



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Comparación en la Respuesta Th1, Th2 y Th17 durante el Tratamiento de Queratitis Herpética Epitelial con Aciclovir y Ganciclovir

TESIS

Que para obtener el título de:
CIRUJANO OFTALMÓLOGO
presenta:

Dra. Liliana Gil Lozano

ASESORES:

Dra. Cristina Pacheco del Valle
Médico Cirujano Oftalmólogo, Adscrito al Departamento de Alta Especialidad
en Córnea y Cirugía Refractiva

Ciudad de México, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Agradecimientos:

A mis padres Enrique y María Teresa por ser el claro ejemplo de constancia y dedicación, por darme todas las herramientas, el apoyo incondicional y el amor para alcanzar todos mis sueños.

Por creer en mí, por impulsarme y aconsejarme.

Este, como todos mis logros, es tan suyo como mío.

A mi asesora, Dra. Cristina Pacheco por el tiempo y atención brindada para llevar cabo con éxito este proyecto.

A la Dra. Aline Somilleda quien estuvo disponible para mí en todo momento, gracias por el apoyo brindado, los conocimientos compartidos, la atención y la solución hacia el mínimo detalle; esta tesis no se hubiera logrado sin sus aportaciones.

Al Dr. Héctor Pérez Cano, a quien agradezco su paciencia, su empatía con mi persona para hacer de este proyecto algo más llevadero.

A mis amigos Miguel, Myrna, Claudio quienes me han apoyado en todos mis logros durante estos tres años, quienes hacen que los malos momentos duren menos y los buenos momentos se hagan inolvidables. Gracias por compartir conmigo una experiencia más.

Este nuevo logro es en gran parte gracias a todos ustedes; he logrado concluir con éxito un proyecto que en un principio parecía interminable.

Por último, a mí. Porque si bien no ha sido fácil, ha sido muy satisfactorio haber logrado llegar hasta este punto de mi vida profesional.

MARCO TEÓRICO	6
1.1 Introducción	6
1.2 Epidemiología	6
1.3 Características del Virus Herpes	6
1.4 Mecanismos y fases de la infección viral	7
1.5 Cuadro clínico	8
1.6 Inmunopatogenia	10
1.7 Reactivaciones y recurrencias.....	12
1.8 Diagnóstico	14
1.9 Diagnóstico diferencial	15
1.10 Tratamiento	15
PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN	17
2.1 JUSTIFICACIÓN	17
2.2 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	18
2.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
2.3 OBJETIVOS	18
2.3.1 OBJETIVO PRINCIPAL	18
2.3.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS	18
2.4 HIPÓTESIS	19
3 METODOLOGÍA.....	19
3.1 Métodos:	19
3.2 Criterios de Inclusión	19
3.3 Criterios de Exclusión.....	20
3.4 Criterios de Eliminación	20
3.5 Variables	20
3.6 Procedimientos Generales.....	20
1. Valoración oftalmológica	20
2. Obtención de muestra de lágrima	21
3. Registro de evolución clínica	22
4. Cuantificación de Citocinas.....	22
4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	22
4.2 TAMAÑO DE LA MUESTRA	23
4.3 DISEÑO DEL ESTUDIO	23
5 ASPECTOS ÉTICOS	23
6 ASPECTOS DE BIOSEGURIDAD	24
7 FINANCIAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	24
8 DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES DE LOS INVESTIGADORES	24
RESULTADOS.....	24
Características demográficas de pacientes en estudio.....	25

Tabla 2	26
Comparación de citocinas durante el tratamiento con aciclovir.....	26
GRÁFICA 1.....	27
GRÁFICA 2.....	27
GRÁFICA 3.....	28
GRÁFICA 4.....	28
GRÁFICA 5.....	29
GRÁFICA 6.....	29
Tabla 3	30
COMPORTAMIENTO CITOCINAS DURANTE EL TRATAMIENTO CON GANCICLOVIR	30
GRÁFICA 7.....	31
GRÁFICA 8.....	31
GRÁFICA 9.....	32
GRÁFICA 10.....	33
GRÁFICA 11.....	34
Tabla 4	35
COMPARACIÓN EN EL COMPORTAMIENTO DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN AMBOS TRATAMIENTOS.....	35
GRÁFICA 12.....	35
GRÁFICA 13.....	36
GRÁFICA 14.....	37
GRÁFICA 15.....	37
GRÁFICA 16.....	38
Tabla 5	39
FOTOGRAFÍAS CLÍNICAS	39
DISCUSIÓN.....	41
CONCLUSIÓN.....	45
APÉNDICE.....	47
CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	47
CONSENTIMIENTO INFORMADO	48
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

PRESENTACIÓN

Título

Comparación en la Respuesta Th1, Th2 y Th17 durante el Tratamiento de Queratitis Herpética Epitelial con Aciclovir y Ganciclovir.

Investigadores

Investigador responsable

Dra. Liliana Gil Lozano

Asesor

Dra. Cristina Pacheco del Valle

Médico Cirujano Oftalmólogo, Adscrito al Departamento de Alta Especialidad en Córnea y Cirugía Refractiva. Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz

Periodo de realización

Marzo 2019 a Diciembre de 2021

Correspondencia

Departamento de Córnea y cirugía refractiva.

Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz I.A.P.

Ezequiel Montes 135 Colonia Tabacalera, Cuauhtémoc, Ciudad de México.

MARCO TEÓRICO

1.1 Introducción

La queratitis herpética es la patología infecciosa que con más frecuencia causa ceguera corneal en los países desarrollados. La infección por el virus herpes simple 1 tiene una prevalencia mundial de más del 80%. ^[1] La incidencia anual de infecciones oculares por este virus es de 11.8 por 100,000 personas en los Estados Unidos, convirtiéndola en una de las principales enfermedades infecciosas con mayor impacto visual. ^[2,3]

1.2 Epidemiología

El virus del herpes simple (VHS) es la principal causa de ceguera infecciosa en el mundo desarrollado, con 400.000 personas infectadas ocularmente en los Estados Unidos. ^[1] Los dos serotipos de HSV son HSV-1 y HSV-2, que tienen diferentes tropismos. Ambos pueden causar una enfermedad ocular, que se ve facilitada por la capacidad del virus para propagarse en los tejidos y neuronalmente. Sin embargo, la gran mayoría de HSV ocular se ha atribuido a HSV-1. ^[4]

1.3 Características del Virus Herpes

Existen ocho virus herpes humanos conocidos: Virus herpes simple 1 y 2 (VHS-1, VHS-2), virus varicela zóster (VVZ), citomegalovirus (CMV), Virus Epstein-Barr (EBV), Virus herpes humano 6, 7 y 8 (VHH-6, VHH-7, VHH-8); siendo el Virus Herpes Simple 1 la causa más frecuente de queratitis epitelial en el 78 a 98% de los casos, abarcando así el 95% de enfermedades oculares ocasionadas por la familia herpesviridae. ^[5]

El virus herpes simple es un virus con envoltura de DNA de doble cadena con un genoma de aproximadamente 152 kb, un tegumento y una nucleocápside. Se trata de un Alphaherpesvirus junto con el HVS-2 y el virus varicela zoster (VVZ) formando parte de la familia Herpesviridae. ^[6] El VHS-1 posee 12 glicoproteínas de superficie que sirven de anclaje (gB, gC, gD, gH, gL y gG), proteínas de fusión

(gB) y proteínas de escape inmune (gC, gE, gI).^[7]

1.4 Mecanismos y fases de la infección viral

La entrada de HSV en el tejido ocular puede ocurrir con exposición exógena al virus o virus reactivado que ha viajado al sitio de infección. La exposición ocular inicial al VHS suele provocar una infección de la conjuntiva.^[8]

El mecanismo de entrada en las células oculares se basa en los receptores de glicoproteínas en la superficie celular, incluida la nectina-1, el mediador de entrada del herpesvirus (HVEM), el heparán sulfato 3-O sulfatado (3-OS HS) y el receptor pareado de tipo inmunoglobulina α (PILR- α).^[8,9]

El acceso a estos receptores de entrada puede determinar si el virus entra desde la superficie apical o basolateral de las células.^[9]

El paso inicial de la interacción del virus con la célula es la fijación al proteoglicano, heparán sulfato; molécula presente en la superficie de muchas células; al igual que sucede con muchos otros virus, el tropismo celular está determinado por la disponibilidad de los receptores adecuados en la superficie de la célula a ser infectada.^[9]

El virus se fija a la membrana celular a un pH ambiente y por tanto cabe la posibilidad de la formación de sincitios entre las células infectadas y de transmisión de célula a célula aún en la presencia de anticuerpos humorales neutralizantes. Esto significa que la inmunidad mediada por células es importante en la supresión de infecciones por herpesvirus.^[8,10]

Luego de la fijación, el virus se funde directamente con la membrana plasmática (no es necesaria la entrada a través de endosomas/lisosomas de pH bajo). Luego de que ocurre la fusión, el virus libera algunas proteínas al citoplasma; entre estas se incluyen algunas toxinas, una proteína cinasa y un iniciador de la transcripción genética.^[9, 10]

Posteriormente la nucleocápside rodeada de tegumento es transportada a la membrana nuclear a la que se une permitiendo así la entrada del ADN viral al

núcleo celular. [8]

El ADN herpético se transcribe a ARN por una enzima celular (ARN polimerasa I ADN-dependiente). No obstante, la transcripción de varios genes es dependiente tanto de factores nucleares de la célula como de proteínas codificadas por el virus. Este control del ARNm viral, y por tanto, de la síntesis de proteínas virales, determina si la infección propagará la producción de nuevas partículas víricas y de muerte celular (una infección lítica), una descamación continua del virus (infección persistente) o latencia. [9,10]

El que ocurra o no la latencia es propiedad de la célula huésped, eso es, algunas células no permiten la replicación del ADN viral; si la célula permite la progresión más allá de las etapas de los genes tempranos inmediatos, sobreviene una infección lítica. [8,9]

Las nucleocápsides son ensambladas en el núcleo y se fusionan con ADN del huésped; luego emergen a través de la doble membrana nuclear y dejan la célula mediante exocitosis. [9]

1.5 Cuadro clínico

La infección por Virus simple tipo 1 generalmente se adquiere de individuos asintomáticos y de aquellos con afección facial, oral o con manifestaciones de la mucosa genital. Con menos frecuencia, se transmite a través de trasplante de córnea. [11,12]

Después de la exposición al virus, sea por mucosa oral o epitelio corneal, el virus viaja por los axones neuronales de manera retrógrada hacia el ganglio sensorial del nervio trigémino, donde establece su latencia de por vida. [3] La reactivación del virus es dada por un episodio de inmunosupresión y posteriormente el virus migra hacia el epitelio corneal donde tiene lugar a su replicación causando queratitis herpética [13,14,15].

El HVS1 es capaz de causar un amplio espectro de enfermedades como: herpes labial, gingivostomatitis herpética, queratitis epitelial o estromal y encefalitis. [11]

Existen diferentes tipos de manifestaciones clínicas oculares por infección del VHS. Entre ellas, la queratitis epitelial con lesiones tipo dendríticas es la más frecuente (56.3%), seguida por queratitis estromal (29.5%), úlceras geográficas (9.8%) y endotelitis (3.4%)^[15, 16].

La enfermedad herpética ocular secundaria a virus del herpes simple puede iniciar como blefaritis, queratitis epitelial corneal o conjuntivitis. La enfermedad herpética ocular recurrente se manifiesta como una queratitis ulcerosa y/o estromal. Las infecciones recurrentes oculares representan la mayor parte de la morbilidad visual debido a la irreversible cicatrización, adelgazamiento, neovascularización corneal y eventual ceguera.^[11]

La primo infección por VHS-1 generalmente es asintomática^[12]. Se presenta en el 6% de los casos como blefaroconjuntivitis que se resuelve sin dejar cicatrización^[13]. El epitelio corneal es un sitio frecuente de infección primaria. La queratitis epitelial se presenta como un cuadro de dolor ocular, fotofobia, visión borrosa, lagrimeo y ojo rojo. Las úlceras son causadas por replicación del virus y destrucción de células epiteliales. Comienzan como lesiones puntiformes vesiculares en el epitelio corneal que rápidamente coalescen en forma de erosiones y finalmente forman úlceras dendríticas de bordes inflamados y bulbos terminales. Éstas pueden formar úlceras geográficas^[15, 17].

La infección por HVS-1 puede generar una respuesta inflamatoria crónica, presentando un cuadro de queratitis herpética estromal^[14]. La queratitis estromal presenta opacidad estromal, edema corneal y neovascularización. La respuesta inmunológica determina el crecimiento de vasos sanguíneos, infiltrado leucocitario y opacidad corneal por daño estromal^[15]. En ocasiones se puede visualizar el anillo de Wessely, que indica depósitos del complejo antígeno-anticuerpos y complemento en el estroma^[18].

La mayoría de las infecciones son unilaterales, cerca del 1.3 – 12% se presenta de manera bilateral y es atribuido a pacientes inmunocomprometidos o con atopia^[19].

1.6 Inmunopatogenia

La patogénesis y severidad del cuadro clínico depende de la interacción entre el virus y la respuesta inmunológica del huésped. [7].

Histológicamente, se ha encontrado infiltración de células polimorfonucleares a las 6 horas postinfección [20].

Se han hecho múltiples estudios, principalmente en modelos murinos para conocer acerca de la inmunopatogénesis de la infección corneal por VHS. Principalmente se describe una respuesta tipo Th1 en queratitis estromales de modelos murinos. Las citocinas producidas por células Th1 tienen características proinflamatorias. El interferón gamma (IFN- γ) interleucina 6 (IL-6) e interleucina 2 (IL-2) predominan en fases tempranas de queratitis estromal. [13,21].

La ausencia de IL-6 en ratones KO (knock out por sus siglas en inglés) se relaciona con menor opacidad corneal comparado con ratones WT (wild type por sus siglas en inglés) [22]. Mientras tanto, el aumento de la expresión de las células T CD4+ aumenta la gravedad de lesión corneal [23,24].

Ya se han descrito múltiples interleucinas en la inmunopatogénesis de ojos con queratitis herpética estromal como son: IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, TGF- β , TNF- α , IFN- γ , MIP-2 y sintasa de óxido nítrico tipo II (NOS-II). [14].

Cavalieria et al reportan la presencia de IL-15, IL-18 y NOS-II en el ojo contralateral de ratones que presentan queratitis estromal herpética. La expresión de estas citocinas en el ojo contralateral probablemente se debe a un mecanismo de defensa para proteger el ojo no infectado de la propagación viral [5,7,14].

Las células Th1 y Th17 producen citocinas proinflamatorias que incrementan la infiltración de leucocitos dentro de la córnea. La IL-17, secretada por células Th17 contribuye en la respuesta inflamatoria en fases tardías [6]. La IL-17 aumenta la secreción de TNF- α e IFN- γ por los macrófagos. Además se han encontrado receptores de IL-17 (IL-17R) en fibroblastos corneales de humanos [25].

Las células Th17 promueven la inflamación crónica y autoinmunidad. En ratones tratados con anti-IL17 se muestra una disminución de la severidad en la lesión corneal por queratitis herpética estromal ^[26]. Se ha visto un incremento bifásico en la producción de IL-17 presentando un pico en fases tempranas seguido de otro pico que corresponde a la fase crónica de la queratitis herpética estromal ^[27].

Inoue et al demuestran en córneas de modelos murinos infectadas por VHS-1 que el IFN- γ se detecta en el epitelio corneal y estromal al día 3 postinfección y persiste hasta el día 12. La IL-1 e IL-6 se detectan en el estroma infectado desde el inicio y persiste hasta los 12 días. La IL-2 se presenta desde el día 2 hasta el día 12. No se muestra IL-4 presente y la IL-10 se mantuvo negativa hasta el día 12 postinfección, en donde presenta un pico positivo débil ^[28].

Las citocinas producidas por células Th2 como IL-4 e IL-10 no se detectan al inicio de la infección por VHS, sin embargo aparecen en fases tardías cuando la inflamación resuelve, lo que podría indicar un importante papel de estas células en la supresión de inflamación intracorneal ^[29]. La interleucina 10 y 12 (IL-10, IL-12) podrían suprimir las lesiones por queratitis estromal en modelos murinos probablemente por la inducción de producción de IFN- γ que ayuda a la eliminación del virus, y además por inducción de apoptosis de células T ^[7].

En ratones KO para IL-10M y ratones WT a quienes se les dio antiIL-10 presentaron un incremento de la opacidad corneal, por lo que se asume que la interleucina 10 (IL-10) tiene una importante función anti inflamatoria ^[30].

Otra molécula implicada es la quimiocina-10 (CXCL10) que atrae células T y células NK. Se demostró en el estudio de Shen et al que la ausencia de CXCL10 produce queratitis herpética estromal grave, con intensa inflamación, neovascularización y opacidad corneal. La quimosina CXCL10 disminuye la severidad de la queratitis herpética estromal en el ratón ^[1]. CXCL10 también actúa como un angiostático, inhibiendo la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular tipo A (VEGF-A) ^[6].

Otras células que regulan la respuesta inmunológica son las Células T reguladoras (Tregs). La depleción de células T reguladoras (Tregs) CD4+CD25+FOXP3+ incrementa la infiltración de células CD4+ en la córnea, desarrollando más severidad en la queratitis herpética estromal. En contraste, un aumento temprano en la frecuencia de células Tregs se relaciona con una reducción en la severidad de la queratitis herpética estromal. [24]

1.7 Reactivaciones y recurrencias

Los virus herpes simple son neurotrópicos y pueden permanecer de manera latente en células neuronales de los ganglios trigémino (infección oro-facial) y sacro (infección genital) [31,32]

El estado de latencia viral se caracteriza por una represión importante de la transcripción de genes virales, salvo para un gen particular el que está asociado a la latencia viral y se ha denominado LAT (latency associated transcript). [33]

Este transcrito viral no-codificante (no codifica proteínas), es procesado en ARN pequeños (micro-ARNs, miARNs) que regulan negativamente la expresión de genes virales inmediatamente tempranos (α) esenciales para el desencadenamiento de la transcripción y traducción de genes tempranos (β) y tardíos). [33]

A través de este mecanismo relativamente simple, el virus es capaz de reprimir la expresión de un sinnúmero de genes virales involucrados en la replicación del genoma y síntesis de elementos estructurales del virión. [32]

Este estado silente, caracterizado por una expresión prácticamente nula de proteínas virales, evita que antígenos del microorganismo sean presentadas o reconocidas por el sistema inmune del hospedero. Con ello, el virus impide el desarrollo de una respuesta anti-viral contra neuronas infectadas. [33]

Por otro lado, aparte de la acción de LAT se ha propuesto que mecanismos epigenéticos podrían regular y modular los estadios líticos y latentes del virus en células infectadas. ^[32,33]

Si bien no se conocen los eventos moleculares íntimos que conducen a la reactivación del virus en neuronas, algunos desencadenantes de la activación viral han sido identificados. Algunos de estos factores modulan negativamente la expresión de LAT y por consiguiente promueven la transcripción y traducción de genes virales tempranos y tardíos que conducen a la reactivación del virus y síntesis de viriones. ^[33,34]

Se ha descubierto que varios de estos estímulos activadores están relacionados con injuria celular. Por ejemplo, condiciones de hipoxia celular e inducción de apoptosis disminuyen significativamente los niveles de expresión de LAT de VHS-1 en neuronas, aumentando significativamente la expresión de genes virales que promueven la síntesis de viriones. ^[34, 35]

Una vez iniciada la expresión de genes virales tempranos y tardíos en neuronas, se formará la cápside viral que migra de forma anterógrada desde el soma celular hasta el terminal nervioso, por el axón, hasta el lugar donde ocurrió la infección inicial. La liberación de partículas en este sitio promoverá la infección de nuevas células epiteliales con la subsiguiente diseminación del virus en el tejido circundante, promoviendo la generación de nuevos focos de infección e ingreso del virus a nuevos terminales nerviosos, repitiendo así el ciclo infectante y el establecimiento continuo de latencia en el hospedero. ^[36]

La tasa de recurrencia es del 9,6% durante el primer año, 22,9% a los dos años y llegando al 63,2% a los 20 años. La probabilidad de recidiva en el siguiente año aumenta con el número de episodios padecidos por el paciente. La infección bilateral es rara, aunque algunos estudios la sitúan entre el 1 y el 10%, siendo con mucho más frecuente en pacientes con atopia. ^[37]

1.8 Diagnóstico

El diagnóstico de las infecciones por virus del herpes conllevan gran sospecha clínica por las lesiones características, sin embargo este medio diagnóstico a menudo no es confirmatorio. ^[38]

Se ha observado que en muchas ocasiones la enfermedad ocular herpética puede compartir datos clínicos similares a los de otras enfermedades oculares de causa infecciosa y la clínica resulta ser insuficiente para la confirmación del diagnóstico o conocer el estado de replicación viral. ^[39]

Esta confusión en el diagnóstico clínico nos lleva a la búsqueda de herramientas alternativas. Existen distintos métodos de diagnóstico de laboratorio disponibles para el diagnóstico, diferenciación y subtipificación de infecciones por virus del herpes, los cuales han sido implementados en las últimas dos décadas entre los que destacan pruebas como ensayos de inmunofluorescencia (IFA), aislamiento del virus mediante cultivos de tejidos y ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). ^[38]

El cultivo de virus se considera el estándar de oro para la identificación de HSV, por contar con el cien por ciento de sensibilidad; sin embargo presenta ciertas dificultades sobretodo relacionadas con la viabilidad, conservación y tiempo de obtención de resultado a partir de la toma de muestra. ^[40]

Por otra parte, existen nuevas herramientas de biología molecular que han demostrado ser más sensibles, rápidas, específicas y baratas en comparación con el cultivo celular. No requieren de células intactas o partículas virales viables para su detección como es el caso del inmunoensayo enzimático ó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por raspado corneal o por muestra de lágrima, lo que las hace ideales para ser empleadas en la práctica clínica (41)

1.9 Diagnóstico diferencial

La queratopatía dendritiforme es una condición de la superficie corneal caracterizada por un patrón curvilíneo o arborescente que puede simular una queratitis epitelial por VHS así como otras causas. ^[39]

Los cambios epiteliales ramificados se pueden asociar con varios trastornos de la superficie ocular; por ejemplo, una pseudodendrita puede estar formado por epitelio regenerador o hipertrófico. Los depósitos intraepiteliales y los cambios inducidos por fármacos pueden también adquirir esta forma; incluso infecciones micóticas, virales y amébicas de pueden simular infecciones herpéticas. ^[11]

1.10 Tratamiento

El tratamiento de la queratitis epitelial por HSV tiene como objetivo detener la infección viral activa de la córnea de forma rápida y segura, controlando así los síntomas y permitiendo que se restablezca una superficie ocular normal. ^[42]

El tratamiento se basa en fármacos antivirales. Los compuestos antivirales surgieron como tratamientos potenciales para la queratitis herpética durante la última mitad del siglo. En 1962 la idoxuridina, un análogo de pirimidina, fue el primer antiherpético eficaz. ^[42]

En la década siguiente, un análogo de purina, vidarabina, ingresó en la práctica oftálmica. Idoxuridina y vidarabina fueron entonces progresivamente reemplazado por otros análogos de nucleósidos: trifluridina, aciclovir y ganciclovir. ^[42]

El aciclovir es un análogo nucleósido de purina que es fosforilado por la timidina cinasa del VHS y VVZ. Inhibe la replicación viral, actuando como un sustrato de la DNA polimerasa, previniendo la elongación del DNA viral. ^[43]

El ganciclovir, es un análogo de guanosina con espectro contra VHS-1, VHS-2, VVZ, EBV, CMV y adenovirus. Interrumpe la replicación viral ^[43]. El ganciclovir es convertido en el metabolito activo ganciclovir trifosfato por la enzima timidina cinasa, que se encuentra dentro de las células infectadas por HSV. Inhibe la síntesis de DNA viral de dos maneras: 1) compite con la deoxiguanosina trifosfato para unirse a la DNA-polimerasa viral, 2) se une directamente a las cadenas de DNA del virus induciendo rupturas en las cadenas de DNA ^[44].

Tanto el aciclovir como el ganciclovir tópico han demostrado tener adecuada penetración en las capas de la córnea ^[45]. La dosis recomendada de aciclovir al 3% y ganciclovir gel oftálmico al 0.15% es 5 veces al día (cada 4.5 horas durante el día) hasta la resolución de la úlcera y continuar por 7 días más. ^[46]

El aciclovir tiene una baja solubilidad en soluciones acuosas por lo que las preparaciones oftálmicas necesariamente se fabrican en forma de ungüento utilizando el petrolato como vehículo un antiviral altamente selectivo para ser activado solamente por la timidin-cinasa viral, lo cual le confiere una selectividad alta para las células infectadas, sin embargo el vehículo utilizado resulta en visión borrosa al aplicarlo sobre la superficie ocular. ^[30,47]

Algunas ventajas del ganciclovir tópico son: 1) adecuada tolerancia (no visión borrosa, escozor o ardor), 2) tiempo de contacto corneal prolongado; justificado porque el vehículo del ganciclovir es carbómero, lo cual le confiere propiedades de gel incrementando la biodisponibilidad del fármaco; asimismo el carbómero al ser un polímero hidrófilo de elevado peso molecular funciona como lubricante y humectante ocular, lo cual facilita la recuperación del epitelio corneal., 3) antiviral de gran espectro, 4) selectivo para células infectadas, 5) adecuada penetración hacia humor acuoso, 6) misma efectividad que aciclovir pero en menor concentración y 7) sin efectos adversos secundarios. ^[30, 47,48]

El aciclovir tópico ha sido definido como el tratamiento de elección en queratitis

herpética, asimismo, el ganciclovir tópico ha demostrado ser igual de efectivo que el aciclovir tópico.^[45]

La elección del antiviral ideal depende de su efectividad contra el virus, los efectos tóxicos y la comodidad de uso para el paciente.^[47]

Sin tratamiento, la queratitis epitelial dendrítica tiende a ser autolimitada, la curación suele tardar dos semanas. Un tratamiento inadecuado puede empeorar la inflamación de la córnea y contribuir a la pérdida visual. Cualquier tratamiento que acelera la curación de la lesión puede reducir la aparición de complicaciones asociadas.^[47]

Pocos estudios determinan la respuesta inmunológica en queratitis herpética epitelial por el VHS, por lo que el presente estudio estudia el patrón de expresión de la respuesta Th1, Th2 y Th17 en queratitis herpética epitelial en humanos mediante la obtención de muestra de lágrima durante el tratamiento con aciclovir y ganciclovir administrados de forma tópica. Determinar la respuesta con estas interleucinas podría ser útil para conocer los cambios inmunológicos y clínicos durante el tratamiento.

PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

2.1 JUSTIFICACIÓN

Este estudio busca definir y correlacionar el comportamiento de las citocinas en la infección por Virus del Herpes simple con la evolución clínica durante el tratamiento con diferentes antivirales tópicos; aciclovir y ganciclovir.

Pretendiendo convertirse en un estudio que abra las puertas a futuras investigaciones que puedan contribuir a modificar favorablemente el curso de la enfermedad, busquen mejorar el pronóstico visual y a largo plazo de los pacientes con esta afección ocular.

2.2 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe diferencia en la expresión de citocinas del perfil Th1, Th2 y Th17 y la evolución clínica de pacientes con queratitis epitelial herpética durante el tratamiento con aciclovir o ganciclovir tópico?

2.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La infección ocular por Virus del Herpes tiene alta prevalencia a nivel mundial. Es una causa importante de ceguera, impactando negativamente en la calidad de vida de los pacientes.

La evolución clínica es variable; siendo la queratitis epitelial una de las manifestaciones principales. La interacción inmunológica del huésped con el virus determina la gravedad del cuadro clínico.

Existen múltiples estudios que hablan sobre la respuesta inmunológica generada ante esta infección, sin embargo no existen estudios que evidencien el comportamiento de las citocinas y la correlación clínica en respuesta al tratamiento con distintos antivirales tópicos en queratitis herpética epitelial.

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

- Determinar el perfil Th1, Th2 y Th17 de pacientes con queratitis herpética epitelial durante el tratamiento con aciclovir y ganciclovir tópico

2.3.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Evaluar las concentraciones en lágrima de IL-17, TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 antes y durante el tratamiento con aciclovir o ganciclovir en pacientes con queratitis herpética epitelial a los días 0, 5, 7 y 14.
- Determinar el pico más alto y más bajo de expresión las interleucinas IL-17, TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 durante el tratamiento con aciclovir o ganciclovir en pacientes con queratitis herpética epitelial

- Correlacionar el tiempo de curación de úlcera epitelial con las concentraciones de interleucinas de respuesta Th1 y Th17 así como respuesta Th2.
- Comparar las concentraciones de interleucinas obtenidas con el tratamiento de aciclovir frente al tratamiento con ganciclovir.
- Describir la evolución clínica de la lesión herpética y correlacionar con el comportamiento molecular durante los días de seguimiento

2.4 HIPÓTESIS

La respuesta Th1 se encontrará elevada antes de iniciar tratamiento con aciclovir o ganciclovir y disminuirá paulatinamente al terminar el tratamiento.

La respuesta Th2 se encontrará disminuida o ausente en fases tempranas del tratamiento e incrementará posterior al tratamiento con aciclovir o ganciclovir.

La respuesta Th17 tendrá su mayor pico al inicio de la enfermedad y disminuirá con el tratamiento.

Las concentraciones de interleucinas serán similares durante el tratamiento con aciclovir frente al tratamiento con ganciclovir.

3 METODOLOGÍA

3.1 Métodos:

Se seleccionaron pacientes mayores de 18 años con diagnóstico reciente de queratitis herpética epitelial sin tratamiento previo tópico o sistémico.

Se consideraron los siguientes criterios:

3.2 Criterios de Inclusión

1. Pacientes con diagnóstico de queratitis herpética epitelial con lesiones dendríticas, geográficas o marginales, primer cuadro y recidivantes.
2. Sin tratamiento tópico y oral previo.
3. Pacientes mayores de 18 años.

4. Firma de consentimiento informado.

3.3 Criterios de Exclusión

1. Pacientes con coexistencia de otra enfermedad oftalmológica inflamatoria.
2. Pacientes que hayan recibido tratamiento con corticosteroides o inmunomoduladores previamente.
3. Pacientes con tratamiento tópico u oral previo.
4. Retiro del Consentimiento Informado.

3.4 Criterios de Eliminación

1. Falta de apego o abandono del tratamiento.
2. Abandono del estudio por decisión del paciente.
3. Aparición de cuadro de queratitis intersticial, endotelitis o uveítis durante el estudio.
4. Muestra biológica insuficiente en alguna de las tomas de muestra.

3.5 Variables

Variable	Descripción	Especificaciones
Edad	Independiente, cuantitativa, discreta	18 a 90 años
Diagnóstico	Independiente, cualitativa, nominal	Queratitis herpética epitelial dendrítica, geográfica o marginal
Tratamiento	Dependiente, cualitativa, nominal	Antiviral tópico.
Interleucinas	Independiente, cuantitativa, continua	Concentración en Picogramos

3.6 Procedimientos Generales

1. Valoración oftalmológica.

- a. Se llevó a cabo una exploración física oftalmológica completa en donde se consideró la medición de agudeza visual y capacidad

visual, valoración de párpados y anexos oculares, superficie ocular, segmento anterior y posterior del ojo. Se evitó la tinción con fluoresceína y aplicación de anestésico tópico previo a la toma de muestra de lágrima. El paciente se presentó en el departamento de córnea y cirugía refractiva para confirmar diagnóstico.

- b. La clasificación de queratitis herpética epitelial se llevó a cabo de la siguiente manera:
 - i. Úlcera dendrítica: Afección del epitelio corneal en donde son visibles algunas lesiones puntiformes y vesiculadas que coalescen en placas creando una úlcera lineal y ramificada o en forma de dendrita, con bordes edematosos elevados y bulbos terminales.
 - ii. Úlcera geográfica: Afección del epitelio corneal en donde las lesiones dendríticas coalescen, convirtiéndose en una úlcera no lineal, que puede o no tener ramificaciones evidentes y con bordes elevados.
 - iii. Úlcera marginal: Afección del epitelio cerca del limbo que se acompaña de vasos sanguíneos con infiltrado estromal debajo de la úlcera y con inyección ciliar sectorial adyacente a la úlcera.
- c. Para el tratamiento de queratitis herpética epitelial se separaron los pacientes en dos grupos y se inició tratamiento con aciclovir ungüento al 30mg/g (Grupo A) o ganciclovir gel 1.5mg/g (Grupo G) vía de administración tópica oftálmica. Para ambos medicamentos se colocó 1cm de ungüento en fondo de saco inferior cada 4 horas y 30 minutos (5 veces al día) durante 15 días.

2. Obtención de muestra de lágrima.

- a. Con un tubo capilar estéril de 8 cm de largo por 2 mm de diámetro, se instilaron 20-50µL de solución salina en la superficie ocular, inmediatamente después la muestra se recuperó con el capilar del

fondo de saco conjuntival, posteriormente la muestra se colocó en un tubo Eppendorf de 0.6ml nuevo y estéril y se congeló a -80°C hasta su procesamiento.

- b. La obtención de muestra de lágrima se realizó en el día 0 (antes de iniciar el tratamiento tópico oftálmico) y a los días 5, 7 y 14.
- c. Se evitó utilizar anestésico tópico y tinciones antes de realizar la toma de muestra.

3. Registro de evolución clínica

- a. Registro de hallazgos clínicos y medición de lesión con lámpara de hendidura en mm en ojo afectado en días 0,5,7 y 14
- b. Seguimiento fotográfico por medio de cámara para lámpara de hendidura Topcon DC-4 de lesiones herpéticas en día 0,5,7 y 14

4. Cuantificación de Citocinas.

- a. Se utilizó un kit *BD cytometric bead array (CBA) Th1/ Th2/Th17 cytokine kit* para procesar las muestras de lágrima según las instrucciones del fabricante; en el *Citómetro de Flujo BD FACSCanto II* y se utilizó el software *FACS DIVA* para el análisis de los resultados.

4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

- a. Se realizó estadística descriptiva para el análisis demográfico, presentando los resultados en rangos, porcentajes y frecuencias. Las características a evaluar fueron: sexo, edad, comorbilidades sistémicas y/o oculares, presentación del cuadro, lateralidad, tipo de úlcera (dendrítica, geográfica o marginal), tiempo de cierre y presencia de secuelas.
- b. El análisis estadístico se llevó a cabo por medio de pruebas paramétricas, prueba t de Student para la comparación entre grupos y la prueba t de student para muestras pareadas para analizar las diferencias respecto a los distintos días de tratamiento y seguimiento en el grupo A o B respectivamente; así como el test de

Wilcoxon para comparar el cambio en la mediana de diámetro horizontal y vertical de las lesiones herpéticas entre ambos grupos durante el seguimiento.

4.2 TAMAÑO DE LA MUESTRA

El tamaño de la muestra se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$N = \text{tamaño de la población} = \frac{N \sigma^2 Z_{\alpha}^2}{e^2 (N-1) + \sigma^2 Z_{\alpha}^2}$$

En donde:

n = el tamaño de la muestra.

N = tamaño de la población.

σ = Desviación estándar de la población, que generalmente cuando no se tiene su valor, suele utilizarse un valor constante de 0,5.

Z_{α} = Valor obtenido mediante niveles de confianza. Se calculó en relación al 99% de confianza equivale 2,58.

e = Límite aceptable de error muestral que, generalmente cuando no se tiene su valor, suele utilizarse un valor que varía entre el 1% (0,01) y 9% (0,09), valor que queda a criterio del encuestador.

El tamaño de la población en nuestra institución es de $N=32$. De acuerdo a la fórmula descrita, el cálculo de muestra es $n=31$ con un nivel de confianza de 99%

4.3 DISEÑO DEL ESTUDIO

Ensayo clínico controlado sorteado (longitudinal, prospectivo, observacional y comparativo)

5 ASPECTOS ÉTICOS

Todos los pacientes que decidieron participar en el estudio, se les proporcionó un consentimiento informado, los cuales firmaron para poder ser parte del mismo. Este protocolo se basa en la Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012, que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos, los principios éticos de la Declaración de Helsinki y declaraciones de la International Conference of Harmonization.

6 ASPECTOS DE BIOSEGURIDAD

La Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente, define como residuos peligrosos a todos aquellos residuos que, por sus características corrosivas, reactivas, explosivas, tóxicas, inflamables y biológico-infecciosas representan un peligro para el equilibrio ecológico o el ambiente; los residuos que se deriven serán manejados en términos de la propia ley, su reglamento y normas oficiales mexicanas que expida la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, previa opinión de diversas dependencias que tengan alguna injerencia en la materia correspondiéndole a la citada SEMARNAT su regulación y control.

Los residuos peligrosos biológico-infecciosos (RPBI) fueron manejados de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-0870ECOL-SSA1-2002.

7 FINANCIAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

El Financiamiento fue otorgado por la Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz I.A.P.

8 DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES DE LOS INVESTIGADORES.

Los investigadores declaran que no tienen algún conflicto de intereses.

RESULTADOS

Se analizaron 16 pacientes; 11 correspondientes al primer grupo A tratados con

aciclovir y 5 pacientes en el segundo grupo B bajo tratamiento con ganciclovir.

Respecto a las características demográficas de la población estudiada se obtuvieron los siguientes resultados:

Se consideraron 12 hombres (75%) y 4 mujeres (25%), con una edad promedio de 53.75 años (26-91 años) para los hombres y 35 años (29, 30, 38, 43) para las mujeres. De los 16 pacientes incluidos en el estudio 12 eran pacientes sanos y 4 contaban con alguna enfermedad; 1 paciente masculino con retraso psicomotor, 1 masculino con Diabetes Mellitus, 1 paciente masculino con Hipertensión arterial sistémica y 1 paciente femenino con trasplante renal secundario a hipoplasia renal.

El 18.75% de los pacientes contaban con antecedentes oftalmológicos de importancia; 1 caso con endotelitis herpética, 1 paciente con antecedente de conjuntivitis folicular por adenovirus y 1 paciente con queratitis neurotrófica.

Respecto a la lateralidad 56% presentaron afección del ojo derecho, mientras que el 44% restante afección del ojo izquierdo.

El 68% de los pacientes se diagnosticaron como cuadro primario de queratitis herpética dendritiforme unilateral mientras que 37.5% se diagnosticaron como cuadro recidivante. (Tabla 1)

Tabla 1
Características demográficas de pacientes en estudio

SEXO	EDAD	TX	LAT	APP	AOFT	CUADRO	CIERRE	SECUELAS
F	38	A	OS	-	Conjuntivitis folicular	1º	5 días	Leucoma
M	71	A	OD	DM	-	1º	7 días	
M	63	A	OD	-	Endotelitis	4º	18 días	Leucoma
M	73	A	OD	-	-	1º	7 días	
M	36	A	OD	-	-	1º	5 días	Leucoma
M	26	A	OS	-	-	1º	5 días	Leucoma
F	30	A	OD	-	-	2º	14 días	Leucoma
M	55	A	OS	-	-	1º	5 días	
M	52	A	OS	-	-	1º	21 días	Leucoma
M	47	A	OS	PC	-	1º	18 días	
M	34	A	OD	-	-	1º	5 días	
M	26	G	OD	-	-	1º	5 días	
F	29	G	OD	TR	-	3º	18 días	Leucoma
F	43	G	OS	-	-	3º	21 días	Leucoma
M	71	G	OS	HAS	-	2º	21 días	

M	91	G	OD	-	Queratitis neurotrófica	2°	21 días	
---	----	---	----	---	----------------------------	----	---------	--

*TX: tratamiento, A: aciclovir, G: ganciclovir, LAT: lateralidad, OD: ojo derecho, OS; ojo izquierdo, APP: antecedentes personales patológicos, AOFT: antecedentes oftalmológicos

*DM: Diabetes Mellitus, PC: Parálisis cerebral, TR: Trasplante renal, HAS; Hipertensión arterial sistémica

Se realizó un análisis del comportamiento molecular y el comportamiento clínico durante todos los días de tratamiento.

Los resultados nos permitieron conocer el comportamiento de las distintas interleucinas IL-6, IL-17, TNF- α , IFN, IL2, IL4, IL10 según los días de seguimiento; permitiendo la comparación de los valores respecto a los distintos días en cada grupo de tratamiento por medio de la utilización de prueba t de Student para muestras pareadas así como la comparación del comportamiento de la respuesta inflamatoria entre ambos grupos con la prueba t de Student para muestras independientes.

Se realizó una comparación en los pacientes tratados con aciclovir de la media de concentración en picogramos/ml de cada citocina entre los días 0 y 5, 5 y 7, 7 y 14 y 14 con la toma basal, por medio de la prueba t de Student para muestras pareadas se obtuvo el valor de p mostrando no significancia estadística en ninguna citocina exceptuando la IL-2 ($p=0.0366$) que mostró una disminución sustancial en el día 14 respecto al día 7. Aunque se consideró la determinación de IL-4 en nuestro estudio no se detectó su presencia la muestra de lágrima de ningún paciente. (Tabla 2)

Tabla 2
Comparación de citocinas durante el tratamiento con aciclovir

DIAS GRUPO A	0 vs 5	5 vs 7	7 vs 14	0 vs 14
IL6	0.9748	0.293	0.5487	0.1158
IL17	0.3409	0.3409	0.7103	0.3409
TNF	0.5182	0.7514	0.1294	0.2883
IFN	0.1352	0.9283	0.0557	0.4501
IL2	0.6958	0.8509	0.0366	0.2279
IL4	SD	SD	SD	SD
IL10	0.9464	0.6731	0.2323	0.1392

*Prueba t de Student para muestras pareadas

Por medio de la prueba t de Student para muestras pareadas se obtuvo el valor de p mostrando no significancia estadística en la mayoría de las citocinas de los pacientes tratados con ganciclovir; esto se obtuvo al comparar la media de concentración en picogramos/ml de cada una de las moléculas inflamatorias consideradas entre los distintos días. Asimismo, al igual que el grupo anterior, no se detectó IL-4 en la lágrima de los pacientes considerados, sumado a esto IL-17 tampoco fue detectada en los pacientes de este grupo. (Tabla 3)

Tabla 3

COMPORTAMIENTO CITOCINAS DURANTE EL TRATAMIENTO CON GANCICLOVIR

DIAS GRUPO B	0 vs 5	5 vs 7	7 vs 14	0 vs 14
IL6	SD	0.3739	0.5646	0.3739
IL17	SD	SD	SD	SD
TNF	0.51	0.5881	0.3813	0.4223
IFN	0.8668	0.7777	0.625	0.4604
IL2	0.4447	0.4474	0.6428	0.5206
IL4	SD	SD	SD	SD
IL10	0.0591*	0.8825	0.1459	0.3491

*Prueba T de student para muestras pareadas

SD: sin datos

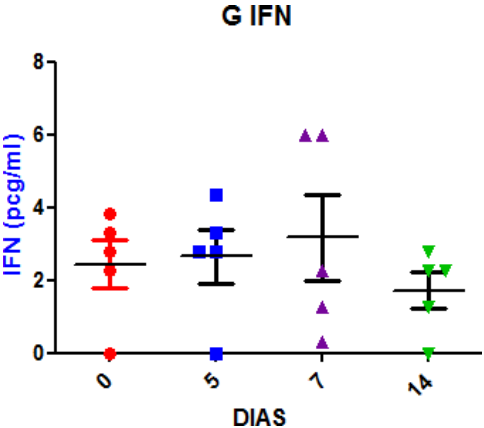
Se muestra el valor de p obtenido en el análisis

*Con tendencia a la significancia estadística

En la gráfica 7 se muestra el proceder de la IL-6 en los distintos días considerados, la diferencia no fue significativa (Kruskal Wallis $p=0.5487$).

La gráfica 9 muestra como se comportó el IFN- γ en los días de seguimiento bajo tratamiento con ganciclovir, no hubo diferencia significativa (Kruskal Wallis $p=0.8915$) en las concentraciones.

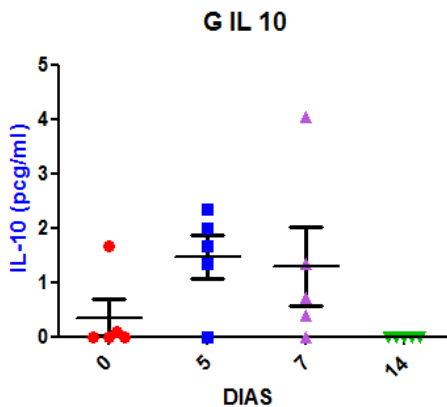
GRÁFICA 9
COMPORTAMIENTO DE IFN- γ DURANTE EL TRATAMIENTO CON GANCICLOVIR



En la gráfica 10 se muestra el comportamiento de IL-10 durante el tratamiento con ganciclovir, la diferencia no fue significativa (Kruskal Wallis $p=0.0884$).

GRÁFICA 10

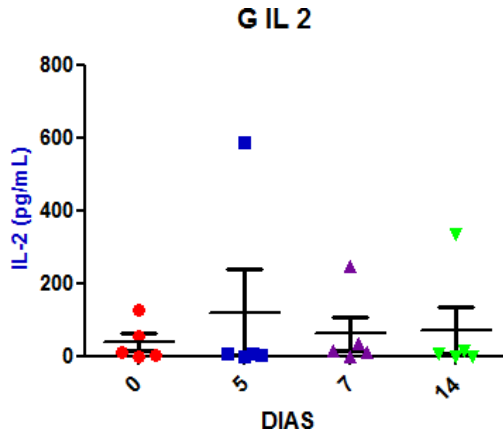
COMPORTAMIENTO DE IL-10 DURANTE EL TRATAMIENTO CON GANCICLOVIR



En la gráfica 11 se muestra el proceder de la IL-2 en los distintos días considerados, la diferencia no fue significativa (Kruskal Wallis $p=0.8761$) sin embargo vale la pena resaltar que sus valores permanecieron similares al paso de los días en cada uno de los pacientes de este grupo.

GRÁFICA 11

COMPORTAMIENTO DE IL-2 DURANTE EL TRATAMIENTO CON GANCICLOVIR



Se compararon ambos grupos de Tratamiento por medio de la prueba t de Student para muestras independientes obteniendo el valor de p , no hubo diferencia significativa en el comportamiento de las citocinas entre Grupo de aciclovir comparado con el grupo de ganciclovir durante el seguimiento. (Tabla 4)

Tabla 4

COMPARACIÓN EN EL COMPORTAMIENTO DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN AMBOS TRATAMIENTOS

GRUPO A vs GRUPO B	DIA 0	DIA 5	DIA 7	DIA 14
IL6	SD	SD	0.5719	0.6614
IL17	SD	SD	SD	SD
TNF	0.4707	0.5551	0.9929	0.3921
IFN	0.9845	0.3867	0.1608	0.1915
IL2	0.3745	0.1935	0.1966	0.1709
IL4	SD	SD	SD	SD
IL10	0.1166	0.9538	0.7102	E

*Prueba T de student para muestras independientes

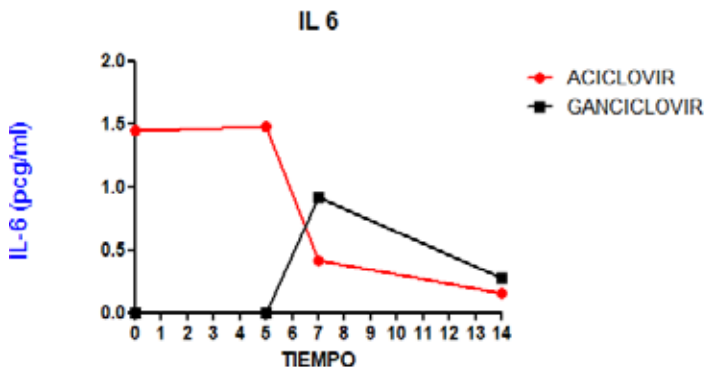
SD: sin datos

Se muestra el valor de p obtenido en el análisis

La gráfica 12 representa la comparación de los promedios de IL-6 entre los grupos de tratamiento mostrando que las concentraciones basales fueron más altas en el grupo de aciclovir empatándose en el séptimo día con posterior decremento de ambos grupos.

GRÁFICA 12

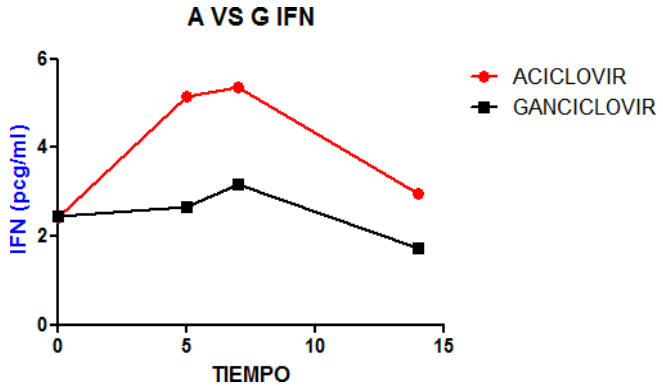
COMPARACIÓN DE LOS PROMEDIOS DE IL-6 EN AMBOS GRUPOS DE TRATAMIENTO



En la gráfica 13 se determina que los niveles de IFN γ mostraron el mismo patrón de comportamiento durante los días de seguimiento sin embargo el grupo de aciclovir siempre mantuvo concentraciones mayores que el grupo contrario.

GRÁFICA 13

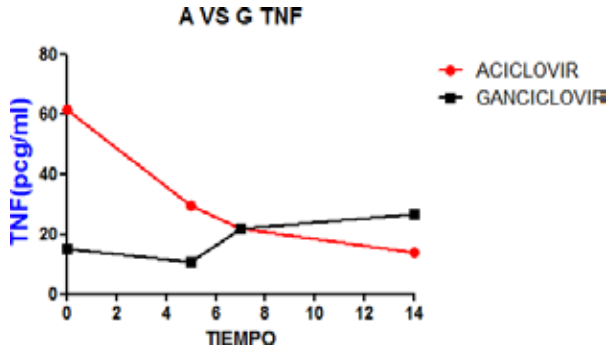
COMPARACIÓN DE LOS PROMEDIOS DE IFN- γ EN AMBOS GRUPOS DE TRATAMIENTO



La gráfica 14 representa el comportamiento TNF- α en ambos grupos; TNF- α presenta mayores concentraciones iniciales en pacientes tratados con aciclovir, en cambio el grupo de ganciclovir al día 7 muestra apenas un incremento a partir del día 7 coincidiendo con el momento en el que las concentraciones de aciclovir comienzan a disminuir.

GRÁFICA 14

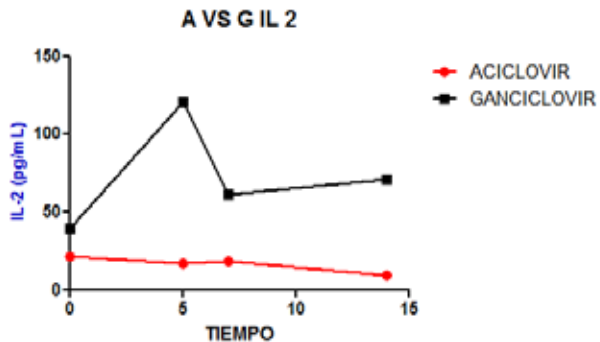
COMPARACIÓN DE LOS PROMEDIOS DE TNF- α EN AMBOS GRUPOS DE TRATAMIENTO



En la gráfica 15 se evidencia que las concentraciones de IL-2 en el grupo A fueron exponencialmente mayores en el grupo de ganciclovir durante los días de seguimiento comparado con el grupo tratado con aciclovir el cual mantuvo sus niveles estables durante todo el seguimiento.

GRÁFICA 15

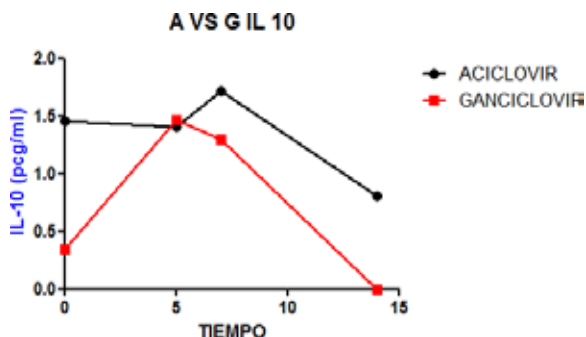
COMPARACIÓN DE LOS PROMEDIOS DE IL-2 EN AMBOS GRUPOS DE TRATAMIENTO



La gráfica 16 representa a la IL-10 en ambos grupos; mostrando que los niveles de IL-10 fueron mayores en el grupo sometido a tratamiento con aciclovir respecto al grupo B.

GRÁFICA 16

COMPARACIÓN DE LOS PROMEDIOS DE IL-10 EN AMBOS GRUPOS DE TRATAMIENTO



Respecto al seguimiento clínico se determinó que el tiempo promedio de curación de la lesión dendritiforme fue de 5 días para el 37.5% de la población estudiada (83.3% correspondieron a grupo A: Aciclovir y 16.7% a grupo B:Ganciclovir), 7 días para el 12.5% de la población total (100% de estos pertenecientes al grupo A), 14 días en el 6.25% (1 paciente tratado con Aciclovir) y más de 14 días el 43.75% del total (42.85% de estos tratados con Aciclovir y 57.14% tratados con Ganciclovir)

La comparación de los diámetros de la dendrita del día 5 con respecto al día 0 mostró una diferencia estadística ($p= 0.059$ y $p=0.0039$) en el diámetro horizontal y vertical en los pacientes tratados con Aciclovir ; asimismo se resalta la reducción significativa ($p=0.038$) en el diámetro vertical en estos pacientes comparando medición basal con el último día de seguimiento; esto es coherente con los hallazgos clínicos evidenciados en las siguientes fotografías (Fotografía 1 y 2)

durante todo el seguimiento siendo compatible entonces con los datos numéricos representados. (Tabla 5)

Tabla 5

Evolución y comparación clínica del tamaño de las lesiones en grupo de Aciclovir y Ganciclovir

DIAS	0 vs 5	5 vs 7	7 vs 14	0 vs 14
DHA	0.0059	0.0156	0.5	0.035
DHG	0.2693	0.25	1	0.125
DVA	0.0039	0.0469	1	0.0038
DVG	0.1679	0.1738	0.5	0.0579

* Test de Wilcoxon

DHA: Diámetro horizontal aciclovir

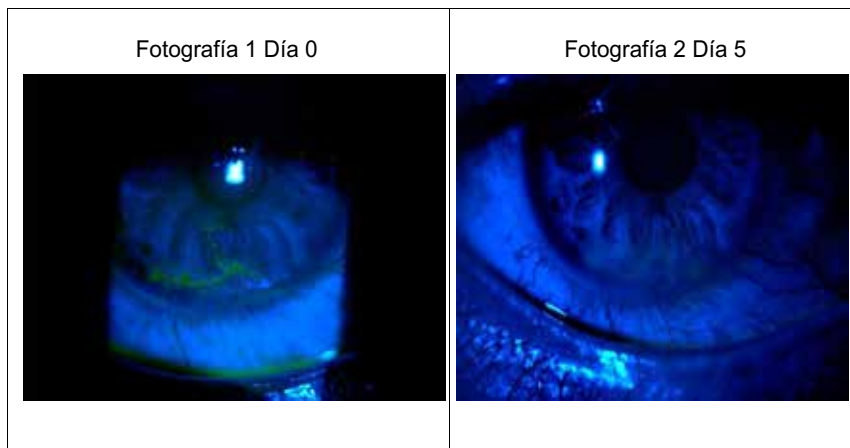
DHG: Diámetro horizontal ganciclovir

DVA: Diámetro vertical aciclovir

DHA: Diámetro horizontal Aciclovir

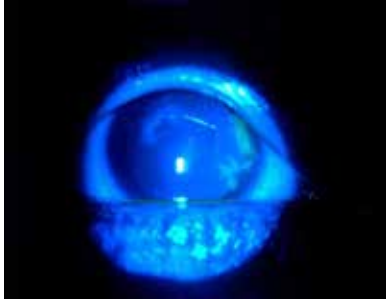
3 FOTOGRAFÍAS CLÍNICAS

Ejemplo de paciente tratado con aciclovir con ausencia de defecto epitelial al quinto día de revisión; único hallazgo clínico como secuela: leucoma en zona de dendrita previa.

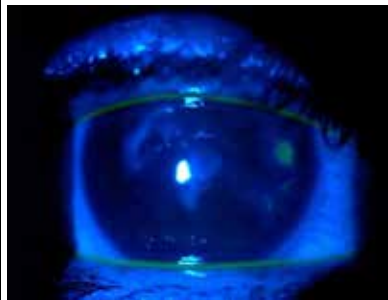


Ejemplo de paciente tratado con Ganciclovir con persistencia de úlcera dendritiforme en día 14 de tratamiento; cierre total al día 21 de seguimiento.

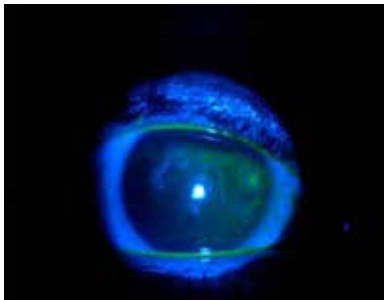
Fotografía 3 Día 0



Fotografía 4 Día 5



Fotografía 5 Día 7



Fotografía 6 Día 14



DISCUSIÓN

En nuestro estudio, de las citocinas estudiadas, IL-2, IL-4, IL-17, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α ; encontramos que el comportamiento molecular conforme los días de seguimiento no mostró diferencia significativa entre el grupo de aciclovir comparado con el de ganciclovir, exceptuando la IL-2 la cual mostró reducción de niveles entre el día 7 y 14 en el grupo A; no encontramos estudios en la literatura mundial que establezcan esta comparación molecular entre antivirales tópicos.

La forma en la que procedieron cada una de las moléculas inflamatorias en los pacientes incluidos fue parcialmente compatible con lo mencionado en la literatura por Inoue en un estudio realizado en modelos murinos donde establece que la respuesta Th1 tiene una actividad predominantemente proinflamatoria con la secreción de TNF- α , IL-6, IL-2 e IFN- γ en fases tempranas; esto coincide con nuestro estudio ya que observamos mayores concentraciones de IFN- γ entre el día 0 y el día 5 con posterior reducción en la segunda mitad del tratamiento en ambos grupos. ^[28]

Asimismo la IL-2 mostró concentraciones mayores en el día 5 con posterior disminución paulatina en los siguientes días en el grupo tratado con ganciclovir; mientras que en el grupo A se observaron concentraciones mayores desde la toma basal con posterior reducción conforme los días de seguimiento mostrando una reducción significativa entre el día 7 y el 14.

En cuanto al TNF- α las concentraciones basales fueron mayores en el grupo tratado con aciclovir con posterior decremento a partir del día 5 a 7 contrastando con el punto en el punto exacto en el que los pacientes bajo régimen terapéutico con ganciclovir comenzaron a subir niveles permaneciendo estables hasta el día 14.

Respecto a la IL-6 el grupo A presentó valores iniciales más altos con posterior descenso como lo descrito en la literatura; mientras que el grupo B presentó concentraciones altas a partir del séptimo día siendo contrario a lo determinado en otros estudios. ^[28]

Recordemos que la IL-10 que forma parte de la respuesta de tipo Th2, es una citocina de acción antiinflamatoria como lo describen Keadle y cols. quienes destacan la presencia de esta interleucina a partir del día 12 tratando de contrarrestar la inflamación aguda inducida durante los primeros días. Sin embargo, en nuestro estudio la IL-10 se presentó desde el día 0 con un pico de concentración en el día 5 para ambos grupos con posterior descenso hacia fases tardías.

Estudios resaltan el papel que tiene la interleucina 4 en el proceso corneal de origen herpético, como citocina producida por los linfocitos Th2 destacando el papel proinflamatorio que ésta tiene en fases tardías; en nuestro estudio no se detectaron valores positivos de la misma por lo que en este punto nuestro estudio demuestra una total controversia con lo reportado en la literatura. ^[5]

En cuanto a la respuesta de tipo Th17, a pesar de que diversos estudios como el realizado por Suryawanshi y cols, indican presencia de IL-17 en infecciones herpéticas, en nuestros pacientes solamente se detectaron niveles de IL-17 en dos mediciones correspondientes a distintos días de un solo paciente, por lo que estos valores no nos permiten inferir supuestos respecto a esta molécula ni realizar comparaciones. ^[27]

Respecto a las características demográficas de los pacientes incluidos destaca el predominio del sexo masculino sobre el sexo femenino hallazgo que coincide con lo señalado por Montero et al donde señalan una frecuencia mayor del sexo masculino en las afecciones oculares herpéticas. ^[50]

Se encontró que el promedio global de edad de nuestros pacientes fue de 49.06 años; resultado que no coincide con lo establecido con Darougar et al quienes determinaron que la edad promedio para el primer episodio es de 37.4 años sin importar género. ^[51]

Lee White y cols. establecen que la susceptibilidad del huésped a las infecciones oculares por HSV depende de su estado general del sistema inmunológico; sin embargo en nuestro estudio podemos observar el predominio de la población

sana (12 pacientes) comparada con aquella que presentaba comorbilidades sistémicas (4 pacientes).^[52]

En este mismo sentido, Nijm (2019) aclara que los factores de riesgo para el desarrollo de VHS primario implican el contacto directo con lesiones infectadas, pero también pueden resultar como exposición a la diseminación viral asintomática. Además, agregó que los factores de riesgo que priorizan la reactivación de la enfermedad serían: la exposición a la luz solar, trauma, calor, menstruación, estrés, enfermedades infecciosas e inmunocompromiso.^[53]

Si bien es cierto que existen múltiples factores de riesgo tanto sistémicos, ambientales y oftalmológicos descritos en la literatura relacionados con esta patología, nuestro estudio no nos permitió esclarecer esta teoría puesto que el porcentaje de pacientes con antecedentes sistémicos y oculares fue muy bajo.

El 68% de los pacientes se diagnosticaron como cuadro primario de queratitis herpética dendritiforme unilateral mientras que 37.5% se diagnosticaron como cuadro recidivante; siendo exponencialmente menor este porcentaje comparado con lo encontrado por Curbelo Alonso y cols. donde mencionan que la frecuencia de recidiva encontrada en herpes ocular es de 84.4%.^[54]

Liesegang, Thomas J. M.D. menciona que existen factores de riesgo oculares asociados con un aumento en el número de recidivas de queratitis herpética epitelial como lo son cuadros previos de queratitis herpética, sexo masculino, edad, corticoesteroides tópicos y cirugía ocular los cuales en su mayoría difieren de los que presentaban nuestros pacientes.^[55]

Barrantes y cols. determinaron que existe una recuperación espontánea en los pacientes con queratitis herpética epitelial en un periodo de 2 a 3 semanas, sin embargo cuando se adiciona tratamiento con antivirales este periodo se acorta y se busca disminuir la sintomatología, la pérdida visual y la tasa de recurrencia.^[11] En nuestro estudio en relación con lo anterior, todos los pacientes recibieron tratamiento con antivirales tópicos observando así que 6 pacientes presentaron cierre del defecto epitelial al día 5, 2 pacientes al día 7, 1 paciente al día 14 y 7 pacientes

tardaron más de 14 días.

En el grupo de Aciclovir se observó un cierre más temprano en 7 de los 11 pacientes tratados con Aciclovir, 4 presentaron un cierre tardío más allá de los 14 días; sólo 2 de ellos presentaban factor de riesgo ocular o sistémico así como recidiva del cuadro, por lo que no se estableció ninguna asociación entre el tiempo de curación y factores oculares o sistémicos en este grupo de pacientes.

A pesar de que el grupo tratado con ganciclovir era el grupo más pequeño y tenía el riesgo de haberse comportado de manera más dispersa; 3 de 5 de sus pacientes presentaban antecedentes oculares, 4 pacientes del grupo presentó recidivas y esta misma proporción presentó un cierre tardío con defecto epitelial más allá de los 14 días de tratamiento, por lo que podríamos considerar como causa directa de cierre tardío, la recidiva del cuadro; sin embargo con base a lo anterior, comparando ambos grupos y resaltando que no contamos con un número proporcional de pacientes no podemos establecer determinaciones concluyentes ni asociar factores sistémicos ni oculares que incrementen el riesgo de recidiva o cierre epitelial tardío en pacientes con esta afección ocular. Lo anterior es comparable con lo descrito por Wilhelmus KR. quien realiza un estudio comparativo entre gel de ganciclovir al 0.15% y la pomada de aciclovir al 3% mostrando resultados similares en cuanto a eficacia terapéutica, tiempo de cierre y tasas de curación.^[56]

En cuanto al tamaño de la dendrita se obtuvo una diferencia significativa en la reducción del tamaño entre ambos grupos, mostrando que tanto el diámetro vertical como el horizontal se redujo en mayor medida en el grupo sometido a tratamiento con aciclovir. Autores como Ariana Austin, MS et al en un estudio publicado llamado "Update on the Management of Infectious Keratitis" concluye que "Ganciclovir tiene misma eficacia que aciclovir con menor toxicidad ocular"

esto comparado con lo obtenido y mencionado previamente durante nuestro estudio podría ser refutado puesto que observamos un retraso en el cierre y menor disminución de tamaño de la lesión herpética en pacientes tratados con ganciclovir tópico comparado con el grupo de aciclovir. ^[57]

CONCLUSIÓN

No existe diferencia en el comportamiento molecular conforme los días de seguimiento entre el grupo de aciclovir comparado con el de ganciclovir.

De todas las interleucinas analizadas; no se detectó presencia de IL-17 ni de IL-4. No hubo diferencia en el proceder de IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ ; sin embargo IL-2 presentó una reducción de sus niveles estadísticamente significativa en el grupo tratado con aciclovir.

En cuanto al comportamiento clínico el grupo tratado con aciclovir mostró una reducción del tamaño de la lesión de manera más importante y un cierre más temprano del defecto epitelial conforme los días de evolución comparado con el grupo de ganciclovir.

Como principal fortaleza de nuestro estudio destaca la aleatorización en grupos de tratamiento de los pacientes estudiados; sin embargo, la debilidad secundaria fue la obtención de grupos no homogéneos lo cual incrementa la posibilidad de sesgos en la interpretación de los resultados.

Como limitantes del estudio, el principal es la pérdida de seguimiento de los sujetos, que puede deberse predominantemente a la cantidad de pacientes foráneos que se consideraron así como la falta de asistencia a las citas subsecuentes por mejoría del cuadro clínico o por falta de recursos.

Como debilidad del estudio contamos con una población heterógena entre pacientes sanos y aquellos con enfermedades oculares y sistémicas asociadas, las cuales despiertan una reacción inflamatoria que bien podría modificar la concentración de citocinas cuantificadas en lagrime, por lo que valdría la pena

considerar este determinante para incluir como grupo control a pacientes sanos sin este tipo de antecedentes.

Debido a las observaciones que se hicieron durante este estudio sería importante considerar que los efectos secundarios locales asociados a la aplicación tópica de los antivirales, pueden ser determinantes en el mal apego y aplicación del tratamiento por intolerancia del paciente modificando así los resultados obtenidos; por lo que lo ideal sería realizar una vigilancia estrecha y controlada de la aplicación, pudiendo obtener resultados más confiables disminuyendo el sesgo secundario.

Este estudio abre las puertas a una segunda fase de investigación para indagar sobre los factores asociados al virus que predisponen a cuadros clínicos de mayor severidad, factores del huésped y del agente relacionados a la respuesta inmune variable así como tolerancia y apego a los distintos medicamentos

Cabe destacar que no encontramos estudios que analicen el comportamiento y la respuesta inmunológica así como la correlación clínica en pacientes con esta patología ocular; que es muy frecuente y su cronicidad, así como la presencia de complicaciones agregadas, implican gran impacto en la salud visual de quien lo padece.

APÉNDICE

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Mes	Actividades
Marzo – Abril 2019	<ol style="list-style-type: none">1. Diseño de protocolo de investigación.2. Consultar bibliografía disponible en bases de datos.3. Realizar marco teórico.4. Determinar materiales y métodos.5. Establecer los objetivos.6. Correcciones de metodología.
Mayo – Agosto 2019	<ol style="list-style-type: none">1. Toma de muestras2. Realizar base de datos de pacientes
Septiembre – Octubre 2019	<ol style="list-style-type: none">1. Análisis de resultados y redacción.2. Discusión de resultados.3. Conclusiones parciales.4. Correcciones.
Noviembre 2019	<ol style="list-style-type: none">1. Presentar protocolo en Jornadas Académicas
Diciembre 2019 – Diciembre 2020	<ol style="list-style-type: none">1. Completar muestra2. Envío de trabajo para publicación

9. CONSENTIMIENTO INFORMADO



CARTA DE CONSENTIMIENTO BAJO INFORMACIÓN PARA PARTICIPAR EN PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

En esta institución se desarrollan investigaciones que forman parte de nuestro quehacer científico. Las características de su padecimiento son consideradas de interés para participar en este estudio de acuerdo a las especificaciones siguientes:

Datos generales

<i>Datos del paciente</i>	Nombre:	
	Fecha de nacimiento:	
<i>Expediente clínico No.</i>		
<i>Médico informante (investigador principal):</i>	Dra. Liliana Gil Lozano	Firma:
<i>Diagnóstico</i>	Queratitis herpética epitelial	

Datos de la investigación

<i>Nombre del protocolo</i>	Respuesta Th1, Th2 y Th17 durante el tratamiento de queratitis herpética epitelial con Aciclovir y Ganciclovir
<i>Investigadores</i>	Dra. Liliana Gil Lozano/ Dr. Samuel Josué Avalos Lara/Dra. Cristina Pacheco Del Valle/Dra. Atzin Robles Contreras
<i>Justificación y objetivos</i>	Correlacionar el comportamiento de las citocinas en la infección por Virus del Herpes simple con la evolución clínica durante el tratamiento con diferentes antivirales tópicos; Aciclovir y Ganciclovir
<i>Período de estudio o duración</i>	1 de Marzo del 2019 al 29 de Febrero del 2020
<i>Cantidad de sujetos que participarán</i>	30
<i>Descripción de los métodos a emplear y su propósito</i>	Obtención de muestra de lágrima ,cuantificación de citocinas por medio de citometría de flujo , análisis del comportamiento de las citocinas y su correlación clínica en pacientes tratados con Aciclovir o Ganciclovir.
<i>Beneficios esperados:</i>	Conocer la inmunopatogenia en la infección ocular herpética
<i>Alternativas:</i>	Ninguna
<i>Riesgos o molestias:</i>	Las relacionadas con la aplicación de medicamento tópico ; irritación ocular, ojo rojo , ardor
<i>Grupo de control</i>	En caso de que la presente investigación incluya un grupo de control, la selección de los participantes se sujetará a un proceso estrictamente aleatorio e imparcial, privilegiando la prevención de cualquier riesgo o daño para sus integrantes.

**CARTA DE CONSENTIMIENTO BAJO
 INFORMACIÓN PARA PARTICIPAR EN
 PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN**

Confidencialidad	Su identidad y la información que proporcione como parte de esta investigación serán tratadas bajo criterios de confidencialidad. En caso de que los resultados exijan su identificación, previamente se le solicitará la autorización correspondiente.
Dudas, aclaraciones y actualización	<p>El participante tendrá derecho a recibir respuesta a cualquier pregunta y aclaración a cualquier duda acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación y su tratamiento.</p> <p>Asimismo, durante el presente estudio le proporcionaremos información actualizada sobre su estado de salud para que esté en posibilidad de decidir si continúa participando.</p> <p>Es importante que sepa que retirar su participación no afectará su atención en el hospital.</p>

Consentimiento

Por este medio manifiesto mi satisfacción con la información recibida y, consiento de las especificaciones y en qué consiste la investigación descrita en este documento, sus beneficios, riesgos y consecuencias, **otorgo mi consentimiento para incorporarme a ella, asumiendo el compromiso de [1] asistir puntualmente a las citas que se me indiquen y [2] proporcionar verazmente la información de mi evolución en la forma y periodicidad que se requiera.**

Asimismo, entiendo que puedo retirarme de esta investigación voluntariamente en cualquier momento sin mayor requisito que la manifestación al investigador principal o a la Dirección Médica de este hospital.

Ciudad de México a ___ de _____ de ____.

Firma del paciente

Testigos

Nombre y firma

Domicilio:

Relación con el paciente:

Nombre y firma

Domicilio:

Relación con el paciente:

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Shen F. et al. Absence of CXCL10 Aggravates Herpes Stromal Keratitis with Reduced Primary Neutrophil Influx in Mice. *Journal of Virology* p. 8502–8510
- [2] Young RC, Hodge DO, Liesegang TJ, Baratz KH. Incidence, recurrence, and outcomes of herpes simplex virus eye disease in Olmsted County, Minnesota, 1976–2007: the effect of oral antiviral prophylaxis. *Arch Ophthalmol.* 2010;128: 1178–1183.
- [3] Langston P. *Herpes Simplex of the Ocular Anterior Segment.* Ra Swartzed Malden, MA: Blackwell Science, Inc., 2000; 684-692.
- [4] Liesegang TJ, Melton LJ, Daly PJ, et al. Epidemiology of ocular herpes simplex: incidence in Rochester, Minn, 1950 through 1982. *Arch. Ophthalmol.* 1989; 107:1155–1159.
- [5] Rolinski J and Hus I. Immunological Aspects of Acute and Recurrent Herpes Simplex Keratitis. *Journal of Immunology Research* 2014; 105-112.
- [6] Park PK, Chang M, Garg N, Zhu J, Chang JH and Shukla D. Corneal Lymphangiogenesis in Herpetic Stromal Keratitis. *Surv Ophthalmol.* 2015; 60(1): 60–71.
- [7] Kaye S and Choudhary A. Herpes simplex keratitis. *Progress in Retinal and Eye Research* 25 (2006) 355–380.
- [8] Tiwari V, Shukla SY, Yue BY, et al. Herpes simplex virus type 2 entry into cultured human corneal fibroblasts is mediated by herpesvirus entry mediator. *J. Gen. Virol.* 2007;88:2106–2110. [PubMed]
- [9] Galen B, Cheshenko N, Tuyama A, Ramratnam B, Herold BC. Access to nectin favors herpes simplex virus infection at the apical surface of polarized human epithelial cells. *J. Virol.* 2006; 80(24):12209–12218.
- [10] Al-Dujaili LJ, Clerkin PP, Clement C, McFerrin HE, Bhattacharjee PS, Varnell ED, Kaufman HE, Hill JM. Ocular herpes simplex virus: how are latency, reactivation, recurrent disease and therapy interrelated? *Future Microbiol.* 2011Aug;6(8):877-90
- [11] Barrantes R, Ugalde O, Zuñiga D. Queratitis por herpes simple. *Revista médica de Costa Rica y Centroamérica.* LXX (606) 365-369, 2013
- 12 Umene K and Sakaoko H. Evolution of herpes simplex virus type 1 under herpesvirus evolutionary processes. *Arch. Virol.* 1999; 144:637–656.
- [13] West DM, Chelsea R. Del Rosso, Yin XT and Stuart PM. CXCL1, but not IL-6 is required for recurrent herpetic stromal Keratitis. *J Immunol.* 2014 February 15; 192(4): 1762–1767
- [14] Cavalieria H, Gamba G, Courregesb MC, Massouha EJ and Benencia F. Expression of IL-15, IL-18 and NOS-II in contralateral eyes of BALB/c mice during the development of HSV-induced keratitis. *Immunology Letters* 2005(96);295–298.
- [15] A Rowe, A. St Leger, S. Jeon, D.K. Dhaliwal, J.E. Knickelbein and R.L. Hendricks. *Herpes Keratitis.* *Prog Retin Eye Res* 2013; 32C: 88–101.
- [16] Uchio E, Hatano H, Mitsui K, Sugita M, Okada K, Goto K, Kagiya M, Enomoto Y and Ohno S. A retrospective study of herpes simplex keratitis over the last 30 years. *Jpn J Ophthalmol.* 1994;38(2):196-201.
- [17] Farooq AV, Shukla D. Herpes simplex epithelial and stromal keratitis: an epidemiologic update. *Surv Ophthalmol.* 2012 Sep;57(5):448-62
- [18] Hill GM, Ku ES and Dwarakanathan S. Herpes simplex keratitis. *Disease-a-Month* 60 (2014) 239–246.

- [19] Thomas J. Liesegang. *Herpes Simplex Virus Epidemiology and Ocular Importance*. *Cornea*, Vol. 20, No. 1, 2001;202-205
- [20] Deshpande S, Banerjee K, Partha Sarathi Biswas and Barry T. Rouse. *Herpetic eye disease: immunopathogenesis and therapeutic measures*. *Expert reviews in molecular medicine*. 2004 (6) 8; 30.
- [21] Xia L, Zhang S, Zhou J and Li Y. *A crucial role for B and T lymphocyte attenuator in preventing the development of CD4+ T cell-mediated herpetic stromal keratitis*. *Molecular Vision* 2010; 16:2071-2083
- [22] Fenton R, 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; 43:737-743
- [23] Suvas S, Kim B and Rouse BT. *Homeostatic expansion of CD4+ T cells upregulates VLA-4 and exacerbates HSV induced corneal immunopathology*. *Microbes Infect.* 2008 ; 10(10-11): 1192-1200.
- [24] Gaddipati S, Estrada K, Rao P, Jerome AD and Suvas S. *IL-2/anti-IL-2 antibody complex treatment inhibits the development but not the progression of herpetic stromal keratitis*. *J Immunol.* 2015 January 1; 194(1): 273-282.
- [25] Maertzdorf J et al. *IL-17 Expression in Human Herpetic Stromal Keratitis: Modulatory Effects on Chemokine Production by Corneal Fibroblasts*. *J Immunol* 2002; 169:5897-5903;
- [26] Xia L et al. *Interleukin-17 enhanced immunoinflammatory lesions in a mouse model of recurrent herpetic keratitis*. *Microbes and Infection* 15 (2013) 126-139.
- [27] Suryawanshi A et al. *Role of IL-17 and Th17 Cells in HSV Induced Corneal Immunopathology*. *J Immunol.* 2011 August 15; 187(4): 1919-1930.
- [28] Inoue T et al. *Immunohistological study of infiltrated cells and cytokines in murine herpetic keratitis*. *Acta Ophthalmol. Scand.* 2001; 79: 484-487
- [29] Inoue Y. *Immunological Aspects of Herpetic Stromal Keratitis*. *Seminars in Ophthalmology*, 23:221-227, 2008.
- [30] Keadle TL and Stuart PM. *Interleukin-10 (IL-10) ameliorates corneal disease in a mouse model of recurrent herpetic keratitis*. *Microbial Pathogenesis* 38 (2005) 13-21.
- [31] Obara Y, Furuta Y, Takasu T, Suzuki S, Suzuki H, Matsukawa S, et al. *Distribution of herpes simplex virus types 1 and 2 genomes in human spinal ganglia studied by PCR and in situ hybridization*. *J Med Virol* 1997; 52: 136-42.
- [32] Pevenstein S R, Williams R K, McChesney D, Mont E K, Smialek J E, Straus S E. *Quantitation of latent varicella-zoster virus and herpes simplex virus genomes in human trigeminal ganglia*. *J Virol* 1999; 73: 10514-8.
- [33] Umbach J L, Kramer M F, Jurak I, Karmowski H W, Coen D M, Cullen B R. *MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs*. *Nature* 2008; 454: 780-3
- [34] Du T, Zhou G, Roizman B. *Induction of apoptosis accelerates reactivation of latent HSV1 in ganglionic organ cultures and replication in cell cultures*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 14616-21.
- [35] Kobayashi M, Wilson A C, Chao M V, Mohr I. *Control of viral latency in neurons by axonal mTOR signaling and the 4E-BP translation repressor*. *Genes Dev* 2012; 26: 1527-32.
- [36] Schiffer J T, Corey L. *Rapid host immune response and viral dynamics in herpes simplex virus-2 infection*. *Nat Med* 2013; 19: 280-90.
- [37] Farooq V, Shukla D. *Herpes Simplex Epithelial and Stromal Keratitis: An Epidemiologic Update*. *Surv Ophthalmol.* 2012 Sep;57(5):448-62.

- [38] Satpathy G, Behera H et al. A 20-year experience of ocular herpes virus detection using immunofluorescence and polymerase chain reaction. *Clin Exp Optom* 2018 Sep;101(5):648-651
- [39] Cohen PR, Tests for detecting herpes simplex virus and varicella-zoster virus infections. *Dermatol Clin*, 1994 Jan;12(1):51-68.
- [40] Tayaba N Azher, Xiao-Tang Yin, Deena Tajfirouz, Andrew JW Huang, Patrick M Stuart. Herpes simplex keratitis: challenges in diagnosis and clinical management *Clinical Ophthalmology* 2017;11 185–191
- [41] Navarro Palazuelos A, Suárez Sánchez R, et. al Técnicas de biología molecular para detección del Herpes Simplex virus-1 en pacientes con queratitis herpética. *Rev Mex Oftalmol*; Septiembre-Octubre 2006; 80(5):230-233
- [42] Wilhelmus KR, Antiviral treatment and other therapeutic interventions for herpes simplex virus epithelial keratitis. *Clin Exp Optom Cochrane Database Syst Rev*.2015 Jan 9;1
- [43] Tsatsos M, MacGregor C, Athanasiadis I, Moschos MM, Hossain P, Anderson D. Herpes simplex virus keratitis: an update of the pathogenesis and current treatment with oral and topical antiviral agents. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, 2016
- [44] Kaufman HE, Haw WH. Ganciclovir ophthalmic gel 0.15%: safety and efficacy of a new treatment for herpes simplex keratitis. *Curr Eye Res*. 2012 37(7):654-60
- [45] Chou TY, Hong BY. Ganciclovir ophthalmic gel 0.15% for the treatment of acute herpetic keratitis: background, effectiveness, tolerability, safety, and future applications. *Ther Clin Risk Manag*. 2014 20;10: 665-81.
- [46] Jamie D. Croxtall. Ganciclovir Ophthalmic Gel 0.15% In Acute Herpetic Keratitis (Dendritic Ulcers) *Drugs* 2011; 71 (5): 603-610.
- [47] Eficacia del ganciclovir tópico como alternativa terapéutica de la queratitis epitelial herpética. *Rev Mex Oftalmol*;2014
- [48] Khalid T, Noorjehan AB. Topical ganciclovir in the treatment of acute herpetic keratitis. *Clin Ophthalmol*. 2010 19;4:905-12
- [49] Irrragorri CA.et al. Clinical and epidemiological characterization of patients with eye infections caused by herpesvirus. *MEDISAN* 2020; 24(1):42
- [50] Montero Iruzubieta J, García Roldán A, Rodríguez Rodríguez J. Afectación de la córnea y la superficie ocular por el virus del herpes simple. *Superf Ocul Córnea*. 2017;8: 4-15.
- [51] Darougar, S., Wishart, M.S., Viswalingam, N.D., 1985. Epidemiological and clinical features of primary herpes simplex virus ocular infection. *Br. J. Ophthalmol*. 69;25-29
- [52] Michelle Lee White, MD, MPH and James Chodosh, MD, MPH. Herpes Simplex Virus Keratitis: A Treatment Guideline – 2014. *AAO. JUN* 2014
- [53] Nijm. Herpes Simplex Epithelial Keratitis. *AAO Basic and Clinical Science Course, External Disease and Cornea*, 2005-2006, 134-145.
- [54] Marlene Curbelo Alonso et al. Caracterización clínico-epidemiológica de pacientes con herpes simple en Cienfuegos. *Medisur vol.10 no.4 Cienfuegos ago*. 2012
- [55] Liesegang T J. Herpes simplex virus epidemiology and ocular importance. *Am J Ophthalmol. Cornea* 2001 Jan;20(1):1-13.
- [56] Wilhelmus KR. Antiviral treatment and other therapeutic interventions for herpes simplex virus epithelial keratitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2015;9.

[57]Austin A. *Update on the Management of Infectious Keratitis. Ophthalmology* 2017 Nov;124(11):1678-1689