma corneal durante la infección, (12) así se retroalimenta el mecanismo de daño constantemente. En humanos existen pocos reportes en los que se demuestra la presencia de linfocitos T CD4+ en los infiltrados estromales corneales, Verjans *et al* aislaron linfocitos T CD4+ de botones corneales provenientes de sujetos con QEH y los expandieron *in vitro*, demostrando que esas células eran específicas para antígenos virales. (15) El trabajo de Verjans *et al*, es importante porque demuestra que la infiltración de linfocitos T CD4+ también

es un hecho que ocurre en humanos, sin embargo en ese estudio no se realizó la búsqueda de las características funcionales de las poblaciones infiltrantes, es decir no se determinó si tenían la capacidad de producir citocinas involucradas en la patogenia inmune corneal. En contraste, el abordaje de nuestro trabajo fue diferente, partiendo de que se conoce por modelos animales que la presentación antigénica ocurre en ganglio y de que los linfocitos T una vez activados regresan por vía sanguínea a córnea (14), se planteó la evaluación funcional de los linfocitos T CD4+ y CD8+ de sangre periférica de sujetos con QEH, los resultados de nuestro estudio revelaron que existe un predominio de células IFN-g+ y que dentro de estas, los linfocitos T CD4+IFN-g+ se encontraban incrementados en pacientes con QEH con respecto al grupo control. Este dato es interesante debido a que en el modelo animal se le ha dado más importancia al microambiente local inducido por las CPA que producen IL-12, (16) esta citocina favorece la diferenciación *in situ* de linfocitos T que han migrado a córnea de T CD4+ Th0 a T CD4+ Th1, (17) sin embargo los resultados encontrados en nuestro estudio sugieren que en humanos la diferenciación de linfocitos T CD4+ a células productoras de IFN-g es previa al proceso de migración ocular, ya que la estimulación policlonal *in vitro* a la que fueron sometidas las CMN de los pacientes con QEH únicamente evidencia las citocinas que ya estaban en proceso de producción, permitiendo exclusivamente la visualización de las mismas.(18)

Por otra parte, se sabe que la producción de citocinas proinflamatorias como TNF-a, IL-1 e IL-6 es debida a la activación de macrófagos, gracias a la señalización que reciben del IFN-g producido por los linfocitos T CD4+ Th1 (19). En modelos animales de queratitis herpética la presencia de IFN-g y TNF-a en el microambiente local favorece el daño corneal, además de que ambas citocinas actúan como factores limitantes de la infección, por ejemplo Minami *et al*, han demostrado que ratones knock out para ambas citocinas tienen reactivaciones más

frecuentes y son más severas que en los ratones control (20). En nuestro estudio encontramos que la producción de TNF-a se incrementa después del estímulo policlonal tanto en pacientes con QEH como en IS, llamando la atención que en condiciones basales, es decir, sin estímulo, existe una mayor producción de TNF-a en pacientes con QEH ($p=0.08$), lo que refleja una tendencia en el grupo individuos enfermos a producir mayor cantidad de TNF-a.

TNF-a es una citocina proinflamatoria muy importante que regula positivamente la producción de IL-1 e IL-6 en macrófagos y fibroblastos (19). En el modelo murino IL-1 e IL-6 han sido involucradas importantemente en la patogénesis de la QEH, Staats *et al* demostraron que en corneas infectadas con HSV-1 presentaban niveles importantes de IL-1 e IL-6.(21) Resulta interesante que en el presente trabajo se haya observado que las CE de los sujetos con QEH producen estadísticamente más IL-1 β e IL-6 que las CE de los IS, y que la IL-1 β se haya incrementado incluso más en las CE de los pacientes con QEH. Estos resultados obtenidos *in vitro* son muy similares a los resultados observados en modelos animales directamente en las lesiones corneales. Keadle TL *et al*, han demostrado que la IL-1 y el TNF-a son esenciales en el desarrollo de la queratitis estromal herpética murina; (22) mientras que Fenton *et al* y Biswas *et al*, demostraron en estudios independientes de queratitis murina, que la IL-6 es capaz de inducir la producción de quimiocinas en células corneales infectadas y la síntesis de VEGF local, favoreciendo el reclutamiento de PMN al estroma (23) y la vascularización corneal. (24)

En conclusión, los datos obtenidos en nuestro estudio indican que los linfocitos T estimulados *in vitro* son predominantemente IFN-g+, con incremento notable de los linfocitos T CD4+ Th1. El microambiente generado por el predominio de las células IFN-g+ durante la estimulación policlonal, podría explicar las diferencias observadas en las concentraciones de citocinas proinflamatorias de las CE entre los pacientes con QES y los IS, de las cuales la IL-1b es la

citocina proinflamatoria que más importantemente incrementa su concentración posterior al estímulo con PMA/Ionomicina; así los datos reportados en animales experimentales remarcan la relevancia de nuestras observaciones pues sugieren que en humanos puede existir un mecanismo de daño similar al descrito en los modelos murinos de queratitis herpética.

AGRADECIMIENTOS

A la M en C. Marisela Linares-Cañas y al QFB. Héctor Pérez-Cano por el apoyo técnico recibido. Este trabajo fue apoyado parcialmente por “Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana, IAP” y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) Salud 2005-14108

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Carr DJ, Harle P, Gebhardt BM. The immune response to ocular herpes simplex virus type 1 infection. *Exp Biol Med* 2001; 226(5): 353-66.
- 2.- Deshpande SP, Zheng M, Lee S, Rouse BT. Mechanisms of pathogenesis in herpetic immunoinflammatory ocular lesions. *Vet Microbiol* 2002; 86 (1-2): 17-26.
- 3.- Naito J, Mott KR, Osorio N, Jin L, Perng GC. Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP0 diffuses out of infected rabbit corneas. *J Gen Virol* 2005; 86(11): 2979-88.
- 4.- Thomas J, Gangappa S, Kanangat S, Rouse BT. On the essential involvement of neutrophils in the immunopathologic disease: herpetic stromal keratitis. *J Immunol* 1997; 158(3): 1383-91.
- 5.- Gangappa S, Deshpande SP, Rouse BT. Bystander activation of CD4+ T cells accounts for herpetic ocular lesions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41(2): 453-9
- 6.- Mal'khanov VB. "Active" rosette-forming T-lymphocytes in ocular herpes. *Vopr Virusol* 1981; 4(4): 493-5.
- 7.- Saini JS, Datta U, Pradhan D. Cell mediated immunity in herpes simplex keratitis in man. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1990; 68(5): 519-24,
- 8.- Newell CK, Sendele D, Rouse BT. Effects of CD4+ and CD8+ T-lymphocyte depletion on the induction and expression of herpes simplex stromal keratitis. *Reg Immunol* 1989; 2(6): 366-9.
- 9.- Mercadal CM, Bouley DM, DeStephano D, Rouse BT. Herpetic stromal keratitis in the reconstituted scid mouse model. *J Virol* 1993; 67(6): 3404-8.

- 10.- Biswas PS, Banerjee K, Kim B, Smith J, Rouse BT. A novel flow cytometry based assay for quantification of corneal angiogenesis in the mouse model of herpetic stromal keratitis. *Exp Eye Res* 2005; 80(1): 73-81.
- 11.- Hendricks RL, Tumpey TM. Contribution of virus and immune factors to herpes simplex virus type I-induced corneal pathology. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31(10): 1929–1939
- 12.- Meyers-Elliott RH, Chitjian PA. Immunopathogenesis of corneal inflammation in herpes simplex virus stromal keratitis: role of the polymorphonuclear leukocyte. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1981; 20(6):784-98.
- 13.- Shimeld C, Whiteland JL, Nicholls SM, Easty DL, Hill TJ. Immune cell infiltration in corneas of mice with recurrent herpes simplex virus disease. *J Gen Virol* 1996; 77(5):977–985.
- 14.- Miller JK, Laycock KA, Nash MM, Pepose JS. Corneal Langerhans cell dynamics after herpes simplex virus reactivation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34(7): 2282–2290
- 15.- Verjans GM, Remeijer L, van Binnendijk RS, Cornelissen JGC, Volker-Dieben HJ, Baarsma SG, Osterhaus ADME. Identification and characterization of herpes simple virus-specific CD4+ T cells in corneas of herpetic stromal keratitis patients. *J Infect Dis* 1998; 177(2):484–488.
- 16.-Thomas J, Kanangat S, Rouse BT. Herpes simplex virus replication-induced expression of chemokines and proinflammatory cytokines in the eye: implications in herpetic stromal keratitis. *J Interferon Cytokine Res* 1998; 18(9): 681-690,

- 17.-Watford WT, Moriguchi M, Morinobu A, O'Shea JJ. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14(5): 361-368,
- 18.- Foster B, Prussin C. Detection of Intracellular Cytokines by Flow Cytometry *Curr Prot Immunol* 2002; 6: 1-16
- 19.- Thomson A. The cytokine Handbook. Great Britain, UK: Academia Press; 1998.
- 20.- Minami M, Kita M, Yan XQ, Yamamoto T, Iida T, Sekikawa K, Iwakura Y, Imanishi J. Role of IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha in herpes simplex virus type 1 infection. *J Interferon Cytokine Res* 2002; 22(6):671-6.
- 21.- Staats HF, Lausch RN. Cytokine expression in vivo during murine herpetic stromal keratitis. Effect of protective antibody therapy. *J Immunol*. 1993; 151(1):277-83.
- 22.- Keadle TL, Usui N, Laycock KA, Miller JK, Pepose JS, Stuart PM. IL-1 and TNF-alpha are important factors in the pathogenesis of murine recurrent herpetic stromal keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000 Jan;41(1):96-102.
- 23.- Fenton RR, Molesworth-Kenyon S, Oakes JE, Lausch RN. Linkage of IL-6 with neutrophil chemoattractant expression in virus-induced ocular inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002; 43(3): 737-43.
- 24.- Biswas PS, Banerjee K, Kinchington PR, Rouse BT. Involvement of IL-6 in the paracrine production of VEGF in ocular HSV-1 infection. *Exp Eye Res* 2006; 82 (1): 46-54.