



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

Bernardo Menelau Cavalcanti

Alterações imune e de fibras nervosas da córnea em HZO

RECIFE/PE
2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

Bernardo Menelau Cavalcanti

Alterações imune e de fibras nervosas da córnea em HZO

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Cirurgia.

Orientador Interno

Dr. Carlos Teixeira Brandt

Prof. Titular do Depto. de Cirurgia, CCS-UFPE

Orientador Externo

Dr. Pedram Hamrah

Prof. Associado do Depto. de Córnea do Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Harvard Medical School

RECIFE/PE
2012

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4 1010

C376a Cavalcanti, Bernardo Menelau.
Alterações imune e de fibras nervosas da córnea em HZO / Bernardo Menelau Cavalcanti. – 2012.
107 f.: il.; tab.; gráf.; 30 cm.

Orientador: Carlos Teixeira Brandt.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia. Recife, 2012.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Herpes zoster oftálmico. 2. Microscopia confocal. 3. Inervação. 4. Células dentríticas. 5. Sensibilidade corneal. I. Brandt, Carlos Teixeira (Orientador). II. Título.

617.91 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2017-268)

BERNARDO MENELAU CAVALCANTI

ALTERAÇÕES IMUNE E DE FIBRAS NERVOSAS DA CÓRNEA EM HZO

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Cirurgia.

APROVADA EM: 19/11/2012

ORIENTADOR INTERNO: **DR. CARLOS TEIXEIRA BRANDT.**

COMISSÃO EXAMINADORA:

PROF. DR. JOSÉ LAMARTINE DE ANDRADE AGUIAR - CCS/UFPE

PROF. DR. JOSEMBERG MARINS CAMPOS - CCS/UFPE

**PROF^a. DR^a. LIANA MARIA VIEIRA DE OLIVEIRA VENTURA - FUNDAÇÃO
ALTINO VENTURA- PE**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

REITOR

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Francisco de Souza Ramos

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DIRETOR

Prof. Nicodemus Teles de Pontes Filho

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DIRETOR SUPERINTENDENTE

Prof. George da Silva Telles

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
CHEFE

Prof. Salvador Vilar Correia Lima

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA
NÍVEL MESTRADO E DOUTORADO

COORDENADOR

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

VICE-COORDENADOR

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

CORPO DOCENTE

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

Prof. Carlos Teixeira Brandt

Prof. Cláudio Moura Lacerda de Melo

Prof. Edmundo Machado Ferraz

Prof. Fábio de Oliveira Vilar

Prof. Fernando Ribeiro de Moraes Neto

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

Prof. Josemberg Marins Campos

Profa. Magdala de Araújo Novaes

Prof. Salvador Vilar Correia Lima

Prof. Sílvio Caldas Neto

Aos meus pais, *Ronald e Elani*, que sempre me incentivaram a buscar meus sonhos e que me ensinaram que o bem maior que se pode conquistar é o conhecimento.

À *Ludmila*, minha esposa, pelo seu apoio incondicional e companheirismo em todas as etapas de nossas vidas.

À minha filha *Alice*, que chegará em breve e que tanta motivação trouxe para a finalização desta dissertação.

Às minhas irmãs, *Beatriz e Cecília*, pela compreensão de todos os momentos de ausência.

AGRADECIMENTOS

Ao *Prof. Dr. Carlos Teixeira Brandt*, meu orientador, que sempre se mostrou uma pessoa coerente, paciente e fundamental para a realização deste trabalho. Sua paixão pela pesquisa é contagiante e sempre serei grato pelos seus ensinamentos. Que por muitos anos o Dr. Carlos possa contribuir para a formação de novos pesquisadores e médicos.

Ao *Dr. Pedram Hamrah*, que disponibilizou todo o equipamento necessário para aquisição dos dados aqui apresentados.

À *Dra. Deborah Langston*, que disponibilizou seus pacientes e sempre demonstrou um semblante de carinho para com todos.

À colega e amiga *Dra. Andrea Cruzat*, pela ajuda irrestrita durante todo o processo desta pesquisa.

À *Leila Smaga, Monique Trinidad e Candice Williams*, que fazem parte do grupo de pesquisa em córnea do *Massachusetts Eye and Ear Infirmary*, por todo o apoio na aquisição das imagens.

Ao amigo *Dr. Diego Gadelha*, que tanto serviu de incentivo para a concretização desta etapa. Que por muitos anos ainda possamos desfrutar de nossa amizade.

Aos *pacientes*, que tão solenemente acreditaram nas ideias contidas nesta tese e se voluntariaram aos testes necessários.

Aos *amigos e colegas* de mestrado, por terem tornado mais agradáveis os momentos em sala de aula.

À Isabela Pimentel, secretária da pós-graduação em cirurgia da UFPE, pelo empenho no cumprimento dos trâmites formais do processo desta dissertação.

A Daniel Bueno, Márcia e Mércia Virgínio, pelo auxílio na revisão ortográfica, formatação e editoração gráfica desta tese.

RESUMO

Introdução: Herpes Zoster Oftálmico (HZO) resulta em perda da sensibilidade corneal e consequente desenvolvimento de ceratopatia neurotrófica. Objetiva-se analisar as alterações bilaterais das células imunes e do plexo nervoso sub-basal (PNS) da córnea em pacientes com HZO, através da microscopia confocal a laser *in vivo* (LCM), bem como sua correlação com a sensibilidade corneal. **Casuística:** Vinte e quatro olhos de 24 pacientes com o diagnóstico de HZO, e seus respectivos olhos contralaterais não afetados foram avaliados e comparados com grupo controle ($n = 24$). **Métodos:** Os olhos dos pacientes e do grupo controle foram submetidos ao exame de microscopia confocal a laser (Heidelberg Retina Tomograph 3 / Rostock Cornea Module) bem como estesiometria corneal (Cochet-Bonnet) na região central da córnea e em ambos os olhos. As imagens obtidas pela microscopia foram avaliadas e quantificadas para a presença de células dendríticas (DCs) e do plexo nervoso sub-basal. **Resultados:** Tanto o olho afetado quanto o contralateral dos pacientes com HZO apresentaram um aumento significativo de DCs na região central em comparação com o grupo controle ($147,4 \pm 33,9$; $120,1 \pm 21,2$; e $23,0 \pm 3,6$ células/mm²; $p=0,001$). Em ambos os olhos, foi identificada uma redução importante dos parâmetros do plexo nervoso sub-basal em relação à densidade de nervos totais ($9.052,6 \pm 1.151,8$; $14.959,8 \pm 903,2$; e $22.851,4 \pm 661,4$ $\mu\text{m}/\text{mm}^2$; respectivamente $p<0,001$), número de nervos totais ($5,8 \pm 0,9$; $11,9 \pm 1,2$; e $26,6 \pm 1,2$ n/imagem ; $p<0,001$), número de troncos principais ($2,4 \pm 0,3$; $3,8 \pm 0,3$; e $4,4 \pm 0,2$; $p<0,001$) e número de ramos secundários ($3,4 \pm 0,7$; $8,2 \pm 1,1$; e $22,2 \pm 1,2$; $p<0,001$) em relação ao grupo controle. A densidade de DCs apresentou correlação negativa com a densidade de nervos totais ($R=-0,43$; $p<0,001$). Ademais, a redução do plexo nervoso sub-basal apresentou uma correlação positiva com a sensibilidade corneal ($R=0,63$; $p<0,001$). **Conclusão:** HZO unilateral apresentam significativo aumento bilateral de células dendríticas, redução do plexo nervoso sub-basal e da sensibilidade corneal.

Palavras-chave: Herpes zoster oftálmico. Microscopia confocal. Inervação. Células dendríticas. Sensibilidade corneal.

ABSTRACT

Introduction: Herpes zoster ophthalmicus (HZO), thought to be a unilateral disease, results in loss of corneal sensation, leading to neurotrophic keratopathy. This study aimed to analyze bilateral corneal immune cell and nerve changes (PNS) in patients with HZO by laser *in vivo* confocal microscopy (LCM) and their correlation with corneal sensation. **Participants:** Twenty-four eyes of 24 patients with diagnosis of HZO and their contralateral clinically unaffected eyes were studied and compared with normal controls (n = 24). **Methods:** Laser *in vivo* confocal microscopy (Heidelberg Retina Tomograph 3 / Rostock Cornea Module) and corneal esthesiometry (Cochet-Bonnet) of the central cornea were performed bilaterally in all eyes of the patients and controls. Confocal images were evaluated for the presence of dendritiform immune cells (DC) and subbasal nerve plexus. **Results:** HZO affected and contralateral clinically unaffected eyes had a significant increase in DC infiltration of the central cornea (147.4 ± 33.9 ; 120.1 ± 21.2 ; e 23.0 ± 3.6 células/mm²; $p=0.001$). A significant decrease of subbasal nerve parameters in both eyes was found for total nerve length ($9.052.6 \pm 1.151.8$; $14.959.8 \pm 903.2$; e $22.851.4 \pm 661.4$ µm/mm² respectively; $p<0.001$), total number of nerves (5.8 ± 0.9 ; 11.9 ± 1.2 ; e 26.6 ± 1.2 n/frame; $p<0.001$), number of main nerve trunks (2.4 ± 0.3 ; 3.8 ± 0.3 ; e 4.4 ± 0.2 ; $p<0.001$) and the number of branches (3.4 ± 0.7 ; 8.2 ± 1.1 ; e 22.2 ± 1.2 ; $p<0.001$) as compared to controls. DC density showed a moderate negative correlation with total nerve length ($R=-0.43$; $p<0.001$). Moreover, reduced nerve length and number of nerves were strongly correlated with corneal sensation across all subgroups ($R=0.63$; $p<0.001$). **Conclusions:** Patients with unilateral HZO demonstrated a profound and significant bilateral increase in corneal dendritiform cell density and decrease of the corneal subbasal nerve plexus.

Keywords: Herpes zoster ophthalmicus. Confocal microscopy. Innervation. Dendritic cells. Corneal sensitivity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Morfologia das células dendríticas na córnea.....	20
Figura 2	Desenho esquemático da inervação corneal.....	22
Figura 3	Imagem clínica do herpes zoster ocular.....	29
Figura 4	Desenho esquemático do princípio da confocalidade do microscópio confocal.....	31
Figura 5	Profundidade do foco otimiza a captação da imagem do microscópio confocal.....	32
Figura 6	Imagens representativas do plexo nervoso sub-basal da córnea pela técnica confocal.....	35
Figura 7	Imagens representativas de células dendríticas do confocal a laser em pacientes com HZO e do grupo controle.....	43
Figura 8	Imagens representativas do plexo nervoso sub-basal do confocal a laser em pacientes com HZO e do grupo controle.....	45
Tabela 1	Dados demográficos de pacientes com HZO e grupo controle.....	41
Tabela 2	Resultado da sensibilidade corneal, células dendríticas e plexo nervoso sub-basal em pacientes com HZO e grupo controle.....	42
Gráfico 1	Densidade de células dendríticas em pacientes com HZO e grupo controle.....	43
Gráfico 2	Densidade de células dendríticas em pacientes com HZO para os subgrupos em relação à localização da lesão corneal.....	44
Gráfico 3	Box-plot representando a densidade do plexo nervoso sub-basal em pacientes com HZO e grupo controle.....	45
Gráfico 4	Box-plot representando o número de fibras do plexo nervoso sub-basal em pacientes com HZO e grupo controle.....	46
Gráfico 5	Gráfico de dispersão para correlação entre as DCS e o PNS.....	47
Gráfico 6	Gráfico dispersão para correlação entre PNS e sensibilidade corneal	47
Gráfico 7	Curva ROC para sensibilidade corneal e densidade de nervos totais.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HZO	Herpes zoster oftálmico
VZV	Vírus varicela zoster
HZ	Herpes zoster
DCs	Células dendríticas
LASIK	Laser assisted in-situ keratomileusis
PRK	Photorefractive keratectomy
ACAID	Desvio imunológico associado à câmara anterior
VIP	Peptídeo vasoativo intestinal
IFN- γ	Interferon gama
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
MHC-I/MHC-II	Complexo de histocompatibilidade I / II
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
CIITA	Transativador de classe II
NF- κ B	Fator de transcrição NF- κ B
IL-1	Interleucina 1
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
BALB/c; C57BL/6; C3H	Raças de ratos utilizadas em estudos prévios
CD4/11c/11b/45/69/80/83/86	Grupos de diferenciação para imunofenotipagem de células imunes
BMP-4	Bone morphogenic protein-4
BMP-7	Bone morphogenic protein-7
Hoxb	Gene Hoxb
OTX2	Gene OTX2
NGF	Fator de crescimento neural
BDNF	Fator de crescimento derivado do cérebro
GDNF	Fator de crescimento derivado das células da glia
NT 3	Neurotrofina 3
NT 4	Neurotrofina 4
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta

Trk A, B, C e E	Receptor tirosina quinase A, B, C e E
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
ERK-1	Epithelial extracellular signal-regulated kinase 1
PCR	Reação de polimerização em cadeia
CCR4	Receptor CCR4 presente em células imunes com especificidade para citocinas
OFR47	Gene OFR47
TSCM	Microscópio confocal <i>Tandem-scanning</i>
SSCM	Microscópio confocal de varredura por fenda
LCM	Microscópio confocal de varredura a laser
PNS	Plexo nervoso subbasal
DC	Células dendritiformes

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	Apresentação do problema.....	15
1.2	Objetivos.....	17
1.2.1	Geral.....	17
1.2.2	Específicos.....	17
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1	Perfil imunológico e a inervação da córnea.....	18
2.1.1	<i>Perfil imunológico da córnea.....</i>	<i>18</i>
2.1.2	<i>Inervação da córnea.....</i>	<i>21</i>
2.2	Herpes zoster ocular.....	26
2.3	Microscopia confocal.....	31
2.3.1	<i>Microscópio confocal de varredura Tandem (TSCM).....</i>	<i>33</i>
2.3.2	<i>Microscópio confocal de varredura por fenda (SSCM).....</i>	<i>33</i>
2.3.3	<i>Microscópio confocal de varredura a laser (LCM).....</i>	<i>34</i>
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1	Local de estudo.....	36
3.2	Tipo de estudo.....	36
3.3	Seleção.....	36
3.3.1	<i>Critérios de inclusão.....</i>	<i>36</i>
3.3.2	<i>Critérios de exclusão.....</i>	<i>36</i>
3.4	Procedimentos.....	37
3.4.1	<i>Procedimentos técnicos.....</i>	<i>37</i>
3.4.1.1	<i>Exame oftalmológico e teste da sensibilidade corneal.....</i>	<i>37</i>
3.4.1.2	<i>Microscopia confocal.....</i>	<i>37</i>
3.4.1.3	<i>Análise de imagens.....</i>	<i>38</i>
3.4.2	<i>Procedimentos analíticos.....</i>	<i>39</i>
3.4.3	<i>Procedimentos éticos.....</i>	<i>40</i>
4	RESULTADOS.....	41

5	DISCUSSÃO.....	49
6	CONCLUSÕES.....	55
	REFERÊNCIAS.....	56
	APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	71
	APÊNDICE B - Protocolo de Estudo.....	74
	APÊNDICE C - Manuscrito Publicado The Ocular Surface.....	79
	ANEXO A - Aprovação Comitê de Ética.....	107

INTRODUÇÃO

1.1 Apresentação do problema

Herpes zoster oftálmico (HZO) é caracterizado pela inflamação da divisão oftálmica do nervo trigêmeo, secundário à infecção recorrente pelo vírus varicela zoster (VZV). O acometimento ocular representa aproximadamente 10% a 20% de todos os casos de herpes zoster (HZ). A lesão pode ser permanente ou transitória e resulta em déficit visual, dano à superfície ocular, cicatriz e neovascularização corneal.⁽¹⁾ Cerca de 50% a 75% dos pacientes com HZO apresentam alguma complicação ocular, tal como ceratopatia neurotrófica, que pode levar ao desenvolvimento de doença epitelial crônica e perda da visão. As complicações corneais podem estar relacionadas a uma resposta inflamatória e imunológica ao vírus, vasculopatia e neuropatia. A maioria dos casos é unilateral, sendo os casos bilaterais comumente associados com imunossupressão.⁽²⁻⁶⁾

Células dendríticas (DCs) são as células apresentadoras de antígeno mais potentes do corpo humano e se distribuem de forma estratégica como sentinelas do sistema imunológico. Têm a função de reconhecer, captar, processar e apresentar antígenos aos linfócitos. São fundamentais na resposta imune adaptativa e na tolerância antigênica. Representam a principal defesa da córnea e da superfície ocular contra estímulos externos.^(7,8) Em herpes zoster cutâneo, as DCs são responsáveis por carrear o VZV para linfonodos e outras células do sistema imune, sendo fundamentais no desenvolvimento da resposta inflamatória.⁽⁹⁻¹²⁾ Entretanto, o papel dessas células na córnea ainda não está bem esclarecido.

A córnea é um dos tecidos do corpo humano que apresenta maior densidade de fibras nervosas.^(13, 14) A inervação é sensitiva e proveniente dos ramos terminais da divisão oftálmica do nervo trigêmeo. Os nervos corneais penetram na periferia da córnea e apresentam uma distribuição radial paralela à superfície da córnea, entre a camada de Bowman e o epitélio basal, formando o plexo nervoso sub-basal. Em pequena proporção, fibras do sistema nervoso simpático e parassimpático, que se originam do gânglio cervical superior e do gânglio ciliar respectivamente, também suprem o tecido corneal.⁽¹⁵⁻²¹⁾ O sistema nervoso exerce função primordial na

manutenção da superfície ocular. Isso tem sido comprovado pela capacidade de induzir a reepitelização ao se instilar colírios à base de substância P e fator do crescimento insulina símile (IGF-I).⁽²²⁻²⁵⁾

Afecções virais da córnea representam a principal causa de dano à camada de fibras nervosas.⁽²⁶⁻²⁸⁾ Cerca de 60% dos pacientes com HZO apresentam perda ou diminuição da sensibilidade corneal secundária à lesão de fibras nervosas, necrose ganglionar ou dano ao núcleo do mesencéfalo no sistema nervoso central. A associação da redução da sensibilidade corneal com o dano à camada nervosa sub-basal da córnea ainda não está bem caracterizada em pacientes com HZO.⁽²⁹⁻³¹⁾

Na literatura, em modelos animais a relação entre células do sistema imune e o sistema nervoso foi demonstrada no tecido cutâneo e no intestino.⁽³²⁻³⁵⁾ Apenas um estudo recente publicado por Cruzat et al demonstraram a relação dessas células com o dano à camada nervosa de pacientes com ceratites infecciosas agudas.⁽³⁶⁾

O uso da microscopia confocal *in vivo*, que permite a visualização da córnea em cortes quase histológicos, tem se tornado ferramenta muito utilizada para avaliar doenças e alterações provocadas por cirurgias oculares. Estudos recentes têm demonstrado a praticabilidade dessa tecnologia para analisar o plexo nervoso sub-basal em pacientes sem alterações oculares. Diminuição, e até ausência, de fibras nervosas tem sido demonstrada em pacientes submetidos a cirurgias refrativas (LASIK e PRK) e transplantes de córnea.⁽³⁷⁻⁴⁰⁾ O olho contralateral de pacientes com herpes simples foi utilizado como controle em uma série de 16 casos.⁽⁴¹⁾ Apenas um estudo publicado, utilizando um microscópio confocal de varredura por fenda, avaliou a associação do plexo nervoso com a sensibilidade corneal em pacientes com HZO.⁽⁴²⁾ Com o surgimento da nova microscopia confocal a laser foi possível determinar a densidade e o número de fibras nervosas, além de detectar a presença de células dendríticas na córnea. Em HZO, o único estudo sobre esse tema usando tal tecnologia consiste de um relato de caso.⁽⁴³⁾

A proposta deste estudo é quantificar a presença de células dendríticas e avaliar sua relação com a lesão do plexo nervoso sub-basal da córnea no olho afetado e contralateral de pacientes com HZO unilateral através da microscopia confocal a laser.

1.2 Objetivos

1.2.1 Geral

Determinar as alterações das células dendríticas e do plexo nervoso sub-basal da córnea em pacientes com herpes zoster oftálmico através da microscopia confocal *in vivo* a laser.

1.2.2 Específicos

- ❖ Determinar pela microscopia confocal a laser a densidade de células dendríticas na córnea;
- ❖ Definir o número de fibras nervosas do plexo nervoso sub-basal (fibras totais, principais e ramificações) em imagens de microscopia confocal a laser: determinado pelo número de fibras nervosas encontradas por imagem;
- ❖ Avaliar a densidade de fibras nervosas do plexo nervoso sub-basal (fibras totais, principais e ramificações) em imagens de microscopia confocal a laser: definido pela medida do comprimento das fibras nervosas observadas por imagem;
- ❖ Determinar a sensibilidade mecânica corneal através do teste Cochet-Bonnet;
- ❖ Correlacionar os parâmetros obtidos pela microscopia confocal e os níveis de sensibilidade.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Perfil imunológico e a inervação da córnea

2.1.1 *Perfil imunológico da córnea*

A maioria dos tecidos do corpo humano é capaz de suportar variados níveis de dano imunológico sem perda da funcionalidade. Todavia, a vulnerabilidade do olho em resistir a pequenas incitações inflamatórias é, em sua maioria, decorrente da necessidade de preservar a integridade anatômica do eixo visual. Dessa forma, pequenas lesões na córnea podem estar associadas a baixa e até perda da visão.

Em 1948, Medawar propôs que a sobrevivência dos transplantes de córnea era devida à ausência de rejeição imune, definida pelo autor como “ignorância imunológica”.⁽⁴⁴⁾ Em virtude dessa característica específica do olho, o termo “privilegio imunológico”, definido pelo fenômeno de sobrevivência e ausência de rejeição de tecidos transplantados, tem sido aplicado para explicar o estado sustentado de supressão e expressão da imunidade local, especialmente da córnea.⁽⁴⁵⁾

Ainda segundo Medawar, especificamente no olho essa característica era conferida pela ausência de vasos linfáticos. Esse fato não se provou verdadeiro em estudos mais recentes que demonstraram a presença de antígenos oculares circulando no sangue periférico. O conceito do desvio imunológico associado à câmara anterior (ACAID) foi definido posteriormente por Niederkorn. O modelo animal desenvolvido foi capaz de evidenciar a presença de células linfóides aloantigênicas previamente injetadas na câmara anterior no sistema vascular periférico e sistema imune esplênico.^(46,47) Recentemente, a descoberta de vasos linfáticos em doenças da superfície ocular tem comprovado o intercâmbio entre células do sistema imune local com outros tecidos, como linfonodos e baço.^(48,49)

Outro fator importante para a manutenção do equilíbrio imune é a interação com o sistema nervoso. Estudos *in vitro* têm tentado evidenciar essa interação com os neuropeptídeos, tal como o peptídeo vasoativo intestinal (VIP) e somatostatina. Parece que a ação dessas moléculas interage com o sistema imune afetando a

produção de IFN- γ e suprimindo a proliferação linfocítica.^(50,51) Ademais, o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), que é secretado por fibras parassimpáticas, é capaz de suprimir a produção de óxido nítrico por macrófagos.^(52,53) Em conjunto, esses estudos conferem importante informação na manutenção do privilégio imunológico ocular pela atuação do sistema nervoso. Em modelos animais, a interação de neuropeptídeos com a resposta inflamatória tem sido evidenciada no intestino.^(32,33) Tais neuropeptídeos igualmente são encontrados no tecido corneal.^(54,55)

Uma córnea saudável é desprovida de vasos sanguíneos e linfáticos.⁽⁵⁶⁾ Células do epitélio, estroma e endotélio de uma córnea normal expressam o complexo de histocompatibilidade classe I (MHC-I), mas não expressam o complexo de histocompatibilidade classe II (MHC-II).^(57,58) Ao expor células endoteliais a IFN- γ e TNF- α se observa a expressão de MHC-II, mas não do transativador de classe II (CIITA).⁽⁵⁹⁾

De grande relevância tem sido a descoberta de células apresentadoras de antígeno, principalmente células dendríticas na córnea normal e após indução de processo inflamatório. De uma forma geral, essas células atuam como sentinelas e apresentam papel fundamental na indução de tolerância imune de antígenos próprios ou não.⁽⁶⁰⁻⁶²⁾ Essas células são especializadas na captura de antígeno, migração e estimulação de células T. A maioria das células apresentadoras de antígenos da córnea se encontra na região vascularizada do limbo. A população de células residentes nesse local possui MHC-II e pode ser recrutada para a córnea a partir do limbo.^(56,63-66)

A migração dessas células para tecidos extravasculares depende de fatores de quimiotáticos e moléculas de adesão.⁽⁶⁷⁾ A expressão de diversas moléculas de adesão é controlada através da transdução de sinal, a exemplo do NF- κ B, que pode ser ativado por citocinas inflamatórias e/ou produtos provenientes de microrganismos, como lipopolissacarídeos.^(68,69) Um paradigma foi exposto por Dana et al ao identificarem que o pico de migração das DCs na córnea é precedido pela infiltração de células imaturas do sistema imunológico. Esse evento acarreta elevada expressão de moléculas de adesão, contribuindo para o maior recrutamento de DCs.⁽⁷⁰⁾ Dentre as citocinas inflamatórias merecem destaque IL-1 e TNF- α , que atuam em conjunto

no recrutamento de células apresentadoras de antígeno pela indução e ativação de moléculas de adesão, principalmente ICAM-1.^(71,72)

Estudos preliminares em animais criaram o paradigma de que a córnea normal era desprovida de células imunológicas derivadas da medula óssea.^(63,65) A presença de DCs imaturas (MHC-II negativas), que são capazes de expressar MHC-II após trauma cirúrgico e migrar para os linfonodos, foi proposta por Liu et al.⁽⁷³⁾ Usando uma metodologia sistemática, Hamrah et al.⁽⁷⁾ isolaram e identificaram através de estudo imuno-histoquímico o perfil das células dendríticas em ratos (BALB/c, C57BL/6 e C3H). A presença de células CD45⁺CD11c⁺CD11b⁺, que continham marcadores de imaturidade, foi detectada em córneas normais (Figura 1).⁽⁷⁾ Em seguida, o aumento do número de DCs e a presença de marcadores de maturação foram identificados após indução de processo inflamatório através da cauterização de áreas na córnea. Os marcadores encontrados foram: MHC-II, CD80 e CD 86.⁽⁷⁴⁾

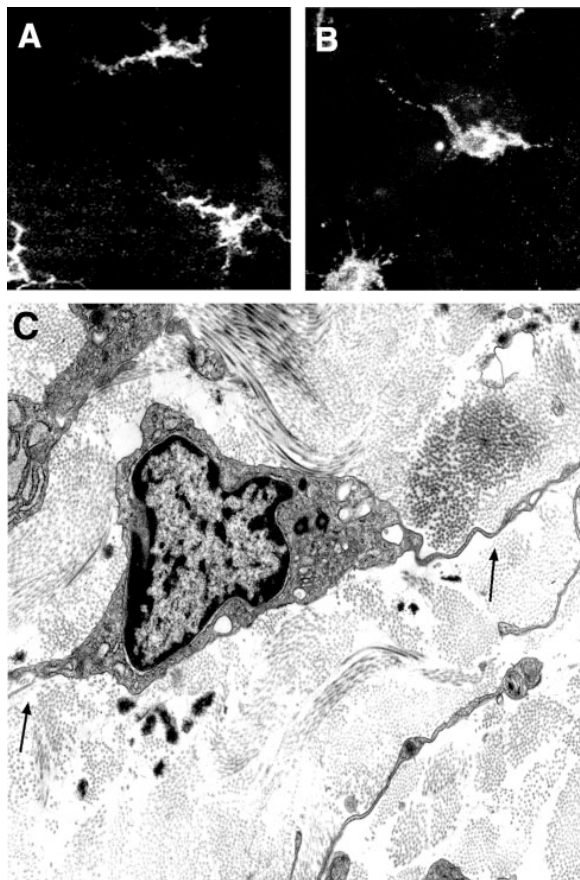


Figura 1: Morfologia de células dendríticas evidenciada através de estudo *in vitro* por microscopia eletrônica em córneas normais de rato. (A) células CD11c⁺CD11b⁺ com morfologia dendritiforme; (B) células CD11c⁻CD11b⁺ com aspecto morfológico de macrófagos; e (C) processos dendríticos (seta preta) de uma célula dendrítica. (Cortesia Dr. Pedram Hamrah)

Tal é a importância das DCs residentes na córnea, que elas são responsáveis pela apresentação de antígenos derivados do tecido doador ao linfonodo regional em transplantes de córnea. Acredita-se que a principal forma de reconhecimento dos

antígenos do tecido doado é através de células dendríticas presentes no próprio tecido doador. DCs do tecido doador podem interagir com linfócitos T CD4⁺ do receptor e posteriormente reconhecidas por DCs do receptor ou outras células apresentadoras de antígeno.⁽⁷³⁾

Em resumo, a córnea apresenta um sistema imunológico ímpar que é mantido sobre delicado controle. O privilégio imunológico permite que o transplante de córnea seja atualmente o transplante de órgão mais realizado e com maior taxa de sucesso. Desde a descoberta das células dendríticas em 1973 por Steinman e Cohn,⁽⁷⁵⁾ cada vez mais esta tem sido o foco de estudos devido à sua conexão entre o sistema imune inato e adaptativo. Apesar de estudos terem caracterizado a importância desse tipo celular em processos inflamatórios e infecciosos da superfície ocular, ainda há necessidade de melhor compreender o perfil de ação dessas células. O desenvolvimento de medicações capazes de modular o sistema imune, principalmente através da ação sobre as células dendríticas, representa um novo caminho que poderá melhorar o prognóstico de reações inflamatórias exacerbadas na superfície ocular.

2.1.2 Inervação da córnea

A inervação da córnea é proveniente de uma pequena porção de fibras, cerca de 1% a 5%, do gânglio ipsilateral do nervo trigêmeo. O extenso padrão de ramificação dos axônios que adentram a córnea conferem a essa estrutura o título de tecido com maior densidade de fibras nervosas.^(21,76) O abundante suprimento nervoso torna a córnea 300 a 600 vezes mais sensível que a pele.⁽⁷⁷⁾

A crista neural é responsável pela origem embrionária do gânglio trigêmeo. Inicialmente, células da região lateral da placa neural se diferenciam em células da crista neural em um processo controlado pela BMP-4 (*bone morphogenic protein-4*) e BMP-7 (*bone morphogenic protein-7*). A diferenciação dessas células leva ao desenvolvimento da crista neural cranial que originará o rombencéfalo e consequentemente os arcos faríngeos. O desenvolvimento dos arcos faríngeos é controlado pelo gene *Hoxb* e *OTX2*. O nervo trigêmeo está entre outras estruturas

derivadas nesse processo. A inervação corneal é, em sua maioria, sensitiva e acontece a partir do 5º mês de gestação.⁽⁷⁸⁾

As fibras nervosas provenientes do ramo oftálmico do nervo trigêmeo perdem a camada de mielina a cerca de 1 mm do limbo. A ausência de mielina é um fator importante para a transparência da córnea.^(79, 80) Em seguida, essas fibras envoltas por células de Schwann seguem um padrão radial até atingir o estroma, onde se ramificam diversas vezes.⁽⁸¹⁾ O plexo nervoso sub-basal é originado por ramos que penetram a camada de Bowman e se desenvolve de maneira centrípeta e apresenta um ápice localizado na região central inferior da córnea. A migração centrípeta e a localização do ápice do plexo sub-basal na córnea têm sido atribuídas ao desenvolvimento embrionário da córnea através da pressão de migração límbica, forças eletromagnéticas, e ainda pela força de cisalhamento exercida pelas pálpebras.⁽⁸²⁻⁸⁷⁾

As fibras que formam o plexo sub-basal correm paralelamente à superfície ocular, entre a camada de Bowman e a membrana basal do epitélio suprindo todo o epitélio da córnea.^(79,85) A Figura 2 mostra de forma esquemática a representação da inervação corneal e a distribuição das fibras nervosas. Através da microscopia confocal foi evidenciado um padrão de organização que culmina com a formação de um vértice na região nasal inferior.⁽⁸⁸⁾

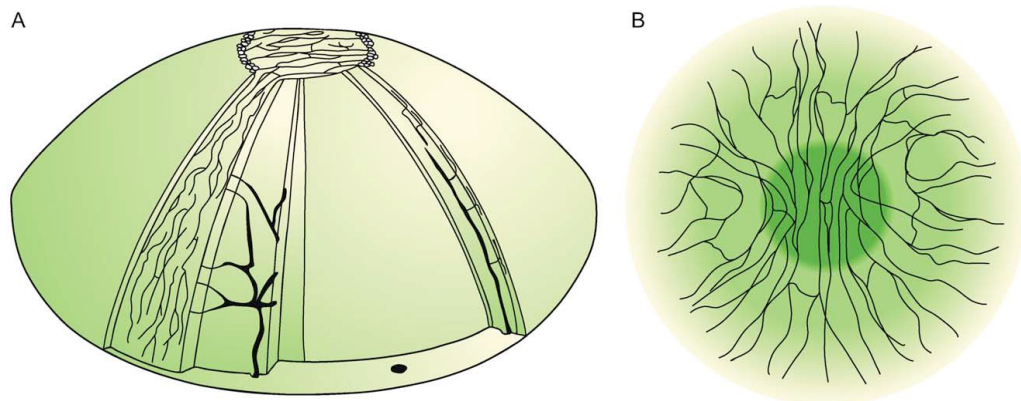


Figura 2: (A) desenho esquemático da distribuição dos nervos corneais. (B) Detalhe da organização do plexo sub-basal corneal. Adaptado de Müller et al. (1997)

Apesar de estudos revelarem o suprimento nervoso da córnea ser proveniente do gânglio trigeminal ipsilateral, essas fibras podem cruzar e provocar projeções diretas sobre áreas cerebrais contralaterais.^(89,90) Esse padrão também foi demonstrado em ratos que tiveram o nervo tibial de uma pata removida. O dano à inervação da pata contralateral esteve presente em 54%.⁽⁹¹⁾ As principais alterações

contralaterais encontradas são redução das fibras e padrão de ramificação aberrante.^(91,92) Não há apenas perda anatômica, como também perda funcional. A presença de dor no lado contralateral foi demonstrada em um modelo animal de dor ciática.⁽⁹³⁻⁹⁵⁾

As fibras nervosas da córnea podem ser classificadas de acordo com o padrão de mielinização e velocidade de transmissão do impulso nervoso em: a) mielinização fina (tipo delta-A; condução rápida com velocidade média de 6 ms^{-1}) e b) não mielinizada (tipo C: baixa velocidade de condução com média de 2 ms^{-1}).⁽⁹⁶⁻¹⁰¹⁾ Outra forma de classificar as fibras nervosas é a partir de suas terminações nervosas. Na córnea existem basicamente três tipos de terminações nervosas: mecanorreceptores, termo-receptores e nocirreceptores polimodais. É estimado que o plexo sub-basal é composto por aproximadamente 7.000 terminações nervosas por mm^2 e as funções das terminações nervosas variam de acordo com a composição química, as propriedades eletrofisiológicas e a resposta ao estímulo.⁽¹⁰²⁾

Os mecanorreceptores correspondem a 20% de todas as terminações aferentes da córnea; suas fibras são do tipo delta-A e desencadeiam dor aguda em resposta a estímulos de contato mecânico na córnea. Os termorreceptores compreendem cerca de 15% de todas as fibras aferentes e são compostos por fibras do tipo delta-A e C. Produzem resposta à evaporação do filme lacrimal ou ao uso de soluções ou jato de ar frios na córnea quando a temperatura é inferior a 33°C . A grande maioria dos nocirreceptores da córnea, cerca de 70%, é polimodal e composta por fibras C. Essas terminações respondem ao calor, estímulos químico e de pressão, desencadeando uma dor fina e de duração prolongada.^(96,103-105)

Uma das principais funções dessas fibras nervosas é transformar as incitações químicas, térmicas e mecânicas em percepção de dor.⁽¹⁰⁶⁾ A alta densidade de terminações nervosas sensitivas está distribuída em toda a superfície corneal, formando uma rede que foi inicialmente descrita por Belmonte e Giraldez em 1981.⁽⁹⁶⁾

Todavia, a camada nervosa da córnea também é responsável pela liberação de diversos fatores que regulam a integridade do epitélio corneal e controlam a resposta da superfície ocular ao trauma.^(81,107,108) A córnea apresenta diversos fatores neurotróficos como o fator de crescimento neural (NGF), fator neurotrófico derivado

do cérebro (BDNF), fator neurotrófico derivado de células da glia (GDNF), neurotrofina 3 (NT-3) e neurotrofina 4 (NT-4).⁽¹⁰⁹⁾ Com exceção do GDNF, que pertence à família do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), os demais fatores citados fazem parte da família do gene das neurotrofinas. As neurotrofinas são homodímeros que se ligam a receptores da família tirosina quinase (Trk A, B, C, e E) e induzem a fosforilação e dimerização iniciando uma cascata de eventos.⁽¹¹⁰⁻¹¹²⁾

You et al⁽¹⁰⁹⁾ demonstraram a formação e proliferação de colônias de células epiteliais usando NGF e GDNF, enquanto BDNF apenas estava associado à formação de colônias. Segundo descrição da técnica utilizada, isso foi conseguido através da cascata de ativação de *MAPK* (*mitogen-activated protein kinase*) mediado pela fosforilação de *ERK-1* (*epithelial extracellular signal-regulated kinase 1*) que ativa fatores de transcrição.⁽¹⁰⁹⁾ Relatos de casos evidenciaram com sucesso o tratamento de úlcera de córneas de etiologia neurotrófica com o NGF.⁽¹¹³⁻¹¹⁵⁾

O teste da sensibilidade é um método para avaliar a função corneal.⁽¹¹⁶⁾ Esforços para medir a sensibilidade da córnea datam de 1894, quando Van Frey usou um fio de cabelo de cavalo para testar essa sensibilidade.⁽¹¹⁷⁾ A sensibilidade corneal é mediada por fibras nervosas delta-A e C que se despolarizam e liberam um impulso elétrico em resposta a estímulos mecânicos, térmicos e químicos na superfície ocular.⁽¹⁰⁵⁾

O princípio da estesiometria da córnea consiste na excitação mecânica por níveis variados de pressão na superfície da córnea para induzir estímulos mecânicos e aferir quantitativamente a sensibilidade corneal. Entretanto, a sensibilidade da córnea não está limitada a estímulos mecânicos; fibras especializadas na córnea podem ser excitadas por estímulos químicos e térmicos.^(102,118) O método mais popular e extensivamente usado na prática clínica é o estesiômetro de contato Cochet-Bonnet, que testa a sensibilidade através de estímulo mecânico. Outro equipamento ainda em estudo é o estesiômetro de não contato de Belmonte, que apresenta uma recente atualização, CRCERT, que é capaz de produzir estímulos mecânicos, químicos e térmicos.

O estesiômetro de contato Cochet-Bonnet foi desenvolvido e comercializado a partir de 1960. O desenvolvimento desse equipamento foi baseado no protótipo de

1955 de Bobberg Ans, que utilizava um filamento de *nylon* de comprimento variado para exercer diversos níveis de pressão na superfície da córnea.⁽¹¹⁷⁾

O Cochet-Bonnet utiliza um filamento de nylon de 0,12 mm de diâmetro com 6 cm de comprimento acoplado a um aplicador. O aplicador permite que o filamento de *nylon* seja exposto e retraído, podendo exercer diferentes pressões na superfície ocular. É solicitada ao paciente uma resposta verbal assim que o estímulo é sentido. O contato inicial é feito com o maior comprimento do filamento, 6 cm, que provoca o menor estímulo na superfície da córnea. Progressivo encurtamento do filamento a cada 0,5 cm é realizado até uma resposta positiva do paciente. Uma escala de 0 a 6 com intervalo de 0,5 é disposta na região externa do aplicador, sendo o valor 6 para quando o filamento estiver totalmente exposto, e o valor 0 para a retração total do filamento. A unidade de medida é em centímetros e diretamente proporcional à sensibilidade corneal. Quanto maior o comprimento do filamento, que é capaz de produzir estímulo, mais sensível é a córnea. Acredita-se que através do contato e consequente estímulo mecânico pelo Cochet-Bonnet, as fibras delta-A são estimuladas e responsáveis pela sensibilidade da córnea. Essas fibras se localizam posteriormente ao epitélio da córnea, o que explica a performance insatisfatória do aparelho em medir estímulos de baixa intensidade.⁽¹¹⁹⁾

O estesiômetro de Cochet-Bonnet é largamente utilizado na oftalmologia clínica e para pesquisas científicas. Uma das principais razões para isso é a sua portabilidade. Contudo, esse dispositivo apresenta restrições como limitada intensidade de estímulos, restrição à resposta de mecano-neuroreceptores e reduzida reprodutibilidade da sensibilidade da córnea com estímulos de baixa intensidade.^(119,120)

A idealização do estesiômetro de não contato partiu das prévias limitações do Cochet-Bonnet. O estesiômetro de Belmonte em sua versão mais atual (CRCERT-Belmonte) é um dispositivo que foi projetado sob o princípio do estímulo pneumático de não contato, no qual um jato de ar estimula os nervos corneais por compressão da superfície, induzindo alterações do filme lacrimal através da evaporação e aumento da temperatura na superfície da córnea.⁽¹²¹⁾ O limite do estímulo é medido pelo fluxo de ar (ml/min). A mudança da quantidade de força exercida pelo estesiômetro de Belmonte é consistente com o aumento do estímulo,

em uma relação quadrática com o fluxo de ar.⁽¹²⁰⁾ Entretanto, esse dispositivo ainda não está aprovado para uso clínico no Brasil e nos Estados Unidos.

2.2 Herpes zoster oftálmico

Os primeiros relatos dessa doença datam do século XIX. Em 1818, Mehlis sugeriu que a erupção vesicular seguia a distribuição de inervação cutânea, e Parrot, em 1856, observou que tanto a erupção como a dor obedeciam ao mesmo padrão. Em 1866 Hutchinson descreveu a primeira série de casos de herpes zoster oftálmico. Nessa época, estimava-se uma incidência de 1% a 2% para qualquer tipo de herpes zoster.⁽¹²²⁾ Aproximadamente 20% a 30% da população desenvolverá a doença em alguma etapa da vida, sendo que essa frequência pode atingir 50% nos indivíduos na faixa etária dos 85 anos. Atualmente, cerca de 1 milhão de pessoas anualmente nos Estados Unidos desenvolvem a doença.⁽¹²³⁻¹²⁵⁾

HZ apresenta a maior incidência entre as doenças neurológicas, e estudos populacionais epidemiológicos têm evidenciado a idade como um fator determinante. A incidência em todas as idades é estimada em 1,2 a 4,8 casos por 1.000 indivíduos ao ano. Contudo, valores de 7,2 a 11,8 casos por 1.000 indivíduos ao ano são observados na população acima dos 60 anos.⁽¹²⁶⁾ Com base nesses dados, estima-se que a incidência ainda vá aumentar com o aumento da faixa etária.⁽¹²⁷⁾

Apesar do herpes zoster e da varicela serem duas doenças distintas, ambas são causadas pelo mesmo microrganismo. Historicamente a relação entre essas duas doenças foi sugerida em 1892 por Bókay, através da observação de novos casos de varicela em crianças após serem expostas a pacientes adultos com HZ em atividade. O vírus da varicela zoster ou herpes vírus tipo 3 pertence à família *herpesviridae*. É um vírus espécie específico que apresenta um nucleocapsídeo que contém duplo espiral de DNA.⁽¹²⁸⁾ Seis ou mais glicoproteínas são encontradas na membrana celular, sendo as mais importantes: gB, gC, gE, gI e gH. A proteína gE apresenta ligação covalente com gI que se prendem à região Fc da imunoglobulina G. A glicoproteína gB é o alvo de anticorpos e provavelmente apresenta papel importante na penetração celular pelo vírus. A proteína gH está ligada à função de fusão e facilita distribuição célula a célula do vírus. Já a gC não parece exercer função essencial à replicação viral.^(129,130)

VZV apresenta distribuição geográfica mundial e a ocorrência de epidemias é mais frequente em regiões temperadas na época do inverno e/ou primavera.⁽¹²⁷⁾

Herpes zoster é a consequência da reativação do vírus latente no gânglio dorsal após a primoinfecção.^(131,132) Em 1965, Hope-Simpson propôs que o aparecimento de HZ estava diretamente relacionado com a imunidade do indivíduo.⁽¹²³⁾ Outros estudos mais recentes confirmaram a suposição inicial.^(133,134) Como outros vírus da família do herpes, uma complexa relação é estabelecida entre o vírus e o hospedeiro. A reativação é caracterizada pela transmissão célula a célula até atingir a pele e desencadear as lesões típicas.

Normalmente uma viremia acompanha essa reação.⁽¹²⁷⁾ A presença de viremia subclínica foi demonstrada através de estudos por PCR em 19% dos pacientes submetidos a transplante de medula óssea.⁽¹³⁵⁾ Surpreendentemente, Hope-Simpson também sugeriu que a exposição recorrente a indivíduos com varicela e viremia subclínicas rotineiras é mecanismo importante para prevenir a recorrência HZ.⁽¹²³⁾ Ademais, estudos têm sugerido uma viremia subclínica transiente em adultos que seria responsável por estimular o sistema imune e prevenir o aparecimento da doença propriamente dito.^(135,136) Sendo assim, o estado imunológico é considerado um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de HZ. Embora a primoinfecção seja capaz de induzir memória imune específica através de células T, a falta de estímulo ocasiona uma redução dos níveis de anticorpos específicos predispondo ao surgimento ou recorrência do HZ.⁽¹²⁷⁾

Acredita-se que o herpes zoster é uma doença com acometimento unilateral seguindo um dermatomo.⁽¹³⁷⁾ Ao examinar gânglios *pós-mortem* em 1991, Watson descreveu pela primeira vez a presença de dano bilateral à raiz sensitiva em indivíduos que tinham acometimento unilateral por HZ.⁽¹³⁸⁾ Oaklander et al⁽¹³⁹⁾ detectou por estudos imuno-histoquímicos com anticorpo anti-PGP9.5 a redução de fibras do lado acometido (densidade 339 ± 97 fibras nervosas) e também diminuição parcial de fibras nervosas do lado contralateral (densidade 1.661 ± 262).

Estudos recentes revelam o papel fundamental do sistema imune nessa infecção. VZV apresenta tropismo por linfócitos T e estes parecem estar envolvidos no transporte direto do vírus à pele. Isso foi demonstrado inicialmente pela presença de moléculas de RNA da glicoproteína gE em cultura de linfócitos T CD4⁺. Além

disso, a população de linfócitos T que se tornou infectada apresentou fenotipagem CD69⁺ e CD45RA⁻. Essa população de linfócitos T também expressava marcadores para *homing* cutâneo (antígeno leucocitário cutâneo e CCR4) e função migratória preservada.^(140,141) Em análises de biópsias cutâneas foi demonstrada a presença de infiltrado linfocitário denso com linfócitos atípicos.⁽¹⁴²⁾ Tais infiltrados cutâneos foram posteriormente caracterizados pelo predomínio de linfócitos CD8⁺.⁽¹⁴³⁾

As células dendríticas também parecem estar envolvidas ativamente no processo de doença. Tem sido sugerida a participação das DCs do trato respiratório no transporte ativo de partículas virais para linfonodos. Estudos *in vitro* demonstraram DCs imaturas infectadas com VZV, sendo o processo de replicação viral nesse ambiente dependente do gene ORF47.⁽⁹⁾ Dando seguimento ao estudo de Morrow et al⁽¹⁰⁾ demonstraram que aproximadamente 15% de células dendríticas que expressavam marcadores de maturidade (MHC-II, CD80, CD83 e CD86) eram permissivas ao vírus.

Herpes zoster oftálmico é definido quando há comprometimento do ramo oftálmico do nervo trigêmeo. Este acometimento é o segundo mais comum, representando cerca de 20% de todos os casos de herpes zoster. Sendo assim, cada indivíduo apresenta 1% de probabilidade de desenvolver HZO durante a vida.⁽¹⁴⁴⁾ Como outros tipos de herpes zoster, a apresentação clínica típica é caracterizada pela presença de um *rash* vesicular unilateral que acompanha um dermatomo. Na maioria dos casos, um período prodômico com dor localizada, cefaleia e febre precede as erupções cutâneas. Inicialmente o *rash* é composto por vesículas que evoluem para pústulas e crostas até resolução completa em duas a três semanas.^(145,146) O acometimento ocular acontece em 50% dos casos e doença crônica pode persistir em 30% dos pacientes.⁽¹⁴⁷⁾

Ultimamente, a incidência de complicações oculares varia de 2% a 46%.⁽¹⁴⁸⁾ O primeiro levantamento sistemático de alterações corneais por herpes zoster oftálmico foi realizado por Liesegang, em 1985. O acometimento corneano mais frequente é a ceratite epitelial pontuada, seguido pela presença de pseudodendritos e infiltrados estromais.^(149,150) A Figura 3 ilustra a lesão de pele seguindo o dermatomo inervado pelo ramo oftálmico e a presença de pseudodendritos na córnea. A lesão da córnea

está diretamente relacionada à infecção, assim como pelo dano secundário através do sistema imunológico ou nervoso.

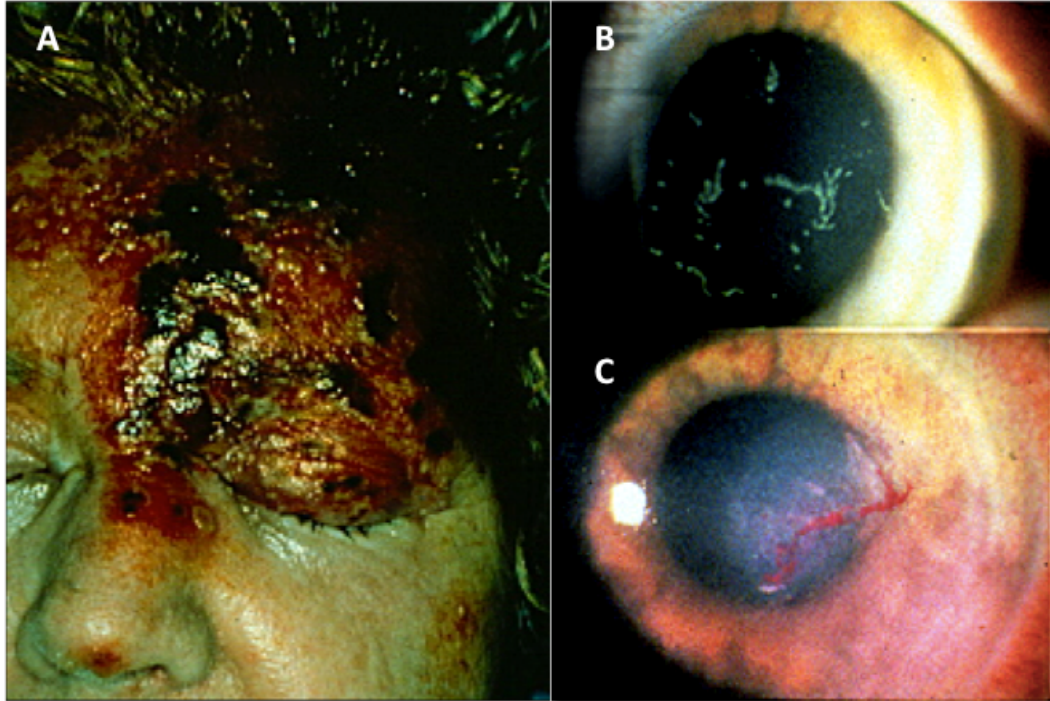


Figura 3: imagem clínica do herpes zoster ocular. (A) Lesões cutâneas encontradas na grande maioria dos casos. Foto da lâmpada de fenda de pseudodendrito evidenciado pelo corante fluoresceína (B) e rosa bengala (C). (Cortesia Dra. Débora Pavan-Langston)

A comprovação da presença viral na córnea foi previamente determinada pela técnica de PCR em lesões ativas.⁽¹⁵¹⁻¹⁵³⁾ Usando a técnica de hibridização *in vitro* através de fragmentos virais (35S HindIII A e C) marcados, foi possível detectar a presença de DNA viral em 5 botões corneais, sendo um botão com mais de oito anos do ataque de HZO.⁽¹⁵¹⁾ Em outro estudo que realizou PCR em lesões pseudodendríticas crônicas, a presença de partículas do DNA viral foi detectada após coleta de material obtida com o teste de Schimer.⁽¹⁵³⁾

Dessa forma, a presença do vírus na córnea é fundamental para o desenvolvimento de alterações oculares, principalmente durante atividade da doença. De tal forma partículas virais não foram observadas em amostras de pacientes com quadros neurotróficos.⁽¹⁵³⁾ Após a resolução do quadro, o vírus apresenta uma migração retrograda, permanecendo latente no gânglio trigeminal ipsilateral. Apesar de o acometimento bilateral ser raro e mais prevalente em pacientes com imunodepressão, a detecção de partículas virais já foi bem documentada no gânglio contralateral.⁽²⁻⁶⁾

Uma das mais temidas complicações é a ceratopatia neurotrófica, que pode levar à cronificação da doença epitelial e até perda da visão.⁽¹⁵⁴⁾ A ceratopatia neurotrófica ocorre pelo dano à inervação da córnea e consequente diminuição ou perda da sensibilidade.⁽¹⁵⁵⁾ A lesão nervosa leva à instabilidade do epitélio corneal. Estudos sugerem que isso ocorre devido à diminuição de mitoses, da concentração do neurotransmissor acetilcolina e da espessura da camada epitelial. Ademais, foi observado aumento da permeabilidade devido à alteração nas *tight junctions* e adesão entre células epiteliais.^(156,157) Essa condição apresenta prognóstico reservado devido à falta de tratamento específico, embora atualmente o desenvolvimento de medicações à base de fatores de crescimento derivados do sistema nervoso apresente um grande potencial.⁽¹⁵⁸⁾

Com o envelhecimento da população e o crescente surgimento de novos casos, fazem-se necessários novos estudos para melhor acessar e monitorar as alterações oculares, especialmente na córnea. Numerosas complicações da córnea podem acontecer após HZO. Nos casos mais agudos, o surgimento das alterações oculares apresenta analogia com a infecção viral, enquanto as alterações tardias estão mais

relacionadas à presença de hipoestesia ou anestesia corneal. Embora muitos estudos tenham identificado parte da fisiopatologia da doença *in vitro*, estudos *in vivo* são escassos e podem elucidar novos caminhos para a detecção e prevenção de complicações.

2.3 Microscopia confocal

A primeira descrição do uso clínico da tecnologia confocal foi feita por Marvin Minsky, em 1955, quando realizou imagem *in vivo* do cérebro para estudar as redes neurais.^(159,160) O princípio da microscopia confocal consiste no alinhamento conjugado do feixe de luz, emitido pelo condensador, com os raios refletidos pelo mesmo tecido iluminado e capturados por um sensor. A Figura 4 ilustra o arranjo do microscópio confocal demonstrando o princípio da confocalidade através dos feixes emitidos e refletidos.

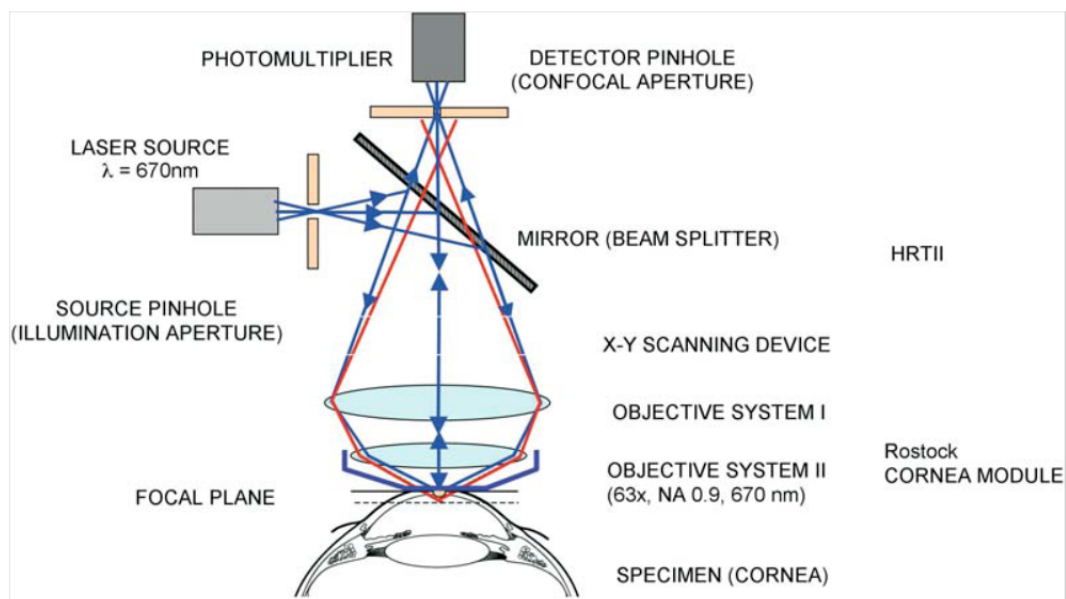


Figura 4: desenho esquemático do princípio da confocalidade do microscópio confocal. Adaptado do livro: Atlas of confocal laser scanning *in vivo* microscopy in ophthalmology - Principles and applications in diagnostic and therapeutic ophthalmology

Microscópios convencionais produzem imagens de baixa qualidade devido ao grande número de feixes refletidos e à dispersão de luz de estruturas adjacentes que não estão no plano em foco.⁽¹⁶¹⁾ Esse problema foi resolvido através do desenvolvimento do microscópio confocal, que detecta apenas uma pequena quantidade de luz refletida por planos fora da área de interesse. Isso ocorre devido à lente objetiva possuir um buraco estenopeico, que somente reconhece os raios que atingem esse pequeno diafragma, excluindo em sua maioria a dispersão provocada por tecidos adjacentes ao plano em foco.⁽¹⁶²⁾ Para a córnea, essa característica é fundamental, pois aumenta a profundidade de foco e melhora a resolução axial e lateral, como ilustrado na Figura 5.⁽¹⁶³⁻¹⁶⁵⁾

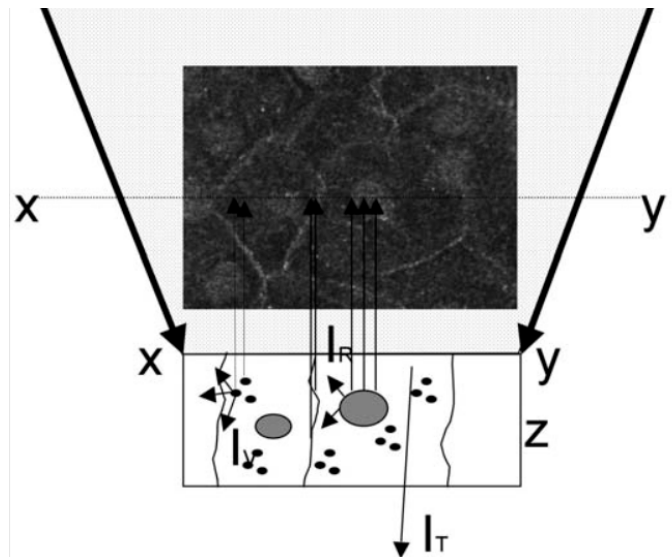


Figura 5: aumento da profundidade do foco otimiza a captação da imagem em um único plano. Adaptado do livro: Atlas of Confocal Laser Scanning In-vivo Microscopy in Ophthalmology – Principles and Applications in Diagnostic and Therapeutic Ophthalmology

Grandes avanços foram feitos desde o desenvolvimento da microscopia confocal. Em 1968, o microscópio confocal usando a técnica de varredura *Tandem* foi apresentado e, em seguida, surgiu a técnica de varredura por fenda. Entretanto, apenas em 1990 a córnea humana foi retratada por Cavanagh et al.⁽¹⁶¹⁾ Atualmente, a técnica mais moderna consiste no uso de uma fonte de luz coerente a laser.

2.3.1 Microscópio confocal de varredura Tandem (TSCM)

A primeira descrição do TSCM foi realizada por Petran and Hadravsky e data de 1989.⁽¹⁶⁶⁾ Essa técnica utiliza um disco giratório de *Nipkow* com múltiplos orifícios estenopeicos posicionados em espirais (*Archimedean spirals*). Esse confocal apresenta resolução axial e lateral de boa qualidade. A pequena abertura dos orifícios estenopeicos e o grande número de diafragmas da lente objetiva aumentam a profundidade de foco e cria finos cortes ópticos.⁽¹⁶⁷⁾

Entretanto, um aumento da dispersão da luz ocorre devido ao grande número de orifícios estenopeicos, dificultando a penetração do feixe luminoso nos tecidos. Ademais, essa técnica necessita de uma forte fonte luminosa e uma câmera que capta luz de baixa intensidade, ocasionando uma redução do sinal após passar pelo disco de *Nipkow*. Por essas limitações e com o surgimento de novas tecnologias essa técnica não é mais utilizada.

2.3.2 Microscópio confocal de varredura por fenda (SSCM)

O confoscan (Nidek Technologies, Gamagori, Japão) é o exemplo da tecnologia SSCM para uso oftálmico. Consiste no uso de múltiplas aberturas verticais em fenda para iluminação e captação do tecido a ser avaliado. Essa tecnologia foi desenvolvida em 1994 por Thaer.⁽¹⁶⁸⁾ Uma das principais desse método é a varredura simultânea de múltiplos pontos em paralelo ao longo da fenda, permitindo a visualização de uma área maior e reduzindo o tempo do exame.

Devido à maior intensidade luminosa que atinge o tecido, o SSCM permite uma imagem mais clara com bordas bem definidas em relação ao TSCM. Através dessa técnica é que foram descritas em detalhe pela primeira vez imagens *in vivo* do estroma da córnea e das camadas do epitélio corneal.⁽¹⁶⁸⁾ Em comparação com o confocal de varredura a Tandem, o confocal de varredura por fenda apresenta melhor resolução e demonstrar maior capacidade na detecção de fibras nervosas da córnea.⁽¹⁶⁹⁾

A desvantagem é a baixa resolução axial e a falta de consistência ao detectar o plexo nervoso sub-basal em comparação com a tecnologia a laser como demonstrado

na Figura 6.

2.3.3 Microscópio confocal de varredura a laser (LCM)

A tecnologia de varredura a laser utiliza fonte de luz que consiste de laser de diodo classe 1, com comprimento de onda de 670 nm. Após atingir o tecido iluminado, o feixe de luz atravessa uma série de espelhos até atingir a lente objetiva do equipamento.⁽¹⁶²⁾ O único aparelho disponível comercialmente é produzido pela Heidelberg Engineering (Alemanha) e conhecido como RCM-HRT (*Cornea Rostock Module - Heidelberg Retina Tomograph*).

A magnificação obtida com essa técnica é de 800 vezes. As imagens captadas pela objetiva são de alta qualidade, com bordas bem definidas e com alto contraste. Em 2010, Niederer et al⁽¹⁷⁰⁾ ressaltou a superioridade dessa tecnologia em comparação com as técnicas previamente descritas. Isso permite uma excelente visualização do plexo nervoso sub-basal corneal, como demonstrado na Figura 6. Ademais, esse exame permite a detecção de células do sistema imunológico na superfície ocular de indivíduos normais ou pacientes.⁽¹⁷¹⁻¹⁷⁷⁾

Para captar imagens, essa técnica necessita de contato direto com a superfície do tecido a ser avaliado. O contato direto com a córnea pode produzir artefatos associados ao aplanamento da superfície ocular.⁽¹⁷⁸⁾

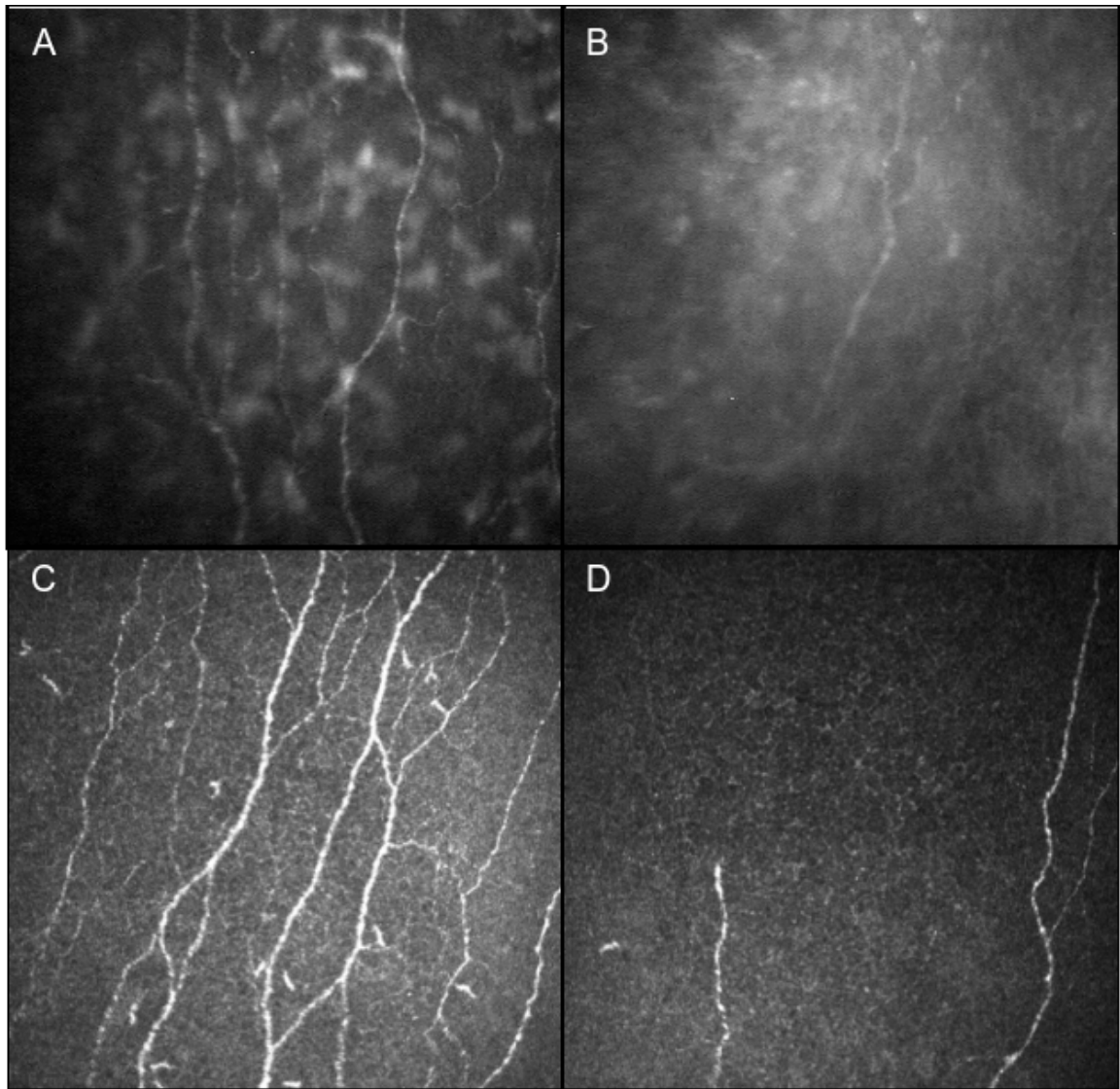


Figura 6: imagens representativas do plexo nervoso sub-basal da córnea. (A) e (B) Imagens obtidas pela técnica de varredura por fenda demonstram menos detalhes que as obtidas por varredura a laser (C) e (D). (Imagens obtidas no Centro Diagnóstico de Imagem da Superfície Ocular, Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Harvard Medical School - Cortesia Dr. Pedram Hamrah)

3 MÉTODOS

3.1 Local de estudo

O estudo foi realizado no Departamento de Córnea e no Centro de Diagnóstico por Imagem da Superfície Ocular do *Massachusetts Eye and Ear Infirmary*, Harvard Medical School, Boston, MA, EUA, no período de 2009 a 2011.

3.2 Tipo de estudo

Foi realizado um estudo prospectivo, transversal, observacional e analítico com mascaramento simples.

3.3 Casuística

3.3.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo 24 pacientes com idade superior a 18 anos e diagnóstico de acometimento ocular unilateral por herpes zoster (grupo HZO). Ademais, 24 voluntários de faixa etária semelhante foram selecionados para o grupo controle. Dos indivíduos do grupo controle apenas um olho foi utilizado para análise e este, aleatoriamente escolhido.

3.3.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos pacientes com histórico de transplante de córnea ou cirurgia refrativa, passado de cirurgia intraocular, referência de ceratite infecciosa e/ou presença de cicatriz corneal não relacionada ao HZO (trauma, herpes simples, bactéria, fungo ou acanthamoeba). Também foram excluídos indivíduos com distrofias corneais ou aqueles com diagnóstico de diabetes.

3.4 Procedimentos

3.4.1 *Procedimentos técnicos*

3.4.1.1 *Exame oftalmológico e teste da sensibilidade corneal*

Todos os pacientes foram inicialmente avaliados por um exame oftálmico biomicroscópico detalhado para determinar a presença de lesão ocular com e sem o uso de corantes vitais usados de forma rotineira no consultório oftalmológico. Dessa forma, os olhos examinados foram subdivididos em olho afetado (HZO afetado) e contralateral não afetado (HZO contralateral). Além disso, os olhos afetados foram classificados considerando a córnea em: sem lesão, lesão central ou periférica.

Em seguida foram submetidos ao teste sensibilidade corneal com o estesiômetro Cochet-Bonet por pelo menos um oftalmologista com experiência (PH ou DPL). O teste de sensibilidade consistia do estímulo mecânico produzido por um filamento de nylon padrão (diâmetro 0,12 mm) na região central da córnea. Inicialmente o teste era realizado com o maior comprimento (6 cm) da fibra de *nylon*, que induz o menor estímulo e reduzido gradualmente seguindo a escala disponível no aparelho (0,5 cm) até uma resposta positiva do paciente. O teste foi realizado duas vezes, sendo utilizado o maior comprimento que produzia uma resposta positiva do paciente.

Todos os dados obtidos foram registrados no protocolo de estudo (Apêndice A) previamente aprovado pelo Comitê de Ética (Anexo A).

3.4.1.2 *Microscopia confocal*

A microscopia confocal *in vivo* a laser (Rostock Cornea Module com Heidelberg Retina Tomograph 3; Heidelbergh Engineering GmbH, Dossenheim, Alemanha) foi realizada na região central da córnea de ambos os olhos. Para esse estudo foi utilizada uma lente objetiva de imersão de 63x (Olympus, Tóquio, Japão) que capta imagens referentes a uma área de 400 por 400 μm com magnificação total de 800 vezes e resolução axial de 1 μm .

A preparação do equipamento consiste da aposição de lente de polimetilmetacrilato (Tomo-Cap; Heidelberg Engineering GmbH, Dossenheim, Alemanha) estéril preenchida com uma camada de hidroxipropil metilcelulose 2,5% (GenTeal gel; Novartis Ophthalmics, Nova Jérsei, EUA) à frente da lente objetiva. Uma gota de anestésico tópico à base de proparacaína 0,5% (Alcaine; Alcon, Texas, EUA) foi instilada em ambos os olhos, seguida por hidroxipropil metilcelulose 2,5%. Objetivando melhor qualidade na aquisição de imagens, também foi adicionada uma pequena camada de hidroxipropil metilcelulose 2,5% na área externa da Tomo-Cap, melhorando o acoplamento da superfície ocular com a lente. Uma fonte luminosa externa foi utilizada para manter a fixação do paciente.

O modo de sequência para captação de imagem foi selecionado, e um total de seis séries foi obtido por olho. Esse modo permite a captação de imagens na frequência de três quadros por segundo. A identificação do epitélio corneal foi usada como ponto de partida para início da captação das imagens. O foco foi modificado de acordo com a necessidade para obter imagens do plexo nervoso sub-basal e de células dendríticas que normalmente estão situadas a uma profundidade de 50 μm a 80 μm do epitélio. Todas as imagens foram digitalizadas e armazenadas em um computador de uso restrito.

3.4.1.3 *Análise de imagens*

Três imagens representativas do plexo nervoso sub-basal e de células dendríticas por olho foram selecionadas. O critério de seleção para imagens foi baseado na qualidade de foco da imagem e na visualização do mesmo plano em toda a imagem, sem distorção e com bom contraste.

O software gratuito distribuído pelo National Institute of Health (NIH), ImageJ foi utilizado na quantificação dos parâmetros propostos. Dois observadores analisaram as imagens para determinar a densidade de células dendríticas e quantificar o plexo nervoso sub-basal na região central da córnea.

As DCs foram definidas como estruturas hiperreflectivas que apresentavam corpo celular e prolongamentos de tamanhos variados, diferenciando-as das fibras nervosas. Devido à natureza *in vivo* do estudo não foi possível fazer uso de

marcadores para definir fenotipicamente essas células. Através de seleção manual todas as células contidas em uma imagem foram quantificadas. A densidade foi expressa em células por mm^2 .

De forma similar, usando NeuronJ, um plug-in para o Image J foi utilizado para traçar e quantificar a camada nervosa sub-basal. Para esse estudo foi definido o número de troncos nervosos principais, ramos nervosos secundários e número de nervos totais por imagem. As fibras com alta reflectividade que atravessam a imagem por completo foram consideradas como troncos nervosos principais. O número de ramos secundários foi definido como o número de ramos secundários por imagem. O número de nervos totais foi determinado como o número de todos os nervos encontrados em uma imagem, incluindo os troncos principais e ramos secundários. A densidade de fibras nervosas foi expressa em micrômetros por mm^2 .

3.4.2 *Procedimentos analíticos*

Para verificar se os grupos (HZO e controle) eram semelhantes, foi aplicado o teste t-Student para comparação da idade, e o teste Qui-Quadrado de Pearson para o gênero. Para a comparação dos grupos (HZO afetado, HZO contralateral, controle) com relação às variáveis de desfecho foi aplicada a metodologia de Análise de Variância - ANOVA, para a comparação de médias. Para as comparações múltiplas foi utilizado o teste de Bonferroni. O coeficiente de Pearson foi aplicado para verificar a correlação entre a densidade de DCs, as medidas da camada sub-basal nervosa e a sensibilidade corneal. No caso onde houve importante correlação, foi aplicada a metodologia de Curva ROC para determinar a especificidade e sensibilidade dos parâmetros obtidos com o microscópio confocal. Optou-se por metodologia paramétrica, pois as variáveis passaram pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis quantitativas foram expressas por sua média e erro padrão da média. Um valor de p inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Para execução dos cálculos estatísticos foi utilizado o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), versão 18.0; IBM, Chicago, USA.

3.4.3 Procedimentos éticos

O estudo foi conduzido em conformidade com as disposições da Declaração de Helsinki e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do *Massachusetts Eye and Ear Infirmary*, Harvard Medical School (Anexo A). Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice B).

4 RESULTADOS

Dos 24 pacientes com diagnóstico de HZO e acometimento ocular incluídos no estudo, 11 (45,8%) eram do gênero masculino e 13 (54,2%) do gênero feminino, com média de idade de 60,1 anos ($\pm 3,0$ anos). A distribuição do grupo controle em relação ao gênero ($p=0,558$) e idade ($p=0,212$) não foi estatisticamente diferente, com nove (37,5%) do gênero masculino e 15 (62,5%) do feminino, com média de idade de 55,6 anos ($\pm 1,9$ ano). A duração média da doença foi de 57,0 meses ($\pm 11,3$ meses) em relação ao primeiro episódio. A frequência de recorrências observada foi em média 1,5 ($\pm 0,2$) episódio durante o período de ocorrência da doença. Um resumo dos dados demográficos é apresentado na Tabela 1.

Em relação à localização da doença na córnea, 11 pacientes apresentavam uma cicatriz central na córnea e oito na região periférica. Dos cinco pacientes que não apresentavam lesão na córnea, três tinham histórico de episclerite e dois de uveíte.

Tabela 1: Distribuição das frequências dos dados demográficos dos pacientes com herpes zoster oftálmico e do grupo controle

	HZO	Controle
Número de pacientes (n)	24	24
Idade (anos)	60,1 $\pm$ 3,0	55,6 $\pm$ 1,9
Gênero (masc./fem.)	11 / 13	9 / 15
Sensibilidade corneal (cm)	2,7 $\pm$ 0,5*	5,9 $\pm$ 0,1
Duração da doença (meses)	57,0 $\pm$ 11,3	n/a
Número de episódios (n)	1,5 $\pm$ 0,2	n/a
Número de pacientes em relação à doença corneal (sem lesão / central / periférica)	5 / 11 / 8	n/a

Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média. HZO: herpes zoster oftálmico; n/a: não aplicável.

* Estatisticamente significativa ($p<0,001$)

Um resumo dos parâmetros clínicos e de imagem analisados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Resultado da sensibilidade corneal, células dendríticas e da camada do plexo nervoso sub-basal em pacientes com herpes zoster oftálmico unilateral, olho contralateral clinicamente normal e grupo controle.

	HZO afetado	HZO contralateral	Controle
Olhos (n)	24	24	24
Sensibilidade corneal central (cm)	2,7 ± 0,5*	5,8 ± 0,1	5,9 ± 0,1
Densidade de DCs (cél./mm ²)	147,4 ± 33,9*	120,1 ± 21,2*	23,0 ± 3,6
Densidade de troncos principais (µm/mm ²)	4.951,0 ± 662,9*	8.327,0 ± 474,9*	10.364,5 ± 355,6
Densidade de ramos secundários (µm/mm ²)	4.101,6 ± 538,7*	6.521,7 ± 681,0*	12.486,9 ± 522,1
Densidade de nervos totais (µm/mm ²)	9.052,6 ± 1151,4*	14.959,8 ± 903,2*	22.851,4 ± 661,4
Número de troncos principais (n/imagem)	2,4 ± 0,3*	3,8 ± 0,3	4,4 ± 0,2
Número de ramos secundários (n/imagem)	3,4 ± 0,7*	8,2 ± 1,1*	22,2 ± 1,2
Número de nervos totais (n/imagem)	5,8 ± 0,9*	11,9 ± 1,2*	26,6 ± 1,2

Valores expressos por suas médias ± erro padrão da média.

* Estatisticamente significante em relação ao grupo controle ($p < 0,001$).

O teste da sensibilidade corneal central revelou uma marcada redução no olho afetado com uma média de 2,7 cm ($\pm 0,5$ cm; $p < 0,001$) em comparação ao olho contralateral 5,8 cm ($\pm 0,1$ cm) e grupo controle 5,9 cm ($\pm 0,1$ cm).

A análise quantitativa das DCs em pacientes com HZO revelou densidade aumentada em ambos os olhos, olho afetado 147,4 células por mm² ($\pm 33,9$; $p = 0,001$) e olho contralateral 120,1 ($\pm 21,2$; $p = 0,001$), em relação ao grupo controle 23,0 ($\pm 3,6$). Esses resultados podem ser observados no Gráfico 1. As células dendríticas foram identificadas principalmente entre 50 µm e 70 µm em proximidade com plexo nervoso sub-basal. Morfologicamente, as DCs foram caracterizadas por células grandes e hiper-reflectivas com longos prolongamentos - Figura 7. Após categorizar os pacientes em relação à lesão corneal, não foi encontrada nenhuma diferença estatística ($p = 0,856$). Os valores da densidade de DCs nos pacientes com HZO em

relação aos subgrupos podem ser observados no Gráfico 2. Todavia, uma alta densidade de células dendríticas foi evidenciada em pacientes que não apresentavam lesão direta corneal.

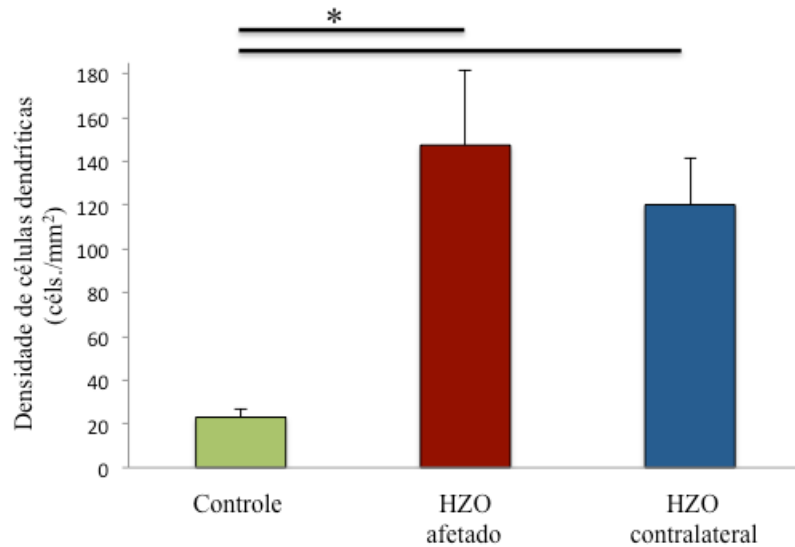


Gráfico 1: resultado da densidade de células dendríticas em pacientes com HZO e controle. As barras representam erro padrão da média. (* Estatisticamente significantes em comparação ao grupo controle)

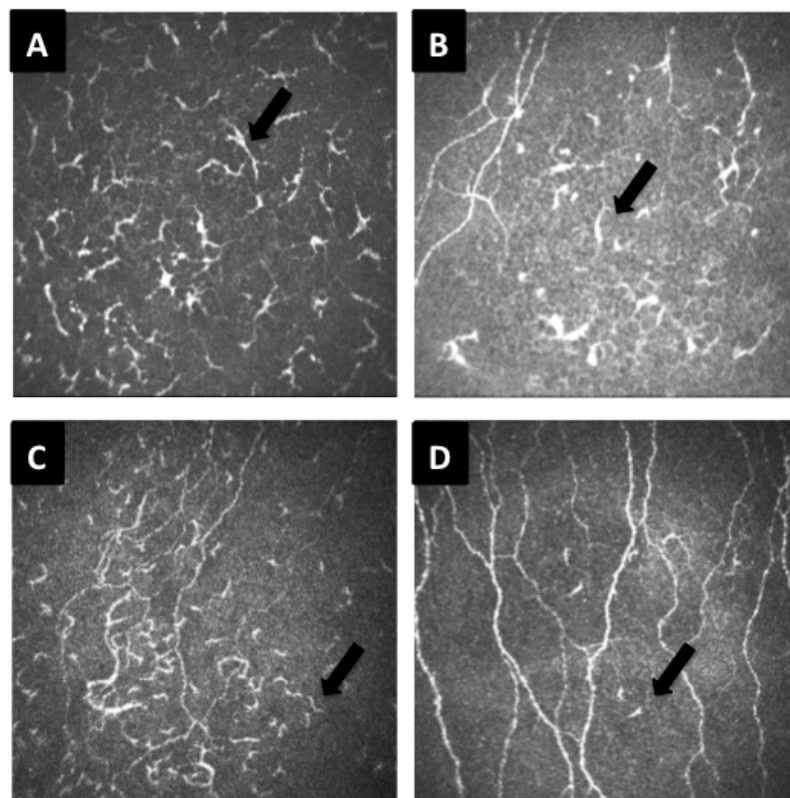


Figura 7: Imagens representativas de pacientes e grupo controle. (A-D) Imagens captadas pelo microscópio confocal (HRT/RCM) evidenciando as células dendríticas; (A-B) olho afetado com o aumento da densidade e no tamanho das células dendríticas; (C) olho contralateral; (D) controle. (Seta preta evidencia as células dendríticas)

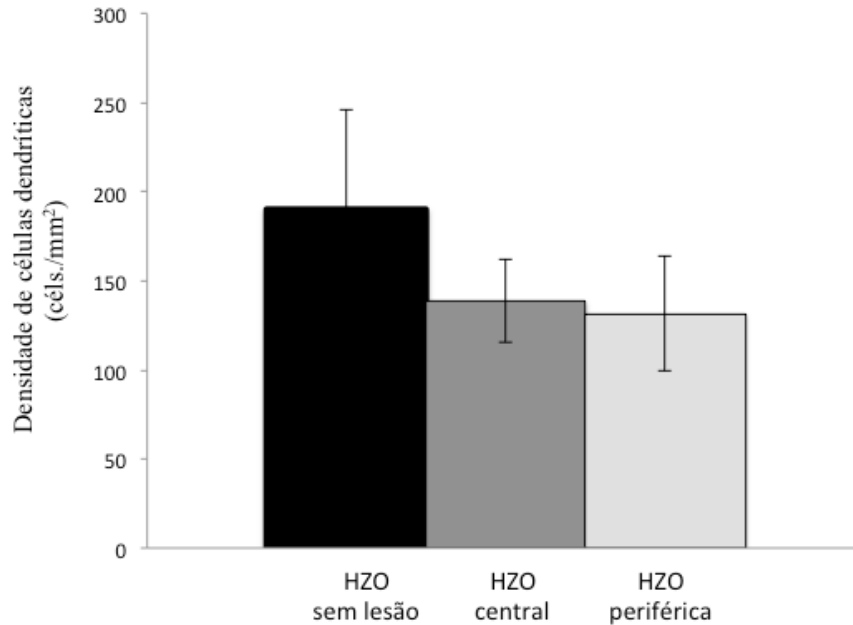


Gráfico 2: resultado da densidade de células dendríticas em pacientes com HZO nos subgrupos de lesão corneal. (As barras representam erro padrão da média)

Os olhos afetados e contralaterais de pacientes com HZO apresentaram uma redução importante da camada nervosa sub-basal. As alterações podem ser observadas nas imagens da microscopia confocal na Figura 8. Em súmula, a densidade de nervos totais ($9.052,6 \pm 1.151,8 \mu\text{m}/\text{mm}^2$ olho afetado; $14.959,8 \pm 903,2$ olho contralateral; e $22.851,4 \pm 661,4$ controle; $p < 0,001$), número de nervos totais ($5,8 \pm 0,9$ n/imagem; $11,9 \pm 1,2$; e $26,6 \pm 1,2$; $p < 0,001$), número de troncos principais ($2,4 \pm 0,3$; $3,8 \pm 0,3$; e $4,4 \pm 0,2$; $p < 0,001$ apenas para olho afetado *vs.* controle) e números de ramos secundários ($3,4 \pm 0,7$; $8,2 \pm 1,1$; e $22,2 \pm 1,2$; $p < 0,001$) estavam reduzidos em comparação com o grupo controle. Esses resultados podem ser observados nos Gráficos 3 e 4.

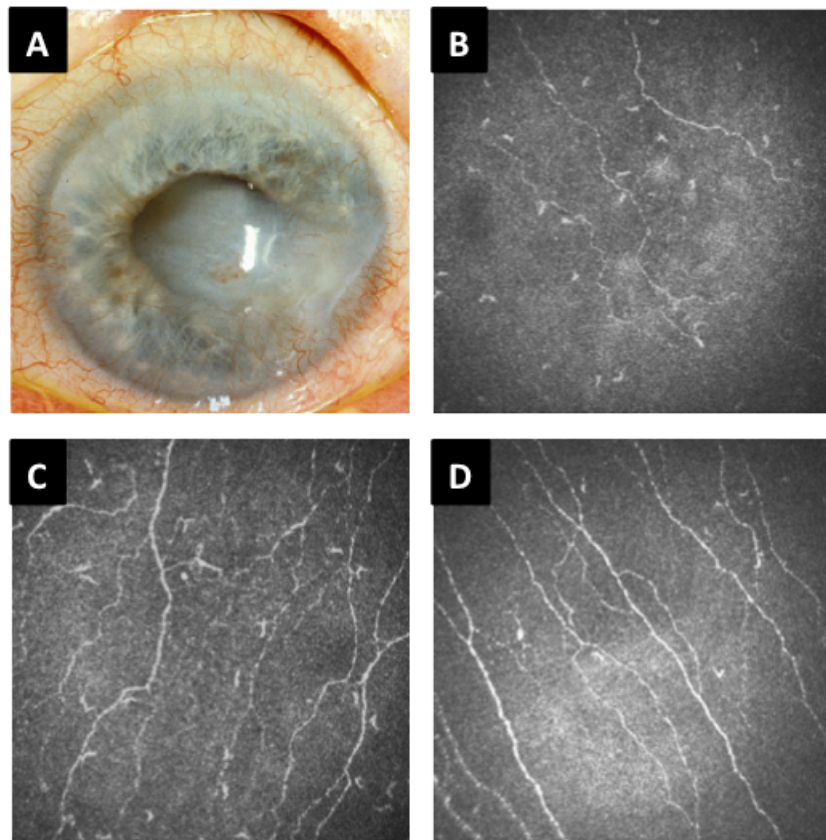


Figura 8: imagens representativas de pacientes e grupo controle. (A) Foto biomicroscópica do segmento anterior evidenciando uma cicatriz corneal na região central em olho afetado. (B-D) Imagens captadas pelo microscópio confocal (RCM-HRT); (B) olho afetado com importante diminuição do plexo nervoso sub-basal, (C) olho contralateral e (D) olho do grupo controle.

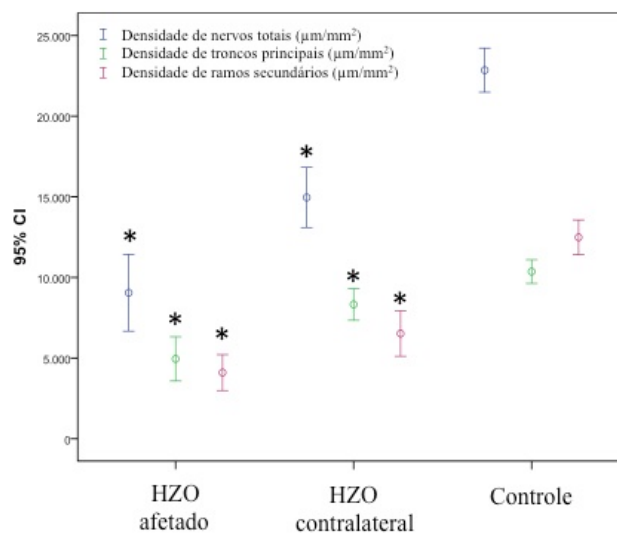


Gráfico 3: box-plot da quantificação da densidade do plexo nervoso sub-basal em pacientes com HZO e controle. *Estatisticamente significantes em comparação ao grupo controle.

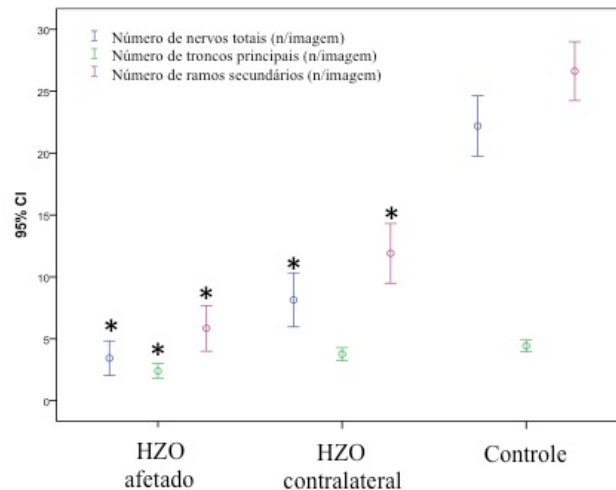


Gráfico 4: box-plot da quantificação do número de fibras do plexo nervoso sub-basal em pacientes com HZO e controle. * Estatisticamente significantes em comparação ao grupo controle.

Os resultados encontrados para a densidade de nervos totais ($12.9991,3 \pm 1.044,9 \mu\text{m}/\text{mm}^2$; $7.798,4 \pm 1.772,4$; e $9.411,8 \pm 1.843,0$; $p=0,368$), número de nervos totais ($8,1 \pm 1,3 \text{ n/imagem}$; $5,5 \pm 1,5$; e $5,6 \pm 1,3$; $p=0,648$), número de troncos principais ($3,4 \pm 0,5$; $2,0 \pm 0,4$; e $2,6 \pm 0,5$; $p=0,267$) e número de ramos secundários ($4,7 \pm 1,2$; $3,4 \pm 1,2$; e $3,0 \pm 0,8$; $p=0,777$) respectivamente para os grupos sem lesão, central e periférica não foram estatisticamente diferentes. Interessantemente, pacientes com lesão corneal apresentaram maior diminuição das fibras nervosas.

Uma correlação negativa foi observada entre a densidade de DCs e o plexo nervoso sub-basal, destacando-se para a densidade de nervos totais, número de nervos totais e número de ramos secundários ($R=-0,43$; $p<0,001$). No Gráfico 5 é demonstrado a correlação entre a redução da densidade de nervos totais do plexo sub-basal e o aumento da densidade das DCs.

Os parâmetros avaliados pela LCM apresentaram uma correlação positiva com a redução dos valores obtidos pela estesiometria. Particularmente, a sensibilidade corneal apresentou correlação com a densidade de nervos totais ($R=0,63$; $p<0,001$), número de nervos totais ($R=0,55$; $p<0,001$), número de troncos principais ($R=0,56$; $p<0,001$) e números de ramos secundários ($R=0,51$; $p<0,001$). A correlação entre a sensibilidade corneal e a densidade de nervos totais pode ser evidenciada no Gráfico 6.

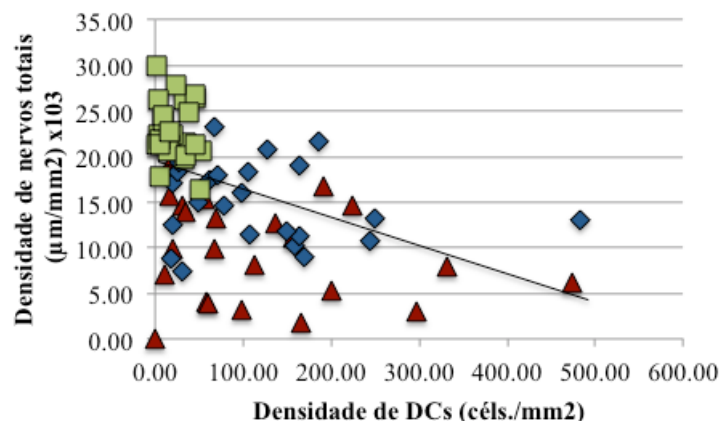


Gráfico 5: gráfico de dispersão demonstrando a correlação negativa entre a DCs e PNS ($R=-0,43$; $p<0,001$)

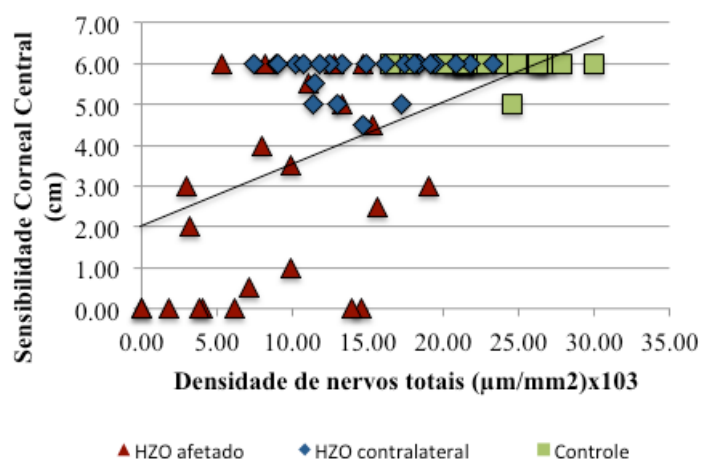


Gráfico 6: gráfico de dispersão demonstrando a correlação positiva entre PNS e sensibilidade corneal ($R=0,63$; $p<0,001$).

Para identificar um ponto de corte foi empregada a metodologia de curva ROC para a densidade de nervos totais, haja vista a boa correlação obtida com esse parâmetro. Foi utilizada como padrão ouro a variável sensibilidade corneal, sendo considerados alterados níveis inferiores a 5,5 cm. Dessa forma podem ser classificados como sensibilidade reduzida os pacientes que apresentaram níveis inferiores a $16.067,4 \mu\text{m}/\text{mm}^2$ para a densidade de nervos totais com uma sensibilidade de 95% e especificidade de 87%. O modelo ROC para esse parâmetro é apresentado no Gráfico 7.

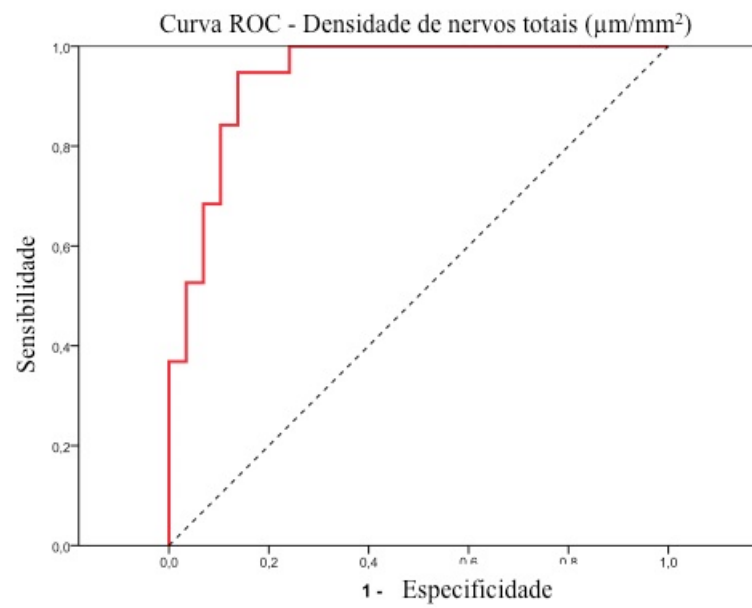


Gráfico 7: curva ROC para sensibilidade corneal e densidade de nervos totais.

5 DISCUSSÃO

Herpes zoster oftálmico é uma doença debilitante que pode acarretar acometimento visual. O exame clínico da biomicroscopia e estesiometria da córnea é capaz de determinar, de maneira subjetiva, a presença de inflamação e a perda da sensibilidade corneal. Esse estudo foi realizado em 24 pacientes com HZO unilateral e demonstra o uso de uma técnica não invasiva de microscopia confocal a laser. Os dados obtidos revelam um aumento da presença de células dendríticas com consequente redução do plexo nervoso sub-basal em ambos os olhos. Até a presente data, a única publicação sobre o assunto utilizando um confocal a laser consiste de um relato de caso que qualitativamente identificou o aumento de células inflamatórias e a redução de fibras nervosas no olho afetado de um paciente.⁽⁴³⁾ Recentemente, houve publicação utilizando um confocal de varredura por fenda que demonstrou alterações bilaterais da camada nervosa em HZO.⁽⁴²⁾ Entretanto, a microscopia confocal a laser apresenta resolução axial superior (1 μ vs. 25 μ m) permitindo a avaliação de células imunológicas e fornecendo mais detalhes sobre o plexo nervoso sub-basal.⁽¹⁷⁰⁾

Estudos têm demonstrado a importância do sistema imunológico em infecções por herpes zoster. Em 65 pacientes com herpes zoster, após submetidos a biopsia cutânea, restaram evidenciados pela histopatologia infiltrados com linfócitos T CD30+ e CD56+.⁽¹⁴²⁾ Tsukahara⁽¹⁴³⁾ demonstrou a presença de células HLA-DR⁺ na epiderme de pacientes, assim como células de Langerhans. Neste estudo, a densidade de células de Langerhans estava levemente aumentada. Ao contrário do estudo anterior, Huch et al⁽¹²⁾ demonstraram baixa concentração de células de Langerhans no tecido cutâneo infectado pelo vírus da varicela zoster, entretanto um alto influxo de plasmócitos. Ademais, não foi encontrada diferença significativa para a presença de células dendríticas caracterizadas pela expressão dos marcadores DC-SIGN ou DC-LAMP e CD83 em comparação com o tecido cutâneo normal. As células de Langerhans e plasmócitos encontradas na pele infectada eram positivas para a presença de antígenos contra o VZV.⁽¹²⁾

Análises imuno-histoquímicas realizadas em animais comprovaram a presença de células dendríticas na córnea. As células dendríticas fazem parte de um sistema de vigilância contínuo, monitorando os tecidos adjacentes contra estímulos externos. Estudos comprovaram que após estimulação essas células maturam; tal processo é caracterizado pela expressão do marcador MHC-II.⁽⁷⁾ Além disso, a presença de partículas virais foi encontrada na córnea através da cultura de raspado de úlceras de pacientes com HZO em atividade.⁽¹⁵³⁾ Sabendo-se que a função primordial da córnea é ser um meio transparente de entrada de estímulos para a função visual, raspados e biópsias são procedimentos invasivos e com potencial dano à visão. Dessa forma, a microscopia confocal *in vivo* surge como uma técnica não invasiva capaz de detectar células do sistema imunológico na superfície ocular, além de fornecer conhecimento *in vivo* sobre a fisiopatologia da córnea. Células dendríticas são caracterizadas como células grandes com processos longos ou como células pequenas sem processos, supostamente indicando fenótipos de células maduras ou imaturas.⁽¹⁷¹⁾ Detectou-se nos pacientes com HZO um aumento significativo na densidade de células dendríticas nos olhos afetados ($147,4 \pm 33,9$ céls./mm²; $p=0,001$) bem como nos contralaterais clinicamente normais ($120,1 \pm 21,2$ céls./mm²; $p=0,001$) em comparação com o grupo controle ($23,0 \pm 3,6$ céls./mm²).

O aumento de células dendríticas foi documentado em outras condições inflamatórias da superfície ocular, como pterígio, síndrome de Stevens-Johnson e necrólise epidérmica tóxica, síndrome do olho seco e após cirurgia refrativa.⁽¹⁷²⁻¹⁷⁶⁾ A densidade do infiltrado de células imunológicas nos pacientes com HZO é similar a outras condições como ceratoconjuntivite vernal e rejeição no transplante de córnea. Infecções agudas, como úlceras bacterianas, fúngicas e por ameba, apresentam um importante aumento, evidenciando densidade de células dendríticas acima de 200 céls./mm².^(36,172) É provável que a diferença entre as densidades de células dendríticas observadas entre os pacientes com HZO e outras ceratites infecciosas se dá em razão da cronicidade comumente observada na infecção por zoster. Os pacientes avaliados neste estudo apresentaram um tempo médio de 57 meses entre o exame e o início da infecção. Apesar de ser um quadro crônico, a densidade de células dendríticas ainda se encontrava acima dos valores normais. A presença de infecção subclínica é uma possível justificativa para o persistente aumento das

DCs.^(135,136) Dessa forma, é importante monitorar a resposta imunológica local em indivíduos portadores de HZO com um método que permita avaliar as variações na densidade de células imunes na córnea, tal como a microscopia confocal a laser *in vivo*.

A córnea é o tecido do corpo humano com maior densidade de fibras nervosas. O suprimento nervoso é feito por ramos terminais da divisão oftálmica do nervo trigêmio.⁽⁸¹⁾ O plexo nervoso sub-basal da córnea foi caracterizado pela microscopia confocal como fibras hiper-refletivas que apresentam padrões de ramificações e conexões. Patel e McGhee, usando um modelo de reconstrução em duas dimensões, descreveram um ápice organizado de fibras no quadrante nasal inferior na região sub-basal da córnea.⁽⁸⁸⁾ A densidade de fibras nervosas em indivíduos normais varia de acordo com o método utilizado. Valores encontrados na literatura variam de 5.534 $\mu\text{m}/\text{mm}^2$ a 10.658 $\mu\text{m}/\text{mm}^2$ através de imagens obtidas pela microscopia confocal de varredura Tandem e de varredura por fenda, respectivamente.⁽¹⁶⁹⁾ No presente estudo, a microscopia confocal a laser revelou uma importante diminuição do plexo nervoso sub-basal da córnea em ambos os olhos de pacientes com HZO unilateral. Em resumo, a redução do número e da densidade de ramos secundários e de nervos totais nos olhos afetados foi de: ramos secundários: $3,4 \pm 0,7$ e $4.101,6 \pm 538,7$; nervos totais: $5,84 \pm 0,9$ e $9.052,6 \pm 1.151,4$. Enquanto a redução nos olhos contralaterais foi de: ramos secundários: $8,2 \pm 1,1$ e $6.521,7 \pm 681,0$; nervos totais: $11,9 \pm 1,2$ e $14.959,8 \pm 903,2$. Já o grupo controle demonstrou as seguintes medidas para os ramos secundários: $22,2 \pm 1,2$ e $12.486,9 \pm 522,1$ e nervos totais: $26,6 \pm 1,2$ e $22.851,4 \pm 661,4$. No presente estudo sugere-se que as alterações bilaterais da camada nervosa sub-basal da córnea em um acometimento unilateral são compatíveis com os relatos de ceratite por herpes simples e por zoster publicados por Hamrah et al.^(29,42) As diferenças entre os valores encontrados nesses estudos podem ser atribuídas ao tipo de método utilizado para aquisição da imagem, haja vista a patente diferença entre os equipamentos utilizados, sendo certo que o microscópio confocal a laser apresenta maior capacidade de demonstrar estruturas da superfície ocular.

O teste da sensibilidade corneal é um método subjetivo para avaliar a função da inervação no tecido corneal.⁽¹¹⁶⁾ Para esse estudo nós utilizamos o estesiômetro de

Cochet-Bonnet. Esse método é amplamente utilizado na oftalmologia tanto para pesquisa quanto para avaliação clínica. A sensibilidade corneal é mediada por fibras delta-A e C, originadas do gânglio trigêmeo. Essas fibras despolarizam e liberam impulsos elétricos em resposta a estímulos mecânicos, térmicos e químicos sobre a superfície ocular.⁽¹⁰⁵⁾ Uma correlação positiva ($R=0,63$; $p<0.0001$) foi encontrada entre a densidade de nervos totais e a sensibilidade corneal. A correlação encontrada nessa série parece ser mais forte do que previamente publicada.⁽⁴²⁾ A redução do plexo nervoso e sua relação com a sensibilidade corneana foi descrita em infecções agudas da córnea e em pacientes com ceratopatia bolhosa.^(29,36) Usando um modelo de curva ROC foi encontrado sensibilidade de 95% e especificidade de 87% para detectar a redução da função do plexo nervoso sub-basal através da microscopia confocal. A partir desse modelo calculamos ser necessária uma redução de nervos totais maior que 16.067,4 $\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ para perda da sensibilidade.

Os nervos corneais têm papel fundamental na manutenção da homeostasia da superfície ocular. Estudos imuno-histoquímicos revelaram a presença de neurotransmissores, especificamente substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, neuropeptídeo Y, peptídeo vasoativo intestinal, galanina, metionina-encefalina, catecolaminas e acetilcolina na córnea. A substância P é liberada por nervos corneais e atua modulando a cicatrização corneal em ação sinergista com o fator de crescimento insulina símile-I (IGF-I).⁽²²⁾ Essa propriedade da substância P foi aplicada à clínica após extração de sequências da sua molécula e do IGF-I, criando um colírio para promover a reepitelização em pacientes com ceratopatia neurotrófica.⁽²³⁻²⁵⁾

Apesar de as conexões entre os neurônios que inervam áreas contralaterais não estarem bem estabelecidas, modelos animais demonstraram alterações bilaterais em relação ao padrão de dor, alterações anatômicas e função dos terminais nociceptivos da pele após dano a fibras nervosas unilaterais.⁽⁹¹⁻⁹⁴⁾ Acredita-se que um efeito em espelho é responsável por induzir alterações bilaterais sugerindo a participação de circuitos centrais no cérebro.⁽⁹⁵⁾ Oaklander et al⁽¹³⁹⁾ através de biópsias de tecido cutâneo, evidenciaram alterações bilaterais em pacientes com quadro de neuralgia persistente após herpes zoster, sendo o comprometimento contralateral menos grave. Resultados estes semelhantes aos encontrados no presente

estudo. Uma possível explicação para esse fenômeno é a ocorrência de projeções diretas do nervo trigêmeo a áreas bilaterais do cérebro e da medula.^(89,90)

Outra possível justificativa para a bilateralidade dos achados deste estudo é a interação entre o sistema imune e o nervoso. Recentes pesquisas têm postulado que a interação entre os dois sistemas é feita por um eixo neuroendócrino, havendo liberação de citocinas e interleucinas produzidas por células imunológicas e captadas por receptores contidos nas fibras nervosas. Esse vínculo constitui uma importante alça para controle da resposta imune aos micro-organismos.⁽³⁵⁾ Essa interação entre os sistemas foi documentada através da liberação de neuropeptídios e da modulação de processos inflamatórios no intestino de modelos animais.⁽³²⁻³⁴⁾ Namavari et al ⁽⁵⁵⁾ publicaram recentemente a relação entre a glicoproteína semaforina classe 7A (Sema7A; ancorada por glicosilfosfolinositol [GPI] à membrana celular) e o influxo de células inflamatórias na córnea. Em 2011, Cruzat et al ⁽³⁶⁾ demonstraram uma correlação negativa entre a quantidade de células inflamatórias e a densidade do plexo nervoso sub-basal em ceratites infecciosas agudas. O presente estudo demonstra pela primeira vez uma correlação negativa ($R=-0,43$; $p=0,0001$) entre as células dendríticas e o plexo nervoso sub-basal da córnea em pacientes com HZO crônico.

Na avaliação histopatológica de 21 casos de HZ unilateral os achados mais comuns foram necrose hemorrágica e infiltrados inflamatórios no lado acometido, não evidenciando alteração contralateral.⁽¹³⁷⁾ Entretanto, Watson et al ⁽¹³⁸⁾ demonstraram pela primeira vez anormalidades bilaterais na raiz sensitiva identificada pela perda de axônios após HZ unilateral. De acordo com o exposto por Nagashima, partículas virais foram encontradas no gânglio trigeminal, e axônios, após infecção aguda pelo vírus da varicela zoster.⁽⁶⁾ Juntos, esses relatos sugerem uma distribuição retrógrada do vírus da varicela zoster através do gânglio trigeminal para o cérebro e medula, podendo causar dano ao correspondente núcleo mesencefálico sensorial.⁽⁶⁾ Por consequência, poderia se esperar uma redução à camada nervosa contralateral da córnea. É provável que o estímulo para o aumento de células inflamatórias no olho contralateral seja decorrente de partículas virais encontradas no gânglio dorsal contralateral ou do dano causado às fibras nervosas.

Pelo exposto, uma interação neurogênica é proposta como justificativa para os achados bilaterais do presente estudo.

Uma limitação do presente estudo é o fato de a microscopia confocal a laser apenas identificar células imunes a partir da sua morfologia. Como já relataram Guthoff et al⁽¹⁷⁷⁾ essa técnica não permite ao examinador distinguir certas características celulares, tais como núcleos ou grânulos. Mesmo assim, o aspecto morfológico, diâmetro e localização da célula auxiliam na leitura das imagens obtidas. Ademais, a microscopia confocal permite imagens coronais que representam uma secção da córnea de $400 \times 400 \mu\text{m}$ e uma área de $160.000 \mu\text{m}^2$. Outro aspecto a ser ressaltado é que esse estudo avaliou a região central da córnea, sem extrapolar para as outras áreas.

Em resumo, o presente estudo analisa *in vivo* e quantitativamente células imunes corneais, assim como a estrutura e a função das fibras nervosas da córnea. Os resultados evidenciam uma interação entre os sistemas imunológico e neurológico, haja vista a correlação negativa entre as células dendríticas e a densidade das fibras nervosas totais. Além disso, identificamos uma correlação positiva entre o plexo nervoso sub-basal e a redução da sensibilidade corneal com alto grau de especificidade obtida no modelo ROC utilizado. Como descrito, é provável que as medidas quantitativas das células imunológicas e do plexo nervoso corneal propiciem uma melhor metodologia para avaliar os pacientes, assim como permitem acompanhar a resposta ao tratamento indicado, servindo ainda para detectar possíveis complicações. Mais estudos são necessários para validar os parâmetros propostos com achados clínicos.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, com a metodologia utilizada, conclui-se que a microscopia confocal a laser é um instrumento que permite avaliar *in vivo* alterações imunológicas e do plexo nervoso sub-basal da córnea. No presente estudo foi detectado aumento da densidade de células dendríticas, redução de fibras nervosas sub-basal e da sensibilidade corenal em ambos os olhos de pacientes com herpes zoster oftálmico unilateral.

REFERÊNCIAS

1. Goins KM. New insights into the diagnosis and treatment of neurotrophic keratopathy. *Ocul Surf.* 2005;3(2):96-110.
2. MacMahon EM. Concomitant bilateral herpes zoster ophthalmicus. *The Lancet infectious diseases.* 2003;3(1):12.
3. Nakamura M, Tanabe M, Yamada Y, Azumi A. Zoster sine herpete with bilateral ocular involvement. *Am J Ophthalmol.* 2000;129(6):809-10.
4. Yau TH, Butrus SI. Presumed bilateral herpes zoster ophthalmicus in an AIDS patient: a case report. *Cornea.* 1996;15(6):633-4.
5. Nath R. Bilateral and multifocal generalized eruptions in herpes zoster ophthalmicus: case report. *Indian J Ophthalmol.* 1996;44(1):40-2.
6. Nagashima K, Nakazawa M, Endo H. Pathology of the human spinal ganglia in varicella-zoster virus infection. *Acta Neuropathol.* 1975;33(2):105-17.
7. Hamrah P, Liu Y, Zhang Q, Dana MR. The corneal stroma is endowed with a significant number of resident dendritic cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(2):581-9.
8. Hamrah P, Dana MR. Corneal antigen-presenting cells. *Chemical immunology and allergy.* 2007;92:58-70.
9. Abendroth A, Morrow G, Cunningham AL, Slobedman B. Varicella-zoster virus infection of human dendritic cells and transmission to T cells: implications for virus dissemination in the host. *J Virol.* 2001;75(13):6183-92.
10. Morrow G, Slobedman B, Cunningham AL, Abendroth A. Varicella-zoster virus productively infects mature dendritic cells and alters their immune function. *J Virol.* 2003;77(8):4950-9.
11. Abendroth A, Kinchington PR, Slobedman B. Varicella zoster virus immune evasion strategies. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2010;342:155-71.
12. Huch JH, Cunningham AL, Arvin AM, Nasr N, Santegoets SJ, Slobedman E, et al. Impact of varicella-zoster virus on dendritic cell subsets in human skin during natural infection. *J Virol.* 2010;84(8):4060-72.
13. He J, Bazan HE. Mapping the Nerve Architecture of Diabetic Human Corneas. *Ophthalmology.* 2012.

14. Turuwhenua JT, Patel DV, McGhee CN. Fully automated montaging of laser scanning in vivo confocal microscopy images of the human corneal sub-basal nerve plexus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012.
15. Tervo T, Palkama A. Sympathetic nerves to the rat cornea. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1976;54(1):75-84.
16. Sweeney DF, Vannas A, Holden BA, Tervo T, Telaranta T. Evidence for sympathetic neural influence on human corneal epithelial function. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1985;63(2):215-20.
17. Morgan C, DeGroat WC, Jannetta PJ. Sympathetic innervation of the cornea from the superior cervical ganglion. An HRP study in the cat. *J Auton Nerv Syst*. 1987;20(2):179-83.
18. Marfurt CF, Kingsley RE, Echtenkamp SE. Sensory and sympathetic innervation of the mammalian cornea. A retrograde tracing study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1989;30(3):461-72.
19. Jones MA, Marfurt CF. Peptidergic innervation of the rat cornea. *Exp Eye Res*. 1998;66(4):421-35.
20. Marfurt CF, Jones MA, Thrasher K. Parasympathetic innervation of the rat cornea. *Exp Eye Res*. 1998;66(4):437-48.
21. Muller LJ, Marfurt CF, Kruse F, Tervo TM. Corneal nerves: structure, contents and function. *Exp Eye Res*. 2003;76(5):521-42.
22. Nishida T. Neurotrophic mediators and corneal wound healing. *Ocul Surf*. 2005;3(4):194-202.
23. Chikama T, Fukuda K, Morishige N, Nishida T. Treatment of neurotrophic keratopathy with substance-P-derived peptide (FGLM) and insulin-like growth factor I. *Lancet*. 1998;351(9118):1783-4.
24. Yamada N, Matsuda R, Morishige N, Yanai R, Chikama TI, Nishida T, et al. Open clinical study of eye-drops containing tetrapeptides derived from substance P and insulin-like growth factor-1 for treatment of persistent corneal epithelial defects associated with neurotrophic keratopathy. *Br J Ophthalmol*. 2008;92(7):896-900.
25. Nishida T. Translational research in corneal epithelial wound healing. *Eye Contact Lens*. 36(5):300-4.

26. Bonini S, Lambiase A, Rama P, Caprioglio G, Aloe L. Topical treatment with nerve growth factor for neurotrophic keratitis. *Ophthalmology*. 2000;107(7):1347-51; discussion 51-2.
27. Davis EA, Dohlman CH. Neurotrophic keratitis. *Int Ophthalmol Clin*. 2001;41(1):1-11.
28. Bonini S, Rama P, Olzi D, Lambiase A. Neurotrophic keratitis. *Eye (Lond)*. 2003;17(8):989-95.
29. Hamrah P, Cruzat A, Dastjerdi MH, Zheng L, Shahatit BM, Bayhan HA, et al. Corneal sensation and subbasal nerve alterations in patients with herpes simplex keratitis: an in vivo confocal microscopy study. *Ophthalmology*. 2010;117(10):1930-6.
30. Ghaznawi N, Viridi A, Dayan A, Hammersmith KM, Rapuano CJ, Laibson PR, et al. Herpes zoster ophthalmicus: comparison of disease in patients 60 years and older versus younger than 60 years. *Ophthalmology*. 2011;118(11):2242-50.
31. Sanjay S, Huang P, Lavanya R. Herpes zoster ophthalmicus. Current treatment options in neurology. 2011;13(1):79-91.
32. McGillis JP, Mitsuhashi M, Payan DG. Immunomodulation by tachykinin neuropeptides. *Ann N Y Acad Sci*. 1990;594:85-94.
33. Sirinek LP, O'Dorisio MS. Modulation of immune function by intestinal neuropeptides. *Acta Oncol*. 1991;30(4):509-17.
34. Schauenstein K, Rinner I, Felsner P, Mangge H. Bidirectional interaction between immune and neuroendocrine systems. An experimental approach. *Padiatr Padol*. 1992;27(4):81-5.
35. Sternberg EM. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nature reviews Immunology*. 2006;6(4):318-28.
36. Cruzat A, Witkin D, Baniyadi N, Zheng L, Ciolino JB, Jurkunas UV, et al. Inflammation and the Nervous System: The Connection in the Cornea in Patients with Infectious Keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011.
37. Al-Aqaba M, Alomar T, Lowe J, Dua HS. Corneal nerve aberrations in bullous keratopathy. *Am J Ophthalmol*. 2011;151(5):840-9.

38. Al-Aqaba MA, Faraj L, Fares U, Otri AM, Dua HS. The morphologic characteristics of corneal nerves in advanced keratoconus as evaluated by acetylcholinesterase technique. *Am J Ophthalmol*. 2011;152(3):364-76.
39. Neira-Zalentein W, Holopainen JM, Tervo TM, Borrás F, Acosta MC, Belmonte C, et al. Corneal sensitivity in diabetic patients subjected to retinal laser photocoagulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(8):6043-9.
40. Ricaud X, Rozenbaum JP, Landowski S, Baudouin C, Labbe A. Abnormal corneal nerves in a patient with Lyme disease. *Eye (Lond)*. 2011;25(11):1524-5.
41. Rosenberg ME, Tervo TM, Muller LJ, Moilanen JA, Vesaluoma MH. In vivo confocal microscopy after herpes keratitis. *Cornea*. 2002;21(3):265-9.
42. Hamrah P, Cruzat A, Dastjerdi MH, Pruss H, Zheng L, Shahatit BM, et al. Unilateral Herpes Zoster Ophthalmicus Results in Bilateral Corneal Nerve Alteration: An In Vivo Confocal Microscopy Study. *Ophthalmology*. 2012.
43. Patel DV, McGhee CN. Laser scanning in vivo confocal microscopy demonstrating significant alteration of human corneal nerves following herpes zoster ophthalmicus. *Arch Neurol*. 2010;67(5):640-1.
44. Medawar PB. Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol*. 1948;29(1):58-69.
45. Streilein JW. Ocular immune privilege and the Faustian dilemma. The Proctor lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996;37(10):1940-50.
46. Niederkorn J, Streilein JW, Shaddock JA. Deviant immune responses to allogeneic tumors injected intracamerally and subcutaneously in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1981;20(3):355-63.
47. Streilein JW. Immune privilege as the result of local tissue barriers and immunosuppressive microenvironments. *Curr Opin Immunol*. 1993;5(3):428-32.
48. Ecoiffier T, Sadovnikova A, Yuen D, Chen L. Conjunctival lymphatic response to corneal inflammation in mice. *J Ophthalmol*. 2012;953187.
49. Nakao S, Hafezi-Moghadam A, Ishibashi T. Lymphatics and lymphangiogenesis in the eye. *Journal of ophthalmology*. 2012;783163.
50. Szliter EA, Lighvani S, Barrett RP, Hazlett LD. Vasoactive intestinal peptide balances pro- and anti-inflammatory cytokines in the *Pseudomonas aeruginosa*-

- infected cornea and protects against corneal perforation. *J Immunol.* 2007;178(2):1105-14.
51. Berger EA, McClellan SA, Barrett RP, Hazlett LD. VIP promotes resistance in the *Pseudomonas aeruginosa*-infected cornea by modulating adhesion molecule expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(11):5776-82.
 52. Taylor AW, Yee DG, Streilein JW. Suppression of nitric oxide generated by inflammatory macrophages by calcitonin gene-related peptide in aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39(8):1372-8.
 53. Taylor AW, Yee DG. Somatostatin is an immunosuppressive factor in aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(6):2644-9.
 54. Twardy BS, Channappanavar R, Suvas S. Substance P in the corneal stroma regulates the severity of herpetic stromal keratitis lesions. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(12):8604-13.
 55. Namavari A, Chaudhary S, Ozturk O, Chang JH, Yco L, Sonawane S, et al. Semaphorin 7a Links Nerve Regeneration and Inflammation in the Cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012.
 56. Streilein JW, Toews GB, Bergstresser PR. Corneal allografts fail to express Ia antigens. *Nature.* 1979;282(5736):326-7.
 57. Whitsett CF, Stulting RD. The distribution of HLA antigens on human corneal tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1984;25(5):519-24.
 58. Treseler PA, Sanfilippo F. The expression of major histocompatibility complex and leukocyte antigens by cells in the rat cornea. *Transplantation.* 1986;41(2):248-52.
 59. Streilein JW, Arancibia-Caracamo C, Osawa H. The role of minor histocompatibility alloantigens in penetrating keratoplasty. *Dev Ophthalmol.* 2003;36:74-88.
 60. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998;392(6673):245-52.
 61. Thomson AW, Lu L. Dendritic cells as regulators of immune reactivity: implications for transplantation. *Transplantation.* 1999;68(1):1-8.
 62. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:767-811.

63. Gillette TE, Chandler JW, Greiner JV. Langerhans cells of the ocular surface. *Ophthalmology*. 1982;89(6):700-11.
64. McLeish W, Rubsamen P, Atherton SS, Streilein JW. Immunobiology of Langerhans cells on the ocular surface. II. Role of central corneal Langerhans cells in stromal keratitis following experimental HSV-1 infection in mice. *Reg Immunol*. 1989;2(4):236-43.
65. Jager MJ. Corneal Langerhans cells and ocular immunology. *Reg Immunol*. 1992;4(3):186-95.
66. Niederkorn JY. The immune privilege of corneal allografts. *Transplantation*. 1999;67(12):1503-8.
67. Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med*. 1998;338(7):436-45.
68. Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J*. 1995;9(10):899-909.
69. Zhu SN, Dana MR. Expression of cell adhesion molecules on limbal and neovascular endothelium in corneal inflammatory neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40(7):1427-34.
70. Dana MR, Qian Y, Hamrah P. Twenty-five-year panorama of corneal immunology: emerging concepts in the immunopathogenesis of microbial keratitis, peripheral ulcerative keratitis, and corneal transplant rejection. *Cornea*. 2000;19(5):625-43.
71. Dekaris IJ, Yamada JJ, Streilein WJ, Dana RM. Effect of topical interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) on corneal allograft survival in presensitized hosts. *Curr Eye Res*. 1999;19(5):456-9.
72. Qian Y, Dekaris I, Yamagami S, Dana MR. Topical soluble tumor necrosis factor receptor type I suppresses ocular chemokine gene expression and rejection of allogeneic corneal transplants. *Arch Ophthalmol*. 2000;118(12):1666-71.
73. Liu Y, Hamrah P, Zhang Q, Taylor AW, Dana MR. Draining lymph nodes of corneal transplant hosts exhibit evidence for donor major histocompatibility complex (MHC) class II-positive dendritic cells derived from MHC class II-negative grafts. *J Exp Med*. 2002;195(2):259-68.

74. Hamrah P, Liu Y, Zhang Q, Dana MR. Alterations in corneal stromal dendritic cell phenotype and distribution in inflammation. *Arch Ophthalmol.* 2003;121(8):1132-40.
75. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med.* 1973;137(5):1142-62.
76. Felipe CD, Gonzalez GG, Gallar J, Belmonte C. Quantification and immunocytochemical characteristics of trigeminal ganglion neurons projecting to the cornea: effect of corneal wounding. *Eur J Pain.* 1999;3(1):31-9.
77. Millodot M. A review of research on the sensitivity of the cornea. *Ophthalmic Physiol Opt.* 1984;4(4):305-18.
78. Dudek R. *High Yield Embryology*. 3rd ed: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 92-4.
79. Muller LJ, Marfurt CF, Kruse F, Tervo TM. Corneal nerves: structure, contents and function. *Exp Eye Res.* 2003;76(5):521-42.
80. Krachmer J, Mannis M, Holland E. *Cornea*. 2 ed. Philadelphia: Elsevier Mosby; 2005.
81. Oliveira-Soto L, Efron N. Morphology of corneal nerves using confocal microscopy. *Cornea.* 2001;20(4):374-84.
82. Al-Aqaba MA, Alomar T, Miri A, Fares U, Otri AM, Dua HS. Ex vivo confocal microscopy of human corneal nerves. *Br J Ophthalmol.* 94(9):1251-7.
83. Al-Aqaba MA, Fares U, Suleman H, Lowe J, Dua HS. Architecture and distribution of human corneal nerves. *Br J Ophthalmol.* 94(6):784-9.
84. Muller LJ, Pels L, Vrensen GF. Ultrastructural organization of human corneal nerves. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37(4):476-88.
85. Muller LJ, Vrensen GF, Pels L, Cardozo BN, Willekens B. Architecture of human corneal nerves. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997;38(5):985-94.
86. Grupcheva CN, Wong T, Riley AF, McGhee CN. Assessing the sub-basal nerve plexus of the living healthy human cornea by in vivo confocal microscopy. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2002;30(3):187-90.
87. Marfurt CF, Cox J, Deek S, Dvorskak L. Anatomy of the human corneal innervation. *Exp Eye Res.* 90(4):478-92.

88. Patel DV, McGhee CN. Mapping of the normal human corneal sub-Basal nerve plexus by in vivo laser scanning confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(12):4485-8.
89. Jacquin MF, Chiaia NL, Rhoades RW. Trigeminal projections to contralateral dorsal horn: central extent, peripheral origins, and plasticity. *Somatosens Mot Res*. 1990;7(2):153-83.
90. Pfaller K, Arvidsson J. Central distribution of trigeminal and upper cervical primary afferents in the rat studied by anterograde transport of horseradish peroxidase conjugated to wheat germ agglutinin. *J Comp Neurol*. 1988;268(1):91-108.
91. Oaklander AL, Brown JM. Unilateral nerve injury produces bilateral loss of distal innervation. *Ann Neurol*. 2004;55(5):639-44.
92. McLachlan EM, Janig W, Devor M, Michaelis M. Peripheral nerve injury triggers noradrenergic sprouting within dorsal root ganglia. *Nature*. 1993;363(6429):543-6.
93. Attal N, Filliatreau G, Perrot S, Jazat F, Di Giamberardino L, Guilbaud G. Behavioural pain-related disorders and contribution of the saphenous nerve in crush and chronic constriction injury of the rat sciatic nerve. *Pain*. 1994;59(2):301-12.
94. Allnatt JP, Dickson KE, Lisney SJ. Saphenous nerve injury and regeneration on one side of a rat suppresses the ability of the contralateral nerve to evoke plasma extravasation. *Neurosci Lett*. 1990;118(2):219-22.
95. Willis WD, Coggeshall RE. *Sensory Mechanisms of the Spinal Cord*. 2nd ed. New York, London: Plenum Press; 1991. 575 p.
96. Belmonte C, Giraldez F. Responses of cat corneal sensory receptors to mechanical and thermal stimulation. *J Physiol*. 1981;321:355-68.
97. Belmonte C, Gallar J, Pozo MA, Rebollo I. Excitation by irritant chemical substances of sensory afferent units in the cat's cornea. *J Physiol*. 1991;437:709-25.
98. Gallar J, Pozo MA, Tuckett RP, Belmonte C. Response of sensory units with unmyelinated fibres to mechanical, thermal and chemical stimulation of the cat's cornea. *J Physiol*. 1993;468:609-22.

99. MacIver MB, Tanelian DL. Structural and functional specialization of A delta and C fiber free nerve endings innervating rabbit corneal epithelium. *J Neurosci.* 1993;13(10):4511-24.
100. MacIver MB, Tanelian DL. Free nerve ending terminal morphology is fiber type specific for A delta and C fibers innervating rabbit corneal epithelium. *J Neurophysiol.* 1993;69(5):1779-83.
101. De Felipe C, Belmonte C. c-Jun expression after axotomy of corneal trigeminal ganglion neurons is dependent on the site of injury. *Eur J Neurosci.* 1999;11(3):899-906.
102. Belmonte C, Aracil A, Acosta MC, Luna C, Gallar J. Nerves and sensations from the eye surface. *Ocul Surf.* 2004;2(4):248-53.
103. Steen KH, Reeh PW. Sustained graded pain and hyperalgesia from harmless experimental tissue acidosis in human skin. *Neurosci Lett.* 1993;154(1-2):113-6.
104. Chen X, Belmonte C, Rang HP. Capsaicin and carbon dioxide act by distinct mechanisms on sensory nerve terminals in the cat cornea. *Pain.* 1997;70(1):23-9.
105. Belmonte C, Acosta MC, Gallar J. Neural basis of sensation in intact and injured corneas. *Exp Eye Res.* 2004;78(3):513-25.
106. Chen X, Gallar J, Belmonte C. Reduction by antiinflammatory drugs of the response of corneal sensory nerve fibers to chemical irritation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997;38(10):1944-53.
107. Beuerman RW, Schimmelpfennig B. Sensory denervation of the rabbit cornea affects epithelial properties. *Exp Neurol.* 1980;69(1):196-201.
108. Guthoff RF, Wiens H, Hahnel C, Wree A. Epithelial innervation of human cornea: a three-dimensional study using confocal laser scanning fluorescence microscopy. *Cornea.* 2005;24(5):608-13.
109. You L, Kruse FE, Volcker HE. Neurotrophic factors in the human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(3):692-702.
110. Di Marco E, Cutuli N, Guerra L, Cancedda R, De Luca M. Molecular cloning of trkE, a novel trk-related putative tyrosine kinase receptor isolated from normal human keratinocytes and widely expressed by normal human tissues. *J Biol Chem.* 1993;268(32):24290-5.

111. Barbacid M. The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol.* 1994;25(11):1386-403.
112. Barbacid M. Neurotrophic factors and their receptors. *Curr Opin Cell Biol.* 1995;7(2):148-55.
113. Lambiase A, Rama P, Bonini S, Caprioglio G, Aloe L. Topical treatment with nerve growth factor for corneal neurotrophic ulcers. *N Engl J Med.* 1998;338(17):1174-80.
114. Tan MH, Bryars J, Moore J. Use of nerve growth factor to treat congenital neurotrophic corneal ulceration. *Cornea.* 2006;25(3):352-5.
115. Cellini M, Bendo E, Bravetti GO, Campos EC. The use of nerve growth factor in surgical wound healing of the cornea. *Ophthalmic Res.* 2006;38(4):177-81.
116. Brennan NA, Bruce AS. Esthesiometry as an indicator of corneal health. *Optom Vis Sci.* 1991;68(9):699-702.
117. Feng Y, Simpson TL. Nociceptive sensation and sensitivity evoked from human cornea and conjunctiva stimulated by CO₂. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(2):529-32.
118. Acosta MC, Tan ME, Belmonte C, Gallar J. Sensations evoked by selective mechanical, chemical, and thermal stimulation of the conjunctiva and cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(9):2063-7.
119. Murphy PJ, Lawrenson JG, Patel S, Marshall J. Reliability of the non-contact corneal aesthesiometer and its comparison with the Cochet-Bonnet aesthesiometer. *Ophthalmic Physiol Opt.* 1998;18(6):532-9.
120. Golebiowski B, Papas E, Stapleton F. Assessing the sensory function of the ocular surface: implications of use of a non-contact air jet aesthesiometer versus the Cochet-Bonnet aesthesiometer. *Exp Eye Res.* 2011;92(5):408-13.
121. Murphy PJ, Morgan PB, Patel S, Marshall J. Corneal surface temperature change as the mode of stimulation of the non-contact corneal aesthesiometer. *Cornea.* 1999;18(3):333-42.
122. Edgerton AE. Herpes Zoster Ophthalmicus: Report of Cases and a Review of the Literature. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1942;40:390-439.
123. Hope-Simpson RE. The Nature of Herpes Zoster: A Long-Term Study and a New Hypothesis. *Proc R Soc Med.* 1965;58:9-20.

124. Kurtzke JF. Neuroepidemiology. *Ann Neurol.* 1984;16(3):265-77.
125. Oxman MN, Levin MJ, Johnson GR, Schmader KE, Straus SE, Gelb LD, et al. A vaccine to prevent herpes zoster and postherpetic neuralgia in older adults. *N Engl J Med.* 2005;352(22):2271-84.
126. Schmader K, Gnann JW, Jr., Watson CP. The epidemiological, clinical, and pathological rationale for the herpes zoster vaccine. *J Infect Dis.* 2008;197 Suppl 2:S207-15.
127. Arvin A. Aging, immunity, and the varicella-zoster virus. *N Engl J Med.* 2005;352(22):2266-7.
128. Quinlivan M, Breuer J. Molecular and therapeutic aspects of varicella-zoster virus infection. *Expert reviews in molecular medicine.* 2005;7(15):1-24.
129. Davison AJ, Edson CM, Ellis RW, Forghani B, Gilden D, Grose C, et al. New common nomenclature for glycoprotein genes of varicella-zoster virus and their glycosylated products. *J Virol.* 1986;57(3):1195-7.
130. Yao Z, Jackson W, Forghani B, Grose C. Varicella-zoster virus glycoprotein gpI/gpIV receptor: expression, complex formation, and antigenicity within the vaccinia virus-T7 RNA polymerase transfection system. *J Virol.* 1993;67(1):305-14.
131. Ghatak NR, Zimmerman HM. Spinal ganglion in herpes zoster. A light and electron microscopic study. *Arch Pathol.* 1973;95(6):411-5.
132. Furuta Y, Takasu T, Fukuda S, Sato-Matsumura KC, Inuyama Y, Hondo R, et al. Detection of varicella-zoster virus DNA in human geniculate ganglia by polymerase chain reaction. *J Infect Dis.* 1992;166(5):1157-9.
133. Burke BL, Steele RW, Beard OW, Wood JS, Cain TD, Marmer DJ. Immune responses to varicella-zoster in the aged. *Arch Intern Med.* 1982;142(2):291-3.
134. Levin MJ, Murray M, Rotbart HA, Zerbe GO, White CJ, Hayward AR. Immune response of elderly individuals to a live attenuated varicella vaccine. *J Infect Dis.* 1992;166(2):253-9.
135. Wilson A, Sharp M, Koropchak CM, Ting SF, Arvin AM. Subclinical varicella-zoster virus viremia, herpes zoster, and T lymphocyte immunity to varicella-zoster viral antigens after bone marrow transplantation. *J Infect Dis.* 1992;165(1):119-26.

- 136.Devlin ME, Gilden DH, Mahalingam R, Dueland AN, Cohrs R. Peripheral blood mononuclear cells of the elderly contain varicella-zoster virus DNA. *J Infect Dis.* 1992;165(4):619-22.
- 137.Head H, Campbell AW, Kennedy PG. The pathology of Herpes Zoster and its bearing on sensory localisation. *Rev Med Virol.* 1997;7(3):131-43.
- 138.Watson C, Deck J, Morshead C, Van der Kooy D, Evans R. Post-herpetic neuralgia: further post-mortem studies of cases with and without pain. *Pain.* 1991;44(2):105-17.
- 139.Oaklander AL, Romans K, Horasek S, Stocks A, Hauer P, Meyer RA. Unilateral postherpetic neuralgia is associated with bilateral sensory neuron damage. *Ann Neurol.* 1998;44(5):789-95.
- 140.Ku CC, Padilla JA, Grose C, Butcher EC, Arvin AM. Tropism of varicella-zoster virus for human tonsillar CD4(+) T lymphocytes that express activation, memory, and skin homing markers. *J Virol.* 2002;76(22):11425-33.
- 141.Gowrishankar K, Steain M, Cunningham AL, Rodriguez M, Blumbergs P, Slobedman B, et al. Characterization of the host immune response in human Ganglia after herpes zoster. *J Virol.* 2010;84(17):8861-70.
- 142.Leinweber B, Kerl H, Cerroni L. Histopathologic features of cutaneous herpes virus infections (herpes simplex, herpes varicella/zoster): a broad spectrum of presentations with common pseudolymphomatous aspects. *Am J Surg Pathol.* 2006;30(1):50-8.
- 143.Tsukahara T, Horiuchi Y. Immunohistochemical study of cellular events in lesional skin during common virus infections. *J Dermatol.* 1996;23(1):22-32.
- 144.Ragozzino MW, Melton LJ, 3rd, Kurland LT, Chu CP, Perry HO. Population-based study of herpes zoster and its sequelae. *Medicine (Baltimore).* 1982;61(5):310-6.
- 145.Reuler JB. Herpes zoster. *West J Med.* 1978;129(6):465-8.
- 146.Harding SP, Lipton JR, Wells JC. Natural history of herpes zoster ophthalmicus: predictors of postherpetic neuralgia and ocular involvement. *Br J Ophthalmol.* 1987;71(5):353-8.
- 147.Harding SP. Management of ophthalmic zoster. *J Med Virol.* 1993;Suppl 1:97-101.

- 148.Oaklander AL, Bowsher D, Galer B, Haanpaa M, Jensen MP. Herpes zoster itch: preliminary epidemiologic data. The journal of pain : official journal of the American Pain Society. 2003;4(6):338-43.
- 149.Liesegang TJ. Corneal complications from herpes zoster ophthalmicus. Ophthalmology. 1985;92(3):316-24.
- 150.Puri LR, Shrestha GB, Shah DN, Chaudhary M, Thakur A. Ocular manifestations in Herpes Zoster Ophthalmicus. Nepalese journal of ophthalmology : a biannual peer-reviewed academic journal of the Nepal Ophthalmic Society : NEPJOPH. 2011;3(6):165-71.
- 151.Wenkel H, Rummelt C, Rummelt V, Jahn G, Fleckenstein B, Naumann GO. Detection of varicella zoster virus DNA and viral antigen in human cornea after herpes zoster ophthalmicus. Cornea. 1993;12(2):131-7.
- 152.Yu DD, Lemp MA, Mathers WD, Espy M, White T. Detection of varicella-zoster virus DNA in disciform keratitis using polymerase chain reaction. Arch Ophthalmol. 1993;111(2):167-8.
- 153.Pavan-Langston D, Yamamoto S, Dunkel EC. Delayed herpes zoster pseudodendrites. Polymerase chain reaction detection of viral DNA and a role for antiviral therapy. Arch Ophthalmol. 1995;113(11):1381-5.
- 154.Cobo LM. Corneal complications of herpes zoster ophthalmicus. Prevention and treatment. Cornea. 1988;7(1):50-6.
- 155.Hyndiuk RA, Kazarian EL, Schultz RO, Seideman S. Neurotrophic corneal ulcers in diabetes mellitus. Arch Ophthalmol. 1977;95(12):2193-6.
- 156.Alper MG. The anesthetic eye: an investigation of changes in the anterior ocular segment of the monkey caused by interrupting the trigeminal nerve at various levels along its course. Trans Am Ophthalmol Soc. 1975;73:323-65.
- 157.Cavanagh HD, Colley AM. The molecular basis of neurotrophic keratitis. Acta Ophthalmol Suppl. 1989;192:115-34.
- 158.Micera A, Lambiase A, Puxeddu I, Aloe L, Stampachiacchiere B, Levi-Schaffer F, et al. Nerve growth factor effect on human primary fibroblastic-keratocytes: possible mechanism during corneal healing. Exp Eye Res. 2006;83(4):747-57.
- 159.Petroll WM, Jester JV, Cavanagh HD. In vivo confocal imaging. Int Rev Exp Pathol. 1996;36:93-129.

160. Patel DV, McGhee CN. Contemporary in vivo confocal microscopy of the living human cornea using white light and laser scanning techniques: a major review. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2007;35(1):71-88.
161. Cavanagh HD, Jester JV, Essepian J, Shields W, Lemp MA. Confocal microscopy of the living eye. *CLAO J.* 1990;16(1):65-73.
162. Bohnke M, Masters BR. Confocal microscopy of the cornea. *Prog Retin Eye Res.* 1999;18(5):553-628.
163. Jalbert I, Stapleton F, Papas E, Sweeney DF, Coroneo M. In vivo confocal microscopy of the human cornea. *Br J Ophthalmol.* 2003;87(2):225-36.
164. Guthoff RF, Baudouin C, Stave J. Atlas of confocal laser scanning in-vivo microscopy in ophthalmology. Philipp M, editor. Berlin, Heidelberg: Springer; 2006.
165. Erie JC, McLaren JW, Patel SV. Confocal microscopy in ophthalmology. *Am J Ophthalmol.* 2009;148(5):639-46.
166. Petran M, Hadravsky M. Tandem scanning microscope--a new tool for three-dimensional microanatomy. *Prog Clin Biol Res.* 1989;295:551-8.
167. McLaren JW, Nau CB, Erie JC, Bourne WM. Corneal thickness measurement by confocal microscopy, ultrasound, and scanning slit methods. *Am J Ophthalmol.* 2004;137(6):1011-20.
168. Masters BR, Thaer AA. Real-time scanning slit confocal microscopy of the in vivo human cornea. *Appl Opt.* 1994;33(4):695-701.
169. Erie EA, McLaren JW, Kittleson KM, Patel SV, Erie JC, Bourne WM. Corneal subbasal nerve density: a comparison of two confocal microscopes. *Eye Contact Lens.* 2008;34(6):322-5.
170. Niederer RL, McGhee CN. Clinical in vivo confocal microscopy of the human cornea in health and disease. *Prog Retin Eye Res.* 2010;29(1):30-58.
171. Zhivov A, Stave J, Vollmar B, Guthoff R. In vivo confocal microscopic evaluation of Langerhans cell density and distribution in the normal human corneal epithelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2005;243(10):1056-61.
172. Mastropasqua L, Nubile M, Lanzini M, Carpineto P, Ciancaglini M, Pannellini T, et al. Epithelial dendritic cell distribution in normal and inflamed human cornea: in vivo confocal microscopy study. *Am J Ophthalmol.* 2006;142(5):736-44..

- 173.Vera LS, Gueudry J, Delcampe A, Roujeau JC, Brasseur G, Muraine M. In vivo confocal microscopic evaluation of corneal changes in chronic Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Cornea*. 2009;28(4):401-7.
- 174.Wang Y, Zhao F, Zhu W, Xu J, Zheng T, Sun X. In vivo confocal microscopic evaluation of morphologic changes and dendritic cell distribution in pterygium. *Am J Ophthalmol*. 2010;150(5):650-5 e1.
- 175.Lin H, Li W, Dong N, Chen W, Liu J, Chen L, et al. Changes in corneal epithelial layer inflammatory cells in aqueous tear-deficient dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(1):122-8.
- 176.Shtein RM, Kelley KH, Musch DC, Sugar A, Mian SI. In Vivo Confocal Microscopic Evaluation of Corneal Wound Healing After Femtosecond Laser-Assisted Keratoplasty. *Ophthalmic surgery, lasers & imaging : the official journal of the International Society for Imaging in the Eye*. 2012:1-9.
- 177.Guthoff RF, Zhivov A, Stachs O. In vivo confocal microscopy, an inner vision of the cornea - a major review. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2009;37(1):100-17.
- 178.Szaflik JP. Comparison of in vivo confocal microscopy of human cornea by white light scanning slit and laser scanning systems. *Cornea*. 2007;26(4):438-45.

APÊNDICE A

Protocolo de Estudo

Herpes Keratitis

Affix Patient Label Here

Name: _____

DOB: _____ Age: _____ Sex: _____

MRN: _____

Date: _____

**Affected
Eye**

OD:
OS:

____ HSV ____ HZO

____ New Patient ____ Follow-Up

____ Peripheral ____ Old Study

<u>Focused Ocular Hx:</u>	<u>Ocular Medications:</u>
Date Infection Started: _____ Severity of 1st episode (1-mild, 2-moderate, 3-severe) _____ Date of Last Flare: _____ Number of Recurrences: _____	Steroids: ____ Topical ____ Oral ____ None

No diabetes mellitus

☐

No history of intraocular or retinal surgery in past 6 mos

☐

No prior corneal transplantation or refractive surgery

☐

No history of non-herpetic infectious keratitis

☐

No presence of scar from non-herpetic etiology

☐

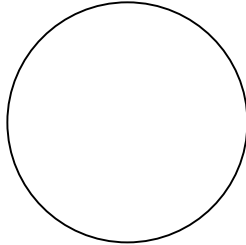
No prior extracapsular cataract extraction

☐

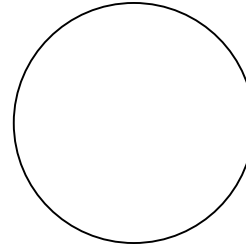
No history of corneal dystrophy

☐
Corneal Sensation:

OD



OS



Scar area/Sup: OD: _____

OS: _____

Central: OD: _____

OS: _____

Opposite/Inf: OD: _____

OS: _____

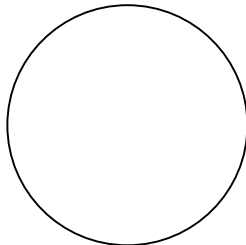
Post Herpetic Neuralgia:

Yes ____ No ____

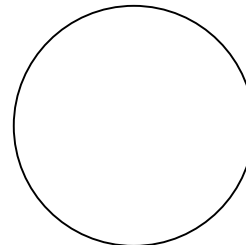
Pain scale out of 10 _____

Corneal Findings:

OD



OS


☐
☐
☐
Location

Central

Paracentral

Peripheral

☐
☐
☐
☐
☐
☐
☐
Direction

Superior

Inferior

Nasal

Temporal

☐
☐
☐
☐
☐
☐
Imaging Examinations Performed

Slit Lamp Photographs

ConfoScan

☐
☐



HRT



Notes:

APÊNDICE B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Protocol #08-05-019X

MASSACHUSETTS EYE & EAR INFIRMARY

INFORMED CONSENT

TITLE: Comparison of Corneal Nerve Density and Characteristics and Sensitivity in Herpetic Neurotrophic Keratopathy

INVESTIGATOR(S): Deborah Pavan-Langston, M.D.; Pedram Hamrah, M.D.;
Reza Dana, M.D., M.P.H., M.Sc.

=====

=====

DESCRIPTION AND EXPLANATION OF PROCEDURES:

We would like permission to enroll you as a participant in a research study. The purpose of this study is to determine the density of the nerves in your cornea and to correlate this to your corneal sensation. We will repeat standard confocal microscopy imaging that takes images of your cornea. The cornea is the clear part of your eye that is in front of the iris (the color part of your eye). We will also measure your corneal sensation with a nylon thread. These findings will be correlated to each other. The findings will allow us to determine the value of measuring your corneal sensation and validate this method.

If you have enrolled in this study prior to May 2009 your first standard confocal imaging was performed using the the Confoscan 4 from Nidek. During your second study imaging session, you will have confocal imaging performed with both the Confscan 4 and the Heidelberg Retina Tomograph 3 with the Rostock Cornea Module (HRT3/RCM). This newer confocal imaging system provides higher resolution and better quality images.

**Human Studies Committee Approved
07-May-2010 - 06-May-2011**

If you enroll in this study following May 2009, you will have standard confocal imaging performed with the Heidelberg Retina Tomograph 3 with the Rostock Cornea Module (HRT3/RCM). This confocal imaging system will be used each of the two times that imaging will be performed on you as part of the study.

Participation in the study does not provide you with an additional eye exam or an eyeglass prescription.

Participation in this study involves up to a maximum of 30 additional minutes to your routine scheduled eye exam.

The study procedure involves installation of an anesthetic drop to numb the surface of your eye. Pictures will then be taken with a confocal machine that takes serial pictures of the whole cornea, during which the machine will slightly touch the surface of your eye. The pictures will then be saved for further analyses.

RISKS AND DISCOMFORTS:

The risk involved in participating in this study are minimal. The confoscan 4 that is used routinely in the clinic for taking pictures of the cornea. No side effects are anticipated from the installation of eyedrops or gels used. No patient hospital time will be required. There will be no psychological or radiation risks. There could be an accidental scratch of the cornea during confocal microscopy, but this is highly unlikely. If any side effects occur, you are asked to contact Dr. Langston at 617-573-3938.

**Human Studies Committee Approved
07-May-2010 - 06-May-2011**

POTENTIAL BENEFITS:

There is most likely no immediate benefit to the study subjects from participation. The findings are likely to have a major clinical significance in terms of prognosis in the healing ability of your cornea. Assessment of the status of your corneal nerves could be a very valuable parameter in predicting the outcome, mode of treatment and frequency of follow-up intervals needed for you. It could also allow us to determine the usefulness of measuring corneal sensation in you.

ALTERNATIVE TREATMENTS:

The alternative is not to participate in the study. Should you change your mind, for any reason, your participation in this study is not obligatory. At any time you can withdraw your participation. If this study involves treatment of your medical condition, withdrawal from the study will in no way jeopardize the normal treatment for your condition, which has been explained to you by Dr. Langston.

CONFIDENTIALITY:

The Massachusetts Eye and Ear Infirmary will take reasonable measures to safeguard the confidentiality of information that identifies you and relates to your past, present, and future physical and mental health and conditions (protected health information) collected, used and shared as part of this research as required by the federal Health Insurance Portability and Accountability Act (HIPAA). As part of this study, we may collect, use and share protected health information about you as specified in the accompanying Research HIPAA Authorization Form. Information derived from this study may be used for research purposes that may include publication and teaching. However, information used for publication and teaching will not disclose your identity.

IN CASE OF INJURIES:

We will offer you the care needed to treat any injury that directly results from taking part in this research study. We reserve the right to bill your insurance company or other third parties, if appropriate, for the care you get for the injury. We will try to have these costs paid for, but you may be responsible for some of them. For example, if the care is billed to your insurer, you will be responsible for payment of any deductibles and co-payments required by your insurer.

**Human Studies Committee Approved
07-May-2010 - 06-May-2011**

Injuries sometimes happen in research even when no one is at fault. There are no plans to pay you or give you other compensation for the injury. However, you are not giving up any of your legal rights by signing this form.

If you think you have been injured or have experienced a medical problem as a result of taking part in this research study, tell the person in charge of the study as soon as possible. The researcher's name and phone number are listed in the next section of this consent form.

RIGHT TO ASK QUESTIONS:

You are free to ask any questions you may have about the study or your treatment as a research subject. Further information about any aspect of this study is available now or at any time during the course of the study from the principal investigator, Dr. Langston at (617) 573-4207. Additionally, you may contact the Office of Research Administration, at (617) 573-3446 if you have any questions or concerns about your treatment as a research subject.

RIGHT TO WITHDRAW:

Your participation in this study is entirely voluntary, and you may withdraw from the study even after signing this consent. The quality of care you will receive at the Massachusetts Eye and Ear Infirmary will not be affected in any way if you decide not to participate or if you withdraw from the study.

COMPENSATION:

In the unlikely event that you should be injured as a direct result of this study, you will be provided with emergency medical treatment through Dr. Langston at 617-573-3938. This treatment does not imply any negligence on the part of the Massachusetts Eye and Ear Infirmary or any of the physicians involved. When applicable, the Massachusetts Eye and Ear Infirmary reserves the right to bill third party payers for any emergency services rendered. The Massachusetts Eye and Ear Infirmary does not have any program to provide compensation as a result of any injuries. You should understand that by agreeing to participate in this study, you are not waiving any of your legal rights.

COSTS:

**Human Studies Committee Approved
07-May-2010 - 06-May-2011**

There will be no additional costs to you for participating in this study. The costs for laboratory evaluations will be covered by a grant.

Your participation may be terminated by the investigator without consent.

Findings developed during the research, which may relate to your willingness to continue participation, will be provided to you.

CONSENT:

The purpose and procedures of this research project with its possible risks and benefits have been fully and adequately explained to me, and I understand them. I voluntarily agree to participate as a subject in the research project, and understand that by signing this consent form I am indicating that agreement. I have been given a copy of this consent form.

Date Name of Subject Signature of Subject

Date Name of Subject's Representative Signature
(if relevant)

Relationship to Subject

Date Name of Witness Signature of Witness

Date Name of Investigator Signature of Investigator

**Human Studies Committee Approved
07-May-2010 - 06-May-2011**

APÊNDICE C

Artigo publicado na revista The Ocular Surface
(DOI information: 10.1016/j.jtos.2017.09.004)

In Vivo Confocal Microscopy Detects Bilateral Changes of Corneal Immune Cells and Nerves in Unilateral Herpes Zoster Ophthalmicus

Bernardo M. Cavalcanti, MD^{1,2}, Andrea Cruzat, MD¹, Afsun Sahin, MD^{1,3,4}, Deborah Pavan-Langston, MD¹, Eric Samayoa, MD¹, Pedram Hamrah, MD.^{1,4,5}

¹Ocular Surface Imaging Center and Cornea & Refractive Surgery Service, Massachusetts Eye & Ear Infirmary, Department of Ophthalmology, Harvard Medical School, 243 Charles Street, Boston, MA 02114, USA.

²Post-Graduate Program, Surgery Department, Pernambuco Federal University (UFPE), Recife, PE, Brazil

³Koc University Medical School, Research Center for Translational Medicine, Istanbul, Turkey

⁴Boston Image Reading Center and ⁵Cornea Service, New England Eye Center, Department of Ophthalmology, Tufts Medical Center, Tufts University School of Medicine, Boston, MA

Running title: Corneal immune cells and nerves in HZO

Keywords: confocal microscopy, corneal nerves, corneal sensation, dendritic cells, herpes zoster ophthalmicus, neurotrophic keratopathy

Conflict of Interest: The authors have no financial/conflicting interests to disclose.

Reprint requests to:

Pedram Hamrah, M.D., Department of Ophthalmology, Tufts Medical Center, Tufts University School of Medicine, Boston, MA, U.S.A.

Tel: +1-617-636-5321; Fax: +1-617-636-1466; E-mail: pedram.hamrah@tufts.edu;

p_hamrah@yahoo.com

ABSTRACT

Purpose: To analyze bilateral corneal immune cell and nerve alterations in patients with unilateral herpes zoster ophthalmicus (HZO) by laser in vivo confocal microscopy (IVCM) and their correlation with corneal sensation and clinical findings.

Materials & Methods: This is a prospective, cross-sectional, controlled single-center study. Twenty-four eyes of 24 HZO patients and their contralateral clinically unaffected eyes and normal controls (n=24) were included. Laser IVCM (Heidelberg Retina Tomograph/Rostock Cornea Module), corneal esthesiometry (Cochet-Bonnet) were performed. Changes in corneal DC density and morphology, number and length of subbasal nerve fibers and their correlation to corneal sensation, pain, lesion location, disease duration, and number of episodes were analyzed.

Results: HZO affected and contralateral eyes showed a significant increase in DC influx of the central cornea as compared to controls (147.4 ± 33.9 , 120.1 ± 21.2 , and 23.0 ± 3.6 cells/mm²; $p < 0.0001$). In HZO eyes DCs were larger in area (319.4 ± 59.8 μ m; $p < 0.001$) and number of dendrites (3.5 ± 0.4 n/cell; $p = 0.01$) as compared to controls (52.2 ± 11.7 , and 2.3 ± 0.5). DC density and size showed moderate negative correlation with total nerve length ($R = -0.43$ and $R = -0.57$, respectively; all $p < 0.001$). A higher frequency of nerve beading and activated DCs close to nerve fibers were detected specifically in pain patients.

Conclusions: Chronic unilateral HZO causes significant bilateral increase in corneal DC density and decrease of the corneal subbasal nerves as compared to controls. Negative correlation was observed for DC density and size to nerve parameters, suggesting interplay

between the immune and nervous systems. Patients with chronic pain also showed increased nerve beading and activated DCs.

INTRODUCTION

Herpes zoster (HZ), commonly called shingles, results from reactivation of varicella-zoster virus (VZV) infection. The virus remains dormant in the dorsal root or other sensory ganglia after the primary varicella (chickenpox) infection.[1-3] The trigeminal ganglion is the most frequent site of latency (65-90%) for VZV.[4] In the United States, 1 million new cases are reported per year.[5] Typically, the incidence of HZ increases with age, as well as with diseases and drugs, which can lead to immunosuppression. Herpes zoster ophthalmicus (HZO) is defined as HZ involvement of the ophthalmic division of the trigeminal nerve. HZO is the second most common type of HZ and accounts for 20% of all cases and approximately 50% of patients will have ocular involvement.[6-10] Corneal complications can occur due to inflammatory and immune reaction to the virus, vasculopathy, and neuropathy.

Dendritic cells (DCs) of the cornea play a major role in the immune defense against the external environment.[11, 12] These professional antigen presenting cells are essential regulators of both the innate and adaptive immune systems. DCs are widely distributed on the ocular surface and are specialized to capture, process, and present antigens to other immune cells. Interestingly, in vitro and skin biopsy studies have shown the importance of DCs as a carrier of VZV to draining lymph nodes and in the transmission of the virus to T lymphocytes.[13-16] However, the role of DCs in the cornea of HZO patients has not been previously explored in vivo.

Corneal nerve damage is likely to occur after viral infections (herpes simplex and herpes zoster).[17-19] Nearly two-third of patients with HZO will develop loss of corneal sensation

due to nerve damage, necrotic ganglionitis, or damage to the mesencephalic nucleus in the brainstem.[20] Corneal nerve fibers exert important trophic influences on the ocular surface and a large number of nerves contain substance P (SP) and/or calcitonin gene-related peptide (CGRP). Cornea sensory nerves interact with the epithelium through soluble mediators, such as SP, and are essential to the ocular surface homeostasis and function.[21, 22] Recent reviews have shown the correlation between corneal nerve alterations and sensation.[23, 24] Thus, the loss of sensation as a result of nerve damage can lead to neurotrophic keratopathy (NTK), which represent one of the most challenging ocular diseases. The prognosis of NTK depends mainly on the level of hypo- or an-esthesia and its consequences that can result in other conditions such as dry eye disease, exposure keratopathy, neurotrophic ulcers, and limbal stem cell deficiency.

In vivo confocal microscopy (IVCM) is a novel tool that allows for quasi-histological in vivo optical sections of the cornea, increasing the understanding of anatomy and pathology in diseased eyes. It allows physicians to visualize the nerve plexus and cellular changes that are not visible by conventional slit-lamp bio-microscopy. In particular, laser IVCM enables the assessment of immune cells and corneal nerves at a high resolution in normal subjects and in patients after ocular surgery (refractive and keratoplasty), dry eye disease, immune-mediated inflammatory diseases such as herpetic keratitis and infectious keratitis.[23, 25-31]

Interestingly, our group has recently shown that clinically apparent unilateral diseases such as herpes simplex keratitis and HZO demonstrates contralateral loss of the corneal nerves plexus when compared to controls.[32-34] Moreover, a recent study by Cruzat et al.[35] suggested a connection between the immune system and nervous system in patients with acute bacterial, fungal and Acanthamoeba keratitis using laser IVCM. Given the fact that there is an inflammatory response during the course of corneal herpes infections, the importance to elucidate this interaction by means of DCs and subbasal nerve plexus gain utmost

importance.[36] However, there is very limited data about the immune cell/nerve interactions in human corneas during the course of herpes infections. Thus, we hypothesize that immune cell alterations correlate to subbasal nerve changes in HZO patients. To begin testing this hypothesis, we used IVCN to detect bilateral immune cell alterations and the extent of subbasal nerve damage in patients with unilateral HZO and correlated the IVCN findings with clinical findings. We demonstrated significant increase of corneal DCs and concurrent nerve diminishment not only in affected eyes, but also in contralateral clinically unaffected eyes.

METHODS

Patients

This study was performed in a prospective, cross-sectional, controlled, single-blinded fashion. Twenty-four patients with diagnosis of unilateral HZO with ocular involvement were recruited between 2010 and 2012 from the Cornea Service of the Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston, MA. All affected eyes had chronic disease defined by the absence of epithelial keratitis or clinical active stromal keratitis after the initial episode. Both eyes, affected and contralateral clinically unaffected, were included as separate groups. Twenty-four eyes of 24 normal volunteers comprised the control group. Only one eye of each subject was randomly chosen. Subjects with a history of infectious keratitis, ocular inflammatory disease, ocular trauma, ocular surgery, contact lens use, diabetes, systemic neuropathies or immunosuppression were excluded. The study was Health Insurance Portability and Accountability Act compliant, was approved by the Institutional Review Board/Ethics Committee. The tenets of the Declaration of Helsinki were followed. Prior to study written informed consent was obtained from all study subjects.

Clinical examination and Corneal Sensation

All patients underwent examination by slit-lamp biomicroscopy and central corneal sensation (DP-L, PH) with a contact Cochet-Bonnet esthesiometer (Luneau Ophthalmologie, Chartres, France) was used to measure corneal sensation. Clinical information, specifically time from disease onset, number of inflammatory episodes and pain grade based on visual analogue scale[37] were obtained. Inflammatory episodes were considered as both primary and secondary immune keratitis. Pain was characterized by the presence of pain and controlled pain characterized in patients with concurrent use of pain medications. The Cochet-Bonnet esthesiometer, which stimulates the corneal nerves mechanically, has a retractable monofilament nylon thread (6 cm length, 0.12 mm diameter). If a positive response is not obtained, it shortens in steps of 1.0 cm. If a positive response is obtained, the thread is progressed by 0.5 cm until a positive response was not obtained. This test was repeated twice, both times at the center of the cornea. The longest filament length resulting in a positive response was recorded. The affected eye group was subdivided in 3 subgroups according to location of corneal scar into clear (absence of scar), central, and peripheral.

Laser In Vivo Confocal Microscopy

Laser scanning in vivo confocal microscopy (Heidelberg Retina Tomograph 3 with Rostock Cornea Module, Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Germany) images of central corneas were obtained in all subjects. The HRT3/RCM is a contact confocal microscope constructed to examine the ocular surface in vivo. It operates with a 63x objective immersion lens (Olympus, Tokyo, Japan), allowing a scanning area of 400 x 400µm with a magnification up to 800 times and a resolution of approximately 1µm.

We imaged the patients with a previously described technique.[35] Briefly, the bottom of a single use sterile polymethylmethacrylate cap (Tomo-Cap; Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Germany) was filled with appropriate amount hydroxypropyl methylcellulose 2.5% (GenTeal gel, Novartis Ophthalmics) and was mounted in front of the Rostock Cornea

Module optics for each examination. Each patient received one drop of 0.5% proparacaine hydrochloride (Alcaine, Alcon, Ft. Worth, TX) and one drop of hydroxypropyl methylcellulose 2.5% (GenTeal gel, Novartis Ophthalmics) in both eyes, respectively. Before examination, in order to improve optical coupling, one drop of hydroxypropyl methylcellulose 2.5% was also placed on the outside tip of the Tomo-Cap. The cornea module was manually advanced until the gel contacted the central surface of the cornea.

A particular focus on the subbasal nerve plexus and epithelial DCs was adapted. A total of 6 sequence scans were obtained from the center of each cornea with and this yielded 300-400 images of the subbasal layer per subject. Digital images were stored on a network computer at 3 frames/per second.

Image Analysis

At least 50 good quality images from cornea, which were the best focused and complete in the same layer images, with good contrast, and without motion or folds, were chosen by an experienced masked observer. Among them the same observer selected a minimum of 3 representative images of the subbasal nerve plexus and epithelial dendritiform immune cells (DCs) for analysis.

Chosen confocal images were analyzed for central corneal DC density and the density of subbasal nerve plexus by two masked observers as previously described.[35] IVCN images at 50 to 70 μ m depth at the level of basal epithelial layers, basal lamina, or subbasal nerve plexus were chosen for analysis of DCs. DCs were morphologically identified as bright individual dendritiform structures with cell bodies that allowed us to differentiate these structures from the corneal nerves. The following parameters were determined for each image, as explained below: DC density, DC size (the area covered by the body of the cell), number of dendrites per DC, and DC field (area bounded within the span of the dendrites).[38]

DC density and morphology were measured using ImageJ, a free image analysis software distributed by the National Institutes of Health

(<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Briefly, cell density was manually counted and data was expressed as cells/mm² $\pm$ standard error of the mean (SEM). Cell count tool in the manual mode was used to analyze the DC density per image. All complete DCs present in each image, as well as partial cells on the top and right borders of each frame were counted and included in the calculation of the average density of DCs. For each calculation, the mean of three images were used. For the morphologic analysis, the 10 most representative cells in three images for each eye were chosen. DC size reflects the actual hyperreflective DC structure and DC field represents the area surrounding the DC by connecting all dendrites. DC size and field were reported as $\mu\text{m}^2 \pm \text{SEM}$. Threshold function was used to measure the size of the DC. The number of dendrites per cell was calculated manually. The representative of the cell span and the length of the dendritic processes were considered as DC field. It was calculated by measuring the area covered by a polygon joining the dendrite tips around each cell.

NeuronJ, which is semi-automated tracing program (a plugin for ImageJ), was used to analyze corneal nerves. (<http://www.imagescience.org/meijering/software/neuronj/>).[39] The whole frame was analyzed for the presence of main trunks, branches and total nerves. Total number of main nerve trunks was counted in each image after analyzing anteriorly and posteriorly in order to confirm that main nerve trunks did not branch from other nerves. Total number of nerve branches was calculated by the sum of nerve branching. The number of total nerves measured was defined as the number of all nerves, including main nerve trunks and branches in one image. Nerve length was assessed by measuring the length of the nerve fibers in micrometers per mm² $\pm$ SEM. Two masked observers evaluated all the images and the averaged values were used for the analysis. If there was more than 10% difference between

the two observers, a third observer evaluated the images as well and the average of these three values was used for the analysis.

Statistical Analysis

The normal distribution of the data was first confirmed with the Shapiro-Wilk test. Student's T-test and X-squared were used to assess the differences of age and gender between HZO and control groups. Statistical analysis was carried out through an analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni correction to compare all corneal sensation and IVCN parameters. A Pearson R coefficient analysis was used to address the correlation between all parameters. Further, Fischer's exact test was used to compare the subbasal nerves changes in patients with pain versus no pain. Finally, a receiver operating characteristic (ROC)-curve model was applied to assess the specificity and sensitivity of the nerves parameters and corneal sensation. All quantitative variables were expressed by the mean and SEM. Differences were considered statistically significant for p less than 0.05. Analyses were performed with SPSS software version 18.0 (Statistical Package for Social Sciences, Chicago).

RESULTS

Twenty-four eyes of 24 HZO patients with unilateral ocular involvement, as well as their respective contralateral clinically unaffected eyes were included. HZO patients were compared to 24 normal eyes of 24 age and gender matched volunteers. The mean age and male/female ratio were 60.1 ± 3.0 years and 11/13 for the HZO group, and 55.6 ± 1.9 years and 9/15 for controls ($p=0.2$ for age and $p=0.5$ for gender). Both groups were homogenous and no statistical difference was found for age and sex variables. A summary of demographics is provided in Table 1.

Dendritiform Cell Density

Dendritiform immune cells were located in the subbasal layer. Quantitative analysis of the DC density and morphology for HZO patients and the normal control group is shown in Table 2 and Figure 1.

Eyes affected with HZO showed a significant increase in DC density when compared to controls (141.2 ± 33.7 vs. 23.0 ± 3.6 cells/mm²; $p < 0.001$) (Figure 2). In addition, the contralateral clinically unaffected eyes had a similar increase in DC density as the affected eyes, with DC density being significantly higher (120.1 ± 21.2 ; $p < 0.001$) in comparison to controls. Interestingly, DCs in HZO eyes were larger with increased number of dendrites. Particularly, DC size (319.4 ± 59.8 μ m²), DC field (787.8 ± 164.9 μ m²) and number of dendrites (3.5 ± 0.4 dendrites per cell) were increased in the affected eye in comparison to controls (57.2 ± 11.7 , 182.4 ± 37.2 , and 2.3 ± 0.5 ; $p < 0.001$) (Figure 2). Further, when compared to controls, contralateral eyes showed increased DC size (161.9 ± 33.1 vs. 57.2 ± 11.7 ; 35.3% increase), DC field (312.0 ± 63.7 vs. 182.4 ± 37.2 ; 58.4% increase), and number of dendrites (3.1 ± 0.6 vs. 2.3 ± 0.5 ; 74.1% increase), but no statistical significance was found in comparison to controls ($p = 0.291$, $p = 0.977$ and $p = 0.277$; respectively) (Figure 2).

After subdividing the HZO patients by location of corneal involvement into clear cornea, central or peripheral scar, no statistical difference was found between groups for DC changes in the central cornea ($p = 0.8$). However, at the time of the visit when imaging was performed, one fourth of the patients (6/24) had clinical inflammation characterized by conjunctival redness, increased blurriness and discomfort, or by the physician's recommendation to increase steroids drops. DC density was 60% higher in this subset of patients (170.1 ± 73.5 cells/mm²) as compared to patients with quiet eyes (100.6 ± 21.5).

Subbasal Nerve Changes

Quantitative analysis of nerve parameters for patients with HZO and the normal control group is listed in Table 2. Eyes affected with HZO and contralateral clinically unaffected eyes

showed a significant reduction in the subbasal nerve plexus parameters as compared to controls (Figure 3 and Figure 4, including: total nerve length ($9,052.6 \pm 1,151.4$, $14,959.8 \pm 903.2$, and $22,851.4 \pm 661.4 \mu\text{m}/\text{mm}^2$ respectively; all $p < 0.001$), total number of nerves (5.8 ± 0.9 , 11.9 ± 1.2 , and 26.6 ± 1.2 n/frame; all $p < 0.001$), number of main nerve trunks (2.4 ± 0.3 , 3.8 ± 0.3 , and 4.4 ± 0.2 ; all $p < 0.001$) and the number of branches (3.4 ± 0.7 , 8.2 ± 1.1 , and 22.2 ± 1.2 ; all $p < 0.001$). Bonferroni multiple comparison tests did not show statistical difference between the contralateral eye and controls for the number of main trunks.

In particular, when subgroups were divided according to the presence and location (central vs. periphery) of corneal scars, the total nerve length ($12,991.3 \pm 1,044.9$, $7,798.4 \pm 1,772.4$, $9,411.8 \pm 1,843.0$, $p = 0.368$), total number of nerves (8.1 ± 1.3 , 5.5 ± 1.5 , and 5.6 ± 1.3 n/frame; $p = 0.648$), number of main nerve trunks (3.4 ± 0.5 , 2.0 ± 0.4 , and 2.6 ± 0.5 ; $p = 0.267$) and the number of branches (4.7 ± 1.2 , 3.4 ± 1.2 , and 3.0 ± 0.8 ; $p = 0.777$) were not statistically different, although patient with no scars demonstrated a higher nerve density.

Correlation and Regression Analysis

No statistical difference was found for the subbasal nerve measurements and DC parameters when comparing the affected eyes of HZO patients with or without pain (Table 3).

Interestingly, a higher frequency of beading (92.8% vs 60.0%; $p = 0.024$), cluster of cell nuclei (64% vs 10%; $p = 0.006$), and activated DCs close to nerve fibers ($< 20 \mu\text{m}$ from fibers) (85.7% vs 50.0%; $p = 0.035$) was detected in pain patients as shown in Figure 5. All HZO patients had similar frequency of microneuromas (41.6%) at the subbasal nerve plexus.

Pearson's correlation coefficient was used in order to correlate the DC density with all nerve parameters. The increase of DC density had statistical significant negative correlation to total nerve length, total number of nerves and number of nerve branches ($R = -0.43$, $R = -0.57$, $R = -0.63$; respectively) for all parameters, $p < 0.001$). Similar correlations were found for DC size

($R=-0.57$, $p<0.001$), DC field ($R=-0.53$, $p<0.001$), and number of dendrites shown ($R=-0.41$, $p<0.001$) to total nerve length (Figure 6 A, B).

In addition, IVCN nerve parameters were correlated to loss of their function as measured by the corneal sensation. We observed a significant correlation between the diminishment of the subbasal nerve plexus and the reduction in corneal sensation. Corneal sensation was significantly correlated to total nerve length ($R=0.63$, $p<0.001$) (Figure 6C), total number of nerves ($R=0.55$, $p<0.001$), main nerve trunks ($R=0.56$, $p<0.001$), and number of branches ($R=0.51$, $p<0.001$).

A ROC-curve model was performed to calculate the approximate corneal nerve length needed for normal sensation. The estimated area under the curve was 0.940 ± 0.032 . We found that abnormal sensation (≤ 5.5 cm) is noted with a total nerve length of $16,067.4 \mu\text{m}/\text{mm}^2$ with 95% of sensitivity and 87% of specificity (Figure 6D).

A multiple regression model was applied to evaluate the correlation between all IVCN parameters with age, number of episodes, and disease duration. No statistical difference was found for any variable (all $p>0.05$).

DISCUSSION

Our data presented herein, demonstrates the increase of corneal DCs and the diminishment of subbasal nerves in both eyes of patients with clinically unilateral HZO. Previous data using laser IVCN in patients with HZO consist of only a single case report that showed diminishment of nerves only in the affected eye.[40] Recently, our group reported bilateral subbasal nerve changes using a slit-scanning confocal microscopy (SSCM) in 27 cases with unilateral HZO.[32] However, the axial resolution of SSCM ($25\mu\text{m}$) is significantly lower in comparison to laser scanning technology ($1\mu\text{m}$).[31] Thus, the laser IVCN provides not only further detail of subbasal nerves, but now allows for assessment of corneal immune cells in HZO, which has not been studied to date.

Immunohistochemical studies have shown the presence of DCs within the normal corneal tissue in animal and human studies.[12, 41, 42] Our group has also extensively studied DCs in human corneas by means of IVCN.[12, 42-46] DCs act as sentinels, monitoring the adjacent tissue for foreign stimuli and undergo activation due to various stimuli.[12, 46] Dendritic cells have been shown to be critical for the initiation of adaptive immune responses and for maintenance of peripheral tolerance.[11] Previous IVCN studies have shown the presence of epithelial DCs in the central cornea healthy volunteers.[28, 47, 48] Mature phenotypes of DCs are characterized by large cells with long processes and are observed in both eyes of our HZO patients.[47] In addition, we have recently demonstrated bilateral increase DC density and size in patients with unilateral acute bacterial fungal, and *Acanthamoeba* keratitis.[35, 49] In the current study, we detect a significant increase in DC density in both affected and clinically unaffected contralateral eyes in patients with chronic unilateral HZO as compared to controls. However, in contrast to our previous studies, the increase in DC density is present in patients with a chronic condition, as the mean follow up period is 57 months, suggesting that inflammation or immune activation persists in HZO patients, long after the active stage of the disease. We have shown that the increase in DC density significantly correlates to increased levels of pro-inflammatory tear cytokine levels, [50] which are elevated bilaterally in patients with unilateral bacterial keratitis, suggesting chronic inflammation in our HZO cohort. However, specific mechanisms have to be substantiated by comprehensive studies in animals and humans, in order to determine the sequence of events that take place after HZO with regards to DC and subbasal nerve alterations.

The connection between the immune and nervous systems has been the focus of recent studies.[51-54] It has been postulated that the neuro-immune cross-talk occurs through the interaction of cytokines and interleukins produced by leukocytes to receptors expressed on nerves and cells of the neuroendocrine system. This interplay constitutes an important

feedback loop that optimizes the inflammatory response to pathogens.[55] Namavari et al.[56] reported the link between Sema7a, a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane-associated semaphorin, and the inflammatory cell influx into the cornea. Cruzat et al.[35] have previously demonstrated an increase in corneal DCs with decreased subbasal nerves plexus in acute infectious keratitis in humans. In the current study, the increase of corneal DC density and DC size correlated negative with the diminishment of the subbasal nerves as well, suggesting that this interaction may not be disease specific.

Corneal sensation is a subjective method of assessing corneal nerve function.[57] The cornea is the most densely innervated tissue in the human body, supplied by the terminal branches of the ophthalmic division of the trigeminal nerve as ciliary nerves.[58] IVCN has been used to characterize the subbasal nerve plexus in normal and diseased eyes by the presence of hyperreflective fibers.[23, 59] Previous IVCN studies have shown a significant correlation between nerve parameters and corneal sensation in herpes simplex, other acute infectious keratitis and in patients with bullous keratopathy.[25, 33, 35] However, herein we demonstrated a sensitivity of 95% and a specificity of 87% through a ROC curve, and a cut-of value of 16,067.4 $\mu\text{m}/\text{mm}^2$ for total nerve length for diminished corneal sensation (corneal sensation $\leq 5.5\text{cm}$). This methodology demonstrates the high precision of laser IVCN in the detection of corneal subbasal nerves.

Pain is one of the most common complications in patients with HZO.[8] In this study, 14 out of 24 patients presented with pain at the time of the visit. A previous report by Oaklander et al. showed reduction of nerve fibers in skin biopsies of patients with HZO and post-herpetic neuralgia as compared to patients without pain.[60] In our series however, we show no statistical difference for subbasal corneal nerves when comparing patients with and without pain. A possible explanation for the discrepancy is the much higher (more than 300-fold) density of nerve fibers in the cornea in comparison to the skin.[61] However, laser IVCN

detects a higher frequency of morphological subbasal changes in patients with pain, who particularly presented with nerve beading, clusters of cell nuclei, and increase in activated DCs close to nerve fibers. Reports have shown that cytokines released from immune cells can directly impact neuronal function, resulting in spontaneous (ectopic) activity and pain.[62] Particularly, pro-inflammatory cytokines, including interleukin (IL)-1, IL-6 and tumor necrosis factor (TNF)- α can directly modulate neuronal activity and evoke spontaneous action potential discharges. Animal models have demonstrated attenuation of neuropathic pain through blockade of IL-1 or IL-6.[63, 64] Further, Wolf et al.[63] demonstrated minimal ectopic activation of axon in mice with target deletion of IL-1 receptor. Additionally, subcutaneous injection of TNF- α in rats, sensitizes C nociceptors leading to lower thresholds in 66.7% of fibers and evoking ongoing activity in 14% of nociceptors.[65] Future studies assessing corneal IVCN and skin biopsies in the same patients, as well as the assessment of the peripheral cornea by IVCN may shed additional light.

The contralateral DC changes in the clinically unaffected eyes in unilateral HZO patients were surprising and novel. In a histopathological study of 21 unilateral shingles, gross hemorrhagic necrosis and inflammatory infiltrates were reported in skin tissues of the affected site, but never in the contralateral side.[66] On the other hand, bilateral changes in unilateral HZ have been reported recently in epidermal biopsies.[67] Our results are consistent with this study that showed milder contralateral changes. A neurogenic interaction has been proposed as a result of contralateral diminishment of corneal nerves, and the neuro-immune cross talk may explain the bilateral sympathetic immune changes observed.

A limitation of the present study is that laser IVCN can only categorize immune cells based on morphology. As previously, reported by Guthoff et al.,[68] laser IVCN does not allow the clinician to distinguish cell characteristics such as nuclei or granules. Still, typical cell morphology, diameter of the cell body and location of the cell aids in the interpretation of the

confocal data. Recently, Knickelbein et al.[69] defined the phenotype and location of DCs in normal donor human corneas by fluorescence confocal microscopy and flow cytometry. They determined the phenotype and location of tissue-resident APCs. Confocal fluorescence microscopy was also used to examine the response of corneal resident APCs to ex vivo infection with HSV-1. They confirmed that DCs and Langerhans cells reside in the human corneal basal epithelium and anterior stroma and are likely the source of cells seen on IVCN. Nevertheless, a standard approach to image acquisition and analysis is fundamental to the reproducibility of future studies. In addition, the Cochet-Bonnet esthesiometer is less than ideal for its intended purpose as a consequence of its design, limited stimulus intensity range, user-dependency, variation in stimulus delivered, restrictive stimulation of only mechanoreceptors and lack of reproducibly measuring corneal sensation at low thresholds of stimuli.[70, 71] However, other devices, such as the Belmonte esthesiometer are currently not commercially available.

In conclusion, laser IVCN is a powerful tool to assess corneal immune and subbasal nerve changes. The current study quantitatively analyzed corneal immune cells, nerve structure and an aspect of nerve function in patients in vivo. These results provide evidence of neuro-immune cross-talk in the cornea, as the data presented reveals a moderate correlation of DC density with subbasal nerve parameters. In addition, a strong correlation with the diminishment of the subbasal plexus and corneal sensation was observed in HZO patients. Thus, quantitative measurements of DCs and subbasal nerve plexus of the cornea may aid in the stratification of patients for therapeutic interventions, allowing a direct evaluation of treatment response and future complications. Further, longitudinal studies are needed to validate these findings and the correlation with other clinical parameters.

Acknowledgements

a. Funding/Support: NIH K08-EY020575, NIH R01-EY022695, NIH R21-EY025393 (PH), New England Corneal Transplant Research Fund (PH), Falk Medical Research Foundation (PH), Johnstone Research Fund (DP-L), Stevens Research Fund (DP-L). The funding organizations had no role in the design or conduct of this research.

b. Financial Disclosures: "No financial disclosures."

c. Other Acknowledgments: None

TABLES**Table 1.** Demographic data of normal controls and patients with herpes zoster ophthalmicus.

	Controls	HZO	P value
Number of patients (n)	24	24	n/a
Age (years)	55.6 ± 1.9	60.1 ± 3.0	0.2
Gender (male/female)	9 / 15	11 / 13	0.5
Sensation (cm)	5.9 ± 0.04	2.7 ± 0.5	<0.0001
Disease duration (months)	n/a	57.0 ± 11.3	n/a
Number of episodes (n)	n/a	2.1 ± 0.3	n/a
Time from last episode (months)	n/a	30.4 ± 10.6	n/a
Number of patients by location of scar (no scar / central / peripheral)	n/a	5 / 11 / 8	n/a

Values are expressed as mean ± standard error of the mean.

HZO: Herpes zoster ophthalmicus; n/a: not applicable

Table 2. Dendritiform cell parameters and corneal subbasal nerve plexus parameters in control groups, contralateral unaffected eyes and affected eyes with herpes zoster ophthalmicus.

	HZO affected	HZO contralateral	Controls
Eyes (n)	24	24	24
Mean central corneal sensation (cm)	2.7 ± 0.5*	5.8 ± 0.1	5.9 ± 0.04
DC density (cells/mm ²)	147.4 ± 33.9*	120.1 ± 21.2*	23.0 ± 3.6
DC size (μm ²)	232.4 ± 47.4*	161.9 ± 33.1	57.2 ± 11.7
DC field (μm ²)	980.9 ± 200.2*	312.0 ± 63.7*	182.4 ± 37.2
DC number of dendrites (n/cell)	4.1 ± 0.8*	3.1 ± 0.6	2.3 ± 0.5
Main nerve trunk length (μm/mm ²)/[μm/frame]	4,950.9 ± 662.9* [792.1 ± 106.1]	8,327.0 ± 474.9* [1,332.3 ± 76.0]	10,364.5 ± 355.6 [1,658.3 ± 57.0]
Nerve branch length (μm/mm ²)/[μm/frame]	4,101.6 ± 538.7* [656.3 ± 86.2]	6,521.7 ± 681.0* [1,043.5 ± 109.0]	12,486.9 ± 522.1 [1,997.9 ± 83.5]
Total nerve length (μm/mm ²)/[μm/frame]	9,052.6 ± 1151.4* [1,448.4 ± 184.2]	14,959.8 ± 903.2* [2,393.6 ± 144.5]	22,851.4 ± 661.4 [3,656.2 ± 105.8]
Number of main nerve trunks (n/frame)	2.4 ± 0.3*	3.8 ± 0.3	4.4 ± 0.2
Number of nerve branches (n/frame)	3.4 ± 0.7*	8.2 ± 1.1*	22.2 ± 1.2
Total number of nerves (n/frame)	5.8 ± 0.9*	11.9 ± 1.2*	26.6 ± 1.2

Values are expressed as mean ± standard error of mean. * Statistically significant (p<0.05) compared to controls. HZO: Herpes Zoster Ophthalmicus, DC: Dendritiform cell.

Table 3. Dendritiform cell parameters and corneal subbasal nerve plexus parameters in affected eyes with or without pain in herpes zoster ophthalmicus.

	Patients with pain	Patients without pain	P value
n	14	10	n/a
Age (years)	60.1±16.4	60.0±12.5	0.9
Sensation (cm)	2.6±2.1	2.6±2.7	0.9
DC density (cells/mm ²)	136.3±59.2	143.7±42.4	0.9
DC size (μm ²)	225.5±87.3	366.2±77.5	0.2
DC field (μm ²)	615.3±341.3	874.1±184.0	0.4
DC number of dendrites (n/cell)	4.3±1.0	3.0±0.3	0.1
Main nerve trunk length (μm/mm ²)/[μm/frame]	4409.3±1091.1 [705.4±174.5]	5221.8±847.5 [835.4±135.6]	0.5
Nerve branch length (μm/mm ²)/[μm/frame]	3472.2±861.6 [555.5±137.8]	4416.2±688.6 [706.5±110.1]	0.4
Total nerve length (μm/mm ²)/[μm/frame]	7881.6±1926.9 [1261.0±308.3]	9636.0±1454.7 [1541.7±232.7]	0.4
Number of main nerve trunks (n/frame)	2.2±0.4	2.4±0.3	0.7
Number of nerve branches (n/frame)	2.2±0.4	4.0±0.9	0.2
Total number of nerves (n/frame)	4.4±1.1	6.5±1.1	0.2

Values are expressed as mean ± standard error of the mean. n/a: not applicable

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Slit-lamp images of control eye (A), clinically unaffected contralateral eye (B), and affected eye with herpes zoster ophthalmicus (HZO) (C). Representative laser *in vivo* confocal microscopy images of corneal dendritiform immune cells (DCs) in the affected eye (D and E) and contralateral eyes of HZO patient (F and G), and normal control eye (H). Note the increase of DC density in both eyes of HZO patients. DC morphology analysis (I; in red DC size; yellow number of dendrites and DC field). Black arrows highlight DCs.

Figure 2. Dendritiform immune cell density (DCs) in herpes zoster ophthalmicus. Affected and contralateral eyes reveal statistical significant increase of DC density (A). DCs in the affected eye showed an increase in size (B), as well as DC field (C) and in number of dendrites (D). (* statistical significant adjusted p-value < 0.05)

Figure 3. Representative *in vivo* confocal microscopy images of the subbasal corneal nerve plexus in eyes with herpes zoster ophthalmicus and controls. Diminishment of nerve fibers is

revealed in both affected eyes (A and D) and contralateral clinically unaffected eyes (B and E) of herpes zoster patients in comparison to normal controls (C). Example of nerve tracings performed by NeuronJ/ImageJ is shown (F).

Figure 4. Corneal nerves parameters in herpes zoster ophthalmicus. Both eyes of herpes zoster patients show a decrease of subbasal nerve parameters in comparison to controls. Number of total nerves (A) and total nerve length fibers (B), number of nerve branches (C), and central corneal sensation (D) for all groups. (*statistical significant adjusted p-value< 0.05).

Figure 5. Subbasal nerve features of in patients with pain from herpes zoster ophthalmicus. Representative *in vivo* confocal images of beading (A and B), neuromas (C and D), cluster of nuclei (E and F), and activated dendritic cells close to nerve fibers (G and H).

Figure 6. Correlation for *in vivo* confocal microscopy parameters and corneal sensation. Total nerve length vs dendritic form cells density (A) and dendritic-form cells size (B) reveals positive correlation ($R=-0.43$ and $R=-0.57$, respectively). Total nerve length shows good positive correlation with corneal sensation (C)($R=0.63$). ROC curve model demonstrates good specificity and sensitivity for detection of corneal sensation diminishment.

REFERENCES

- [1] Gnann JW, Jr., Whitley RJ. Clinical practice. Herpes zoster. N Engl J Med. 2002;347:340-6.
- [2] Hope-Simpson RE. The Nature of Herpes Zoster: A Long-Term Study and a New Hypothesis. Proc R Soc Med. 1965;58:9-20.
- [3] Straus SE, Reinhold W, Smith HA, Ruyechan WT, Henderson DK, Blaese RM, et al. Endonuclease analysis of viral DNA from varicella and subsequent zoster infections in the same patient. N Engl J Med. 1984;311:1362-4.

- [4] Liesegang TJ. Varicella-zoster virus eye disease. *Cornea*. 1999;18:511-31.
- [5] Oxman MN, Levin MJ, Johnson GR, Schmader KE, Straus SE, Gelb LD, et al. A vaccine to prevent herpes zoster and postherpetic neuralgia in older adults. *N Engl J Med*. 2005;352:2271-84.
- [6] Edgerton AE. Herpes Zoster Ophthalmicus: Report of Cases and a Review of the Literature. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1942;40:390-439.
- [7] Ragozzino MW, Melton LJ, 3rd, Kurland LT, Chu CP, Perry HO. Population-based study of herpes zoster and its sequelae. *Medicine (Baltimore)*. 1982;61:310-6.
- [8] Liesegang TJ. Herpes zoster ophthalmicus natural history, risk factors, clinical presentation, and morbidity. *Ophthalmology*. 2008;115:S3-12.
- [9] Harpaz R, Ortega-Sanchez IR, Seward JF, Advisory Committee on Immunization Practices Centers for Disease C, Prevention. Prevention of herpes zoster: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep*. 2008;57:1-30; quiz CE2-4.
- [10] Schmader KE, Dworkin RH. Natural history and treatment of herpes zoster. *J Pain*. 2008;9:S3-9.
- [11] Hamrah P, Dana MR. Corneal antigen-presenting cells. *Chem Immunol Allergy*. 2007;92:58-70.
- [12] Hamrah P, Liu Y, Zhang Q, Dana MR. The corneal stroma is endowed with a significant number of resident dendritic cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44:581-9.
- [13] Abendroth A, Kinchington PR, Slobedman B. Varicella zoster virus immune evasion

strategies. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010;342:155-71.

[14] Abendroth A, Morrow G, Cunningham AL, Slobedman B. Varicella-zoster virus infection of human dendritic cells and transmission to T cells: implications for virus dissemination in the host. *J Virol*. 2001;75:6183-92.

[15] Morrow G, Slobedman B, Cunningham AL, Abendroth A. Varicella-zoster virus productively infects mature dendritic cells and alters their immune function. *J Virol*. 2003;77:4950-9.

[16] Huch JH, Cunningham AL, Arvin AM, Nasr N, Santegoets SJ, Slobedman E, et al. Impact of varicella-zoster virus on dendritic cell subsets in human skin during natural infection. *J Virol*. 2010;84:4060-72.

[17] Bonini S, Lambiase A, Rama P, Caprioglio G, Aloe L. Topical treatment with nerve growth factor for neurotrophic keratitis. *Ophthalmology*. 2000;107:1347-51; discussion 51-2.

[18] Davis EA, Dohlman CH. Neurotrophic keratitis. *Int Ophthalmol Clin*. 2001;41:1-11.

[19] Bonini S, Rama P, Olzi D, Lambiase A. Neurotrophic keratitis. *Eye (Lond)*. 2003;17:989-95.

[20] Pavan-Langston D. Herpes zoster ophthalmicus. *Neurology*. 1995;45:S50-1.

[21] Muller LJ, Marfurt CF, Kruse F, Tervo TM. Corneal nerves: structure, contents and function. *Exp Eye Res*. 2003;76:521-42.

[22] Garcia-Hirschfeld J, Lopez-Briones LG, Belmonte C. Neurotrophic influences on corneal epithelial cells. *Exp Eye Res*. 1994;59:597-605.

[23] Cruzat A, Pavan-Langston D, Hamrah P. In vivo confocal microscopy of corneal nerves:

analysis and clinical correlation. *Semin Ophthalmol.* 2010;25:171-7.

[24] Pritchard N, Edwards K, Shahidi AM, Sampson GP, Russell AW, Malik RA, et al. Corneal markers of diabetic neuropathy. *Ocul Surf.* 2011;9:17-28.

[25] Al-Aqaba M, Alomar T, Lowe J, Dua HS. Corneal nerve aberrations in bullous keratopathy. *Am J Ophthalmol.* 2011;151:840-9 e1.

[26] Neira-Zalentein W, Holopainen JM, Tervo TM, Borrás F, Acosta MC, Belmonte C, et al. Corneal sensitivity in diabetic patients subjected to retinal laser photocoagulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:6043-9.

[27] Erie JC, McLaren JW, Hodge DO, Bourne WM. The effect of age on the corneal subbasal nerve plexus. *Cornea.* 2005;24:705-9.

[28] Mastropasqua L, Nubile M, Lanzini M, Carpineto P, Ciancaglini M, Pannellini T, et al. Epithelial dendritic cell distribution in normal and inflamed human cornea: in vivo confocal microscopy study. *Am J Ophthalmol.* 2006;142:736-44.

[29] Patel DV, McGhee CN. Mapping of the normal human corneal sub-Basal nerve plexus by in vivo laser scanning confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:4485-8.

[30] Alomar TS, Al-Aqaba M, Gray T, Lowe J, Dua HS. Histological and confocal microscopy changes in chronic corneal edema: implications for endothelial transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:8193-207.

[31] Niederer RL, McGhee CN. Clinical in vivo confocal microscopy of the human cornea in health and disease. *Prog Retin Eye Res.* 2010;29:30-58.

[32] Hamrah P, Cruzat A, Dastjerdi MH, Pruss H, Zheng L, Shahatit BM, et al. Unilateral

herpes zoster ophthalmicus results in bilateral corneal nerve alteration: an in vivo confocal microscopy study. *Ophthalmology*. 2013;120:40-7.

[33] Hamrah P, Cruzat A, Dastjerdi MH, Zheng L, Shahatit BM, Bayhan HA, et al. Corneal sensation and subbasal nerve alterations in patients with herpes simplex keratitis: an in vivo confocal microscopy study. *Ophthalmology*. 2010;117:1930-6.

[34] Cruzat A, Hamrah P, Cavalcanti BM, Zheng L, Colby K, Pavan-Langston D. Corneal Reinnervation and Sensation Recovery in Patients With Herpes Zoster Ophthalmicus: An In Vivo and Ex Vivo Study of Corneal Nerves. *Cornea*. 2016;35:619-25.

[35] Cruzat A, Witkin D, Baniyadi N, Zheng L, Ciolino JB, Jurkunas UV, et al. Inflammation and the nervous system: the connection in the cornea in patients with infectious keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52:5136-43.

[36] Hamrah P, Pavan-Langston D, Dana R. Herpes simplex keratitis and dendritic cells at the crossroads: lessons from the past and a view into the future. *Int Ophthalmol Clin*. 2009;49:53-62.

[37] Qazi Y, Hurwitz S, Khan S, Jurkunas UV, Dana R, Hamrah P. Validity and Reliability of a Novel Ocular Pain Assessment Survey (OPAS) in Quantifying and Monitoring Corneal and Ocular Surface Pain. *Ophthalmology*. 2016;123:1458-68.

[38] Kheirkhah A, Rahimi Darabad R, Cruzat A, Hajrasouliha AR, Witkin D, Wong N, et al. Corneal Epithelial Immune Dendritic Cell Alterations in Subtypes of Dry Eye Disease: A Pilot In Vivo Confocal Microscopic Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56:7179-85.

[39] Meijering E, Jacob M, Sarria JC, Steiner P, Hirling H, Unser M. Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images. *Cytometry A*.

2004;58:167-76.

[40] Patel DV, McGhee CN. Laser scanning in vivo confocal microscopy demonstrating significant alteration of human corneal nerves following herpes zoster ophthalmicus. *Arch Neurol.* 2010;67:640-1.

[41] Mayer WJ, Irschick UM, Moser P, Wurm M, Huemer HP, Romani N, et al. Characterization of antigen-presenting cells in fresh and cultured human corneas using novel dendritic cell markers. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48:4459-67.

[42] Hamrah P, Zhang Q, Liu Y, Dana MR. Novel characterization of MHC class II-negative population of resident corneal Langerhans cell-type dendritic cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:639-46.

[43] Dana MR, Hamrah P. Role of immunity and inflammation in corneal and ocular surface disease associated with dry eye. *Adv Exp Med Biol.* 2002;506:729-38.

[44] Hamrah P, Chen L, Zhang Q, Dana MR. Novel expression of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-3 and VEGF-C on corneal dendritic cells. *Am J Pathol.* 2003;163:57-68.

[45] Hamrah P, Huq SO, Liu Y, Zhang Q, Dana MR. Corneal immunity is mediated by heterogeneous population of antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol.* 2003;74:172-8.

[46] Hamrah P, Liu Y, Zhang Q, Dana MR. Alterations in corneal stromal dendritic cell phenotype and distribution in inflammation. *Arch Ophthalmol.* 2003;121:1132-40.

[47] Zhivov A, Stave J, Vollmar B, Guthoff R. In vivo confocal microscopic evaluation of Langerhans cell density and distribution in the normal human corneal epithelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2005;243:1056-61.

- [48] Lin H, Li W, Dong N, Chen W, Liu J, Chen L, et al. Changes in corneal epithelial layer inflammatory cells in aqueous tear-deficient dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51:122-8.
- [49] Cruzat A, Schrems WA, Schrems-Hoesl LM, Cavalcanti BM, Baniyadi N, Witkin D, et al. Contralateral Clinically Unaffected Eyes of Patients With Unilateral Infectious Keratitis Demonstrate a Sympathetic Immune Response. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56:6612-20.
- [50] Yamaguchi T, Calvacanti BM, Cruzat A, Qazi Y, Ishikawa S, Osuka A, et al. Correlation between human tear cytokine levels and cellular corneal changes in patients with bacterial keratitis by in vivo confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55:7457-66.
- [51] Hamrah P, Seyed-Razavi Y, Yamaguchi T. Translational Immunoimaging and Neuroimaging Demonstrate Corneal Neuroimmune Crosstalk. *Cornea*. 2016;35 Suppl 1:S20-S4.
- [52] Sirinek LP, O'Dorisio MS. Modulation of immune function by intestinal neuropeptides. *Acta Oncol*. 1991;30:509-17.
- [53] McGillis JP, Mitsuhashi M, Payan DG. Immunomodulation by tachykinin neuropeptides. *Ann N Y Acad Sci*. 1990;594:85-94.
- [54] Schauenstein K, Rinner I, Felsner P, Mangge H. Bidirectional interaction between immune and neuroendocrine systems. An experimental approach. *Pediatr Padol*. 1992;27:81-5.
- [55] Sternberg EM. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:318-28.
- [56] Namavari A, Chaudhary S, Ozturk O, Chang JH, Yco L, Sonawane S, et al. Semaphorin

7a links nerve regeneration and inflammation in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.

2012;53:4575-85.

[57] Brennan NA, Bruce AS. Esthesiometry as an indicator of corneal health. *Optom Vis Sci*.

1991;68:699-702.

[58] Oliveira-Soto L, Efron N. Morphology of corneal nerves using confocal microscopy.

Cornea. 2001;20:374-84.

[59] Cruzat A, Qazi Y, Hamrah P. In Vivo Confocal Microscopy of Corneal Nerves in Health

and Disease. *The ocular surface*. 2017;15:15-47.

[60] Oaklander AL. The density of remaining nerve endings in human skin with and without

postherpetic neuralgia after shingles. *Pain*. 2001;92:139-45.

[61] Millodot M. A review of research on the sensitivity of the cornea. *Ophthalmic Physiol*

Opt. 1984;4:305-18.

[62] Scholz J, Woolf CJ. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat*

Neurosci. 2007;10:1361-8.

[63] Wolf G, Gabay E, Tal M, Yirmiya R, Shavit Y. Genetic impairment of interleukin-1

signaling attenuates neuropathic pain, autotomy, and spontaneous ectopic neuronal activity,

following nerve injury in mice. *Pain*. 2006;120:315-24.

[64] Arruda JL, Sweitzer S, Rutkowski MD, DeLeo JA. Intrathecal anti-IL-6 antibody and

IgG attenuates peripheral nerve injury-induced mechanical allodynia in the rat: possible

immune modulation in neuropathic pain. *Brain Res*. 2000;879:216-25.

[65] Junger H, Sorkin LS. Nociceptive and inflammatory effects of subcutaneous TNFalpha.

Pain. 2000;85:145-51.

[66] Head H, Campbell AW, Kennedy PG. The pathology of Herpes Zoster and its bearing on sensory localisation. *Rev Med Virol.* 1997;7:131-43.

[67] Oaklander AL, Romans K, Horasek S, Stocks A, Hauer P, Meyer RA. Unilateral postherpetic neuralgia is associated with bilateral sensory neuron damage. *Ann Neurol.* 1998;44:789-95.

[68] Guthoff RF, Zhivov A, Stachs O. In vivo confocal microscopy, an inner vision of the cornea - a major review. *Clin Exp Ophthalmol.* 2009;37:100-17.

[69] Knickelbein JE, Buella KA, Hendricks RL. Antigen-presenting cells are stratified within normal human corneas and are rapidly mobilized during ex vivo viral infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55:1118-23.

[70] Murphy PJ, Lawrenson JG, Patel S, Marshall J. Reliability of the non-contact corneal aesthesiometer and its comparison with the Cochet-Bonnet aesthesiometer. *Ophthalmic Physiol Opt.* 1998;18:532-9.

[71] Golebiowski B, Papas E, Stapleton F. Assessing the sensory function of the ocular surface: implications of use of a non-contact air jet aesthesiometer versus the Cochet-Bonnet aesthesiometer. *Exp Eye Res.* 2011;92:408-13.

ANEXO A



Approval Notice Addendum

20-Nov-2009

DEBORAH PAVAN-LANGSTON
243 Charles Street
Boston, MA 02114

RE: Protocol # 08-05-019X, "Correlation of Corneal Nerve Density and Characteristics to Corneal Sensation in Herpetic Neurotrophic Keratopathy"

Dear DEBORAH PAVAN-LANGSTON,

Your **Addendum** submission was reviewed and approved under **Expedited** procedures by the Human Studies Committee (HSC) on **20-Nov-2009**.

Conditions of the Approval:

This is the approval of the addition of Deborah Witkin to the protocol.

We have Approved the following documents for your use in the coming approval period:

No additional documents are provided with this approval.

Protocol Approval period: **18-May-2009 - 07-May-2010**

Please remember to use your **protocol number (08-05-019X)** on any documents or correspondence with the HSC concerning your research protocol.

Please note that the HSC has the prerogative and authority to ask further questions, seek additional information, require further modifications, or monitor the conduct of your research and the consent process.

If you have any questions or need further help, please contact me at (617) 573-6939.

Sincerely,

Kirk Krogstad
Research Compliance Coordinator
Human Studies Committee