

Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” București

Facultatea de Medicină

# **Teză de Doctorat - Rezumat**

## **Cercetări imunohistochimice ale sistemului lacrimal**

**Conducător științific**

**Prof.Univ.Dr.Liliana Mary Voinea**

**Doctorand**

**dr.Raluca Iustina Bâra**

București, 2020

## CUPRINS

INTRODUCERE	5
LISTA DE ABREVIERI	7
PARTEA GENERALĂ A TEZEI DE DOCTORAT	8
1 ELEMENTE DE EMBRIOGENEZĂ ȘI MORFOGENEZĂ A SISTEMULUI LACRIMAL	9
1.1 Dezvoltarea glandei lacrimale	9
1.2 Evoluția morfologică postnatală a celulelor mioepiteliale ale glandei lacrimale	13
2 ELEMENTE DE ANATOMIE A SISTEMULUI LACRIMAL	14
2.1 Sistemul secretor lacrimal	15
2.2 Glanda lacrimală	16
2.3 Sistemul de drenaj lacrimal	23
2.4 Ductele lacrimale	24
2.5 Mușchiul lui Horner	24
2.6 Caruncula lacrimală	25
2.7 Lacul lacrimal	25
2.8 Punctele lacrimale	26
2.9 Canaliculele lacrimale	26
2.9.1 Porțiunea verticală a canaliculului lacrimal	26
2.9.2 Porțiunea orizontală a canaliculului lacrimal	27
2.9.3 Diafragma lacrimală	27
2.9.4 Canaliculul comun	28
2.10 Fosa sacului lacrimal	28
2.11 Sacul lacrimal	30

2.12 Canalul lacrimonazal	31
2.13 Conjunctiva	36
2.13.1 Conjunctiva palpebrală	37
2.13.2 Conjunctiva epibulbară	38
3 REGLAREA SISTEMULUI LACRIMAL	39
3.1 Reglarea secreției glandei lacrimale	39
3.2 Sindromul de ochi uscat și inervația parasimpatică a glandei lacrimale	41
PARTEA PERSONALĂ A TEZEI DE DOCTORAT	44
4 ANATOMIA MOLECULARĂ A SACULUI LACRIMAL ÎL INDICĂ PRECUM UN ORGAN CONTRACTIL ȘI LIMFOID TERȚIAR CU POTENȚIAL REGENERATIV	45
4.1 Introducere	45
4.2 Material și metodă	46
4.2.1 Material biologic	46
4.2.2 Metoda imunohistochimică	46
4.3 Rezultate	51
4.4 Discuții	65
4.4.1 Venulele cu endoteliu înalt ale sacului lacrimal	65
4.4.2 Fenotipul mioid al sacului lacrimal	67
4.4.3 Expresia stromală a CD21 în sacul lacrimal	70
4.4.3.1 Este sacul lacrimal un organ limfatic terțiar?	72
4.4.4 Limfaticele sacului lacrimal	73
4.4.5 Angiogeneza la nivelul sacului lacrimal	73
4.4.5.1 Macrofagele CD31-pozitive și mimetismul vascular	73
4.4.6 Nișele stem epitelială și stromală la nivelul sacului lacrimal	74
4.4.6.1 Expresia epitelială și mioepitelială a nestinei	74
4.4.6.2 Expresia epitelială și mioepitelială a podoplaninei	74
4.4.6.3 Expresia epitelială a alfa-actinei mușchiului neted	76
4.4.6.4 Expresia epitelială a markerului monocitar-macrofagic CD68 și a markerului endotelial CD31	76
5 EVALUAREA IMUNOHISTOCHIMICĂ A CONJUNCTIVEI	79
5.1 Introducere	79
5.2 Material și metodă	79
5.2.1 Material biologic	79

5.2.2	Metoda imunohistochimică	79
5.2.3	Documentarea rezultatelor	84
<b>5.3</b>	<b>Rezultate</b>	<b>84</b>
5.3.1	Expresia citokeratinelor în conjunctivă	84
5.3.2	Expresia D2-40 în conjunctiva epibulbară	86
5.3.3	Expresia conjunctivală a CD31	87
5.3.4	Expresia CD34 în conjunctiva umană	89
5.3.5	Expresia enolazei neuron-spezifice în conjunctivă	89
5.3.6	Expresia conjunctivală a CD68	90
<b>5.4</b>	<b>Discuții</b>	<b>90</b>
5.4.1	Expresia citokeratinelor în epiteliul conjunctival	90
5.4.2	Fenotipuri moleculare ale epiteliului conjunctival	91
5.4.2.1	Transformarea epitelial-mezenchimală conjunctivală	91
5.4.2.2	Expresia CD68 în celule epiteliale conjunctivale	94
5.4.2.3	Expresia CD31 în celule epiteliale conjunctivale	94
5.4.3	Limfaticile conjunctivale	95
5.4.3.1	Lacunele conjunctivale în microscopia confocală	98
5.4.4	Expresia podoplaninei la nivel ocular	100
5.4.5	Limfangiogeneza conjunctivală	104
5.4.6	Expresia stromală a enolazei neuron-spezifice indică celule mezenchimale cu potențial stem/progenitor	104
5.4.7	Telocitele conjunctivale	105
5.4.7.1	Un subset de telocite conjunctivale poate aparține liniei mielomonocitare	105
<b>6</b>	<b>CERCETĂRI IMUNOHISTOCHIMICE LA NIVELUL GLANDEI LACRIMALE</b>	<b>107</b>
<b>6.1</b>	<b>Introducere</b>	<b>107</b>
<b>6.2</b>	<b>Material și metodă</b>	<b>108</b>
<b>6.3</b>	<b>Rezultate</b>	<b>112</b>
<b>6.4</b>	<b>Discuții</b>	<b>116</b>
6.4.1	Afecțiuni inflamatorii ale glandei lacrimale	116
6.4.2	Rolul celulelor stromale în procesele regenerative	120
6.4.3	Rolul celulelor mioepiteliale în regenerarea glandei lacrimale	122
6.4.4	Expresia factorului von Willebrand în epiteliul glandular	124
6.4.5	Neuronii intrinseci ai glandei lacrimale la om	126
6.4.6	Expresia Stro-1 în glanda lacrimală	127
<b>7</b>	<b>CONCLUZII</b>	<b>129</b>
	<b>BIBLIOGRAFIE</b>	<b>131</b>

<b>INDEX DE FIGURI ÎN TEXT</b>	<b>143</b>
--------------------------------	------------

<b>INDEX DE TABELE ÎN TEXT</b>	<b>148</b>
--------------------------------	------------

<b>ANEXA 1 – LICENȚĂ DE COPYRIGHT</b>	<b>149</b>
---------------------------------------	------------

Pentru validarea tezei de doctorat, conform contractului de studii doctorale, a trebuit să realizez cel puțin doi indicatori de performanță în publicații ISI sau BDI. Am realizat trei astfel de indicatori.

Primul, este articolul *Lymphatic lacunae of the human eye conjunctiva embedded within a stroma containing CD34<sup>+</sup> telocytes*, publicat în jurnal ISI cu factor de impact 4.486 și anume Journal of Cellular and Molecular Medicine.

Cel de-al doilea articol, publicat de asemenea în jurnal ISI – Acta Histochemica, factor de impact 2.107 este *Adding myofibroblasts to the lacrimal pump*.

Al treilea indicator de performanță, publicat în jurnalul BDI Medicine in Evolution, este articolul *Myoepithelial cells of the lacrimal gland*.

În partea generală a tezei de doctorat m-am axat și am discutat elemente de embriogeneză și morfogeneză ale sistemului lacrimal, elemente de anatomie ale sistemului lacrimal și mecanismele de reglare ale acestuia.

Lichidul lacrimal este drenat prin ductele lacrimale în meatul nazal inferior. Este puțin cunoscut rolul structurilor de drenaj lacrimal în ceea ce privește compoziția fluidului respectiv iar numeroși factori ce au rol în drenajul lacrimal au fost propuși, în funcție de conformația anatomică specifică a sistemului de drenaj lacrimal<sup>1</sup>. În 1957 Jones<sup>2</sup>, citat de Paulsen și colab. (1998) a postulat un mecanism activ de pompă, rezultat prin contracția mușchiului orbicular al ochiului. Rohen, în 1964, citat tot de Paulsen și colab. (1998), a sugerat că reabsorbția lichidului lacrimal se realizează prin epiteliul de acoperire al ductelor lacrimonazale. Alți factori ce intervin în drenajul lichidului lacrimal sunt procese fizice precum capilaritatea, gravitația, respirația și evaporarea<sup>1</sup>.

Filmul lacrimal constă din trei straturi, unul intern mucos ce acoperă corneea și conjunctiva ancorând filmul lacrimal la suprafața oculară, unul extern lipidic secretat de glanda meibomiană, ce previne evaporarea lacrimilor și stratul mijlociu/intermediar apos, care reprezintă peste 90% din volumul lacrimal, fiind secretat de glanda lacrimală<sup>3,4</sup>. Glanda lacrimală este astfel importantă, deoarece intervine semnificativ în menținerea stabilității micromediului suprafeței oculare<sup>3</sup>. Atunci când se reduce funcția glandei lacrimale apare reducerea semnificativă a producției lacrimale, și sindromul de ochi uscat<sup>3</sup>. Netratat, sindromul de ochi uscat poate conduce la o morbiditate

semnificativă ce include infecții oculare frecvente, ulcerații corneene și pierderea vederii <sup>4</sup>.

În realizarea lucrării mele de doctorat am pornit de la identificarea unor nișe mai puțin explorate de la nivelul sistemului lacrimal. Am identificat astfel de ținte ale cercetării la nivelul sacului lacrimal, conjunctivei și glandei lacrimale. Am avut ca scop realizarea de cercetări imunohistochimice ale acestor țesuturi, cu utilizarea unor paneluri consistente de markeri imunohistochimici. Obiectivul general al cercetărilor mele a fost reprezentat de clarificarea și dezvoltarea informației științifice preexistente privind țesuturile specifice urmărite.

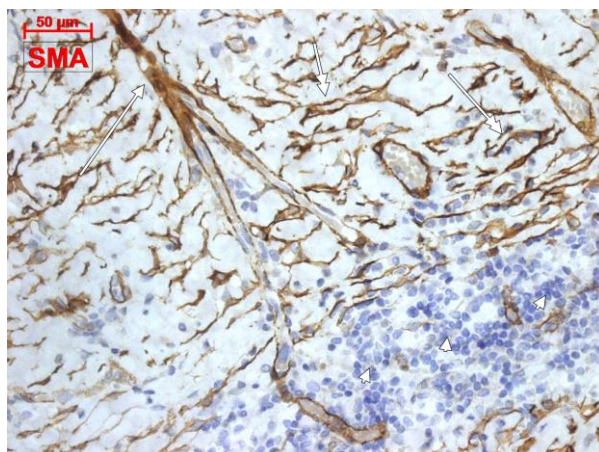
Astfel, partea personală a tezei de doctorat este compusă din trei cercetări imunohistochimice distincte asupra sacului lacrimal, a conjunctivei și asupra glandei lacrimale.

În vederea realizării acestor studii am obținut avizul comisiei de etică din cadrul Spitalului Universitar de Urgență București nr. 4447/ 23.01.2019. Este un studiu retrospectiv, pe specimene incluse la parafina, zece cazuri, cu vârste cuprinse între 49 și 58 ani. Am obținut consimțământul informat scris al pacienților pentru folosirea datelor medicale în cercetare, cu condiția anonimizării datelor personale.

În cercetările de anatomie moleculară a sacului lacrimal am pornit de la următoarele ipoteze. Prima ipoteză este cea morfofuncțională care consideră sacul lacrimal precum pompă mioidă, având astfel ca scop demonstrarea fenotipului mioid al acestuia. A doua ipoteză a fost cea a potențialului de transdiferențiere a celulelor epiteliale ale sacului lacrimal, care pot astfel funcționa ca rezerve morfofuncționale în regenerarea sau mentenanța sa. Aceasta a condus la scopul precizării fenotipului molecular, endotelial și/sau mezenchimal, al epiteliului sacului lacrimal. Deasemenea, am urmărit să cercetez anatomia microscopică a limfaticelor sacului lacrimal, aceasta nefiind descrisă până în prezent în literatura de specialitate. În acest sens am folosit un panel constituit din 11 anticorpi distincți - H-caldesmon, nestină, CD68, CD34, D2-40, CD31, CD21, alfa-actina mușchiului neted, neurofilamente, c-erbB2 (HER-2).

Nestina la nivelul sacului lacrimal se exprimă în celulele endoteliale, în celulele musculare netede din peretele vascular și în celulele mioepiteliale.

Markerul CD68, specific liniei fagocitare, l-am identificat la nivelul celulelor epiteliale de suprafață cât și la nivelul celulelor epiteliale glandulare de la nivelul acinilor seroși. Marcarea cu alfa actina muschiului neted ( $\alpha$ -SMA) m-a ajutat să pun în evidență rețeaua de miofibroblaști de la nivelul stromei sacului lacrimal.

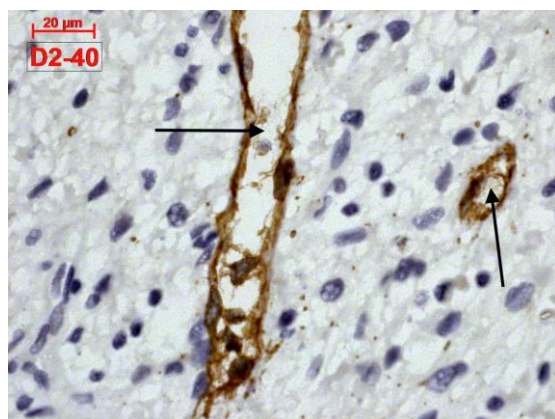


*Sac lacrimal uman adult, imunomarcare cu  $\alpha$ -SMA. Un vas radiar (săgeata) este înglobat în rețeaua miofibroblastică (săgeți cu vârf dublu) și se dihotomizează către un folicul limfoid (vârfuri de săgeți).*

Am emis ipoteza potențialului de transdiferențiere epitelial-mezenchimală în urma marcării cu  $\alpha$ -SMA, când am observat expresia acestui marker la nivelul celulelor epiteliale bazale.

Markerul CD21, l-am pus în evidență în celulele epiteliale și în celulele stromale ale sacului lacrimal.

Cu ajutorul podoplaninei (D2-40), marker specific liniei limfatice, am pus în evidență pentru prima dată existența limfaticelor intrinseci din lamina propria a sacului lacrimal. Podoplanina se exprimă și la nivelul celulelor mioepiteliale și al celulelor epiteliale bazale.



*Colectoare limfatice largi exprimă D2-40; celulele limfatice endoteliale par a proiecta filopode intraluminal (săgeți)*

Pe lamele bidimensionale de imunohistochimie pot apărea structuri celulare cu morfologie telocitară, așa cum este cazul celulelor endoteliale, de exemplu. Pentru a face un diagnostic diferential clar se practică imunomarcarea în tandem cu D2-40 (marchează endoteliile limfatice), CD31 (marchează endoteliile vasculare) și cu CD34. Telocitele exprimă CD34, dar nu și podoplanina sau CD31.

Telocitele sunt celule descoperite în România de către grupul de cercetători aflați sub îndrumarea Prof. Dr. L.M Popescu și cei aflați sub îndrumarea Prof. Dr. Rusu Mugurel. Ele sunt descrise ca celule de mici dimensiuni, situate la nivelul stromei conjunctivale, care prezintă prelungiri lungi și subțiri (telopode) și au o dispoziție moniliformă.

În concluzie, marcarea cu CD31 și CD34 m-a ajutat să pun în evidență și prezența venulelor cu endoteliu înalt (HEV – *high endothelial venules*). De regulă, venulele cu endoteliu înalt se identifică la nivelul foliculilor limfoizi. Limfocitele sunt intrinsec mobile și circulă continuu din sânge, prin țesuturi limfoide secundare și alte țesuturi, apoi înapoi prin limfatice în sânge, proces care se numește recirculația limfocitelor. HEV prezintă o anumită heterogenitate care se extinde și la structurile HEV-like din afara sistemului limfoid. În studiul meu am pus în evidență prezența indiscutabilă a HEV CD31+/CD34+ în structura sacului lacrimal. Acestea sunt structuri care contribuie la definirea SL precum organ limfoid terțiar.

Celulele interstițiale alfa-SMA+ sunt identificate precum miofibroblaști (MF), care sunt intermediari morfologic între fibroblaști și celulele musculare netede (CMN), fiind considerați precum fibroblaști cu caracteristici contractile. Eu am pus în evidență în toate speciemenle imunomarcate expresia consistentă a alfa-SMA în rețele stromale miofibroblastice, ceea ce indică capacitatea contractilă a sacului lacrimal/ductului lacrimo-nazal, calitate funcțională pe care nu am regăsit-o în literatura de specialitate. Această informație structurală vine și completează vechile teorii privind funcția de pompă a sacului lacrimal. Încă din anii 1800 există controversa privind importanța canaliculului lacrimal și sacului lacrimal în drenajul lacrimal<sup>35</sup>. Primele teorii despre drenajul lacrimal s-au bazat pe cercetări anatomice<sup>35</sup>. Von Graefe (1854), cit. de<sup>35</sup>, a susținut faptul că distensia sacului lacrimal prin acțiunea m.orbicular al ochiului absoarbe

lacrimile în punctul lacrimal în timpul închiderii pleoapelor. Rochat și Benjamin (1961), cit.de <sup>35</sup>, au postulat pe baza măsurătorilor creșterii presionale în sacul lacrimal în timpul clipitului faptul că sacul lacrimal este comprimat de orbicularul ochiului în timpul închiderii pleoapelor. Frieberg (1923), cit.de <sup>35</sup>, considera că compresia canaliculelor prin contracția orbicularului ochiului determina trecerea lacrimilor în sacul lacrimal. Relația dintre fasciculul profund al m.pretarsal (mușchiul lacrimal posterior al lui Henke, mușchiul lui Horner) și funcția sacului lacrimal a fost subiectul multor dezbateri <sup>35</sup>. Horner (1822), cit.de <sup>35</sup>, a descris acest mușchi ca pornind de la nivelul osului lacrimal, în dreptul joncțiunii acestuia cu lama papiracee (orbitală) a labirintului etmoidal și după ce se diviza în două părți, acestea se inserau, respectiv, în pleoapa superioară și pleoapa inferioară. Horner a observat inserția porțiunii profunde a mușchiului pretarsal pe fața posterioară a sacului lacrimal și a sugerat rolul acestui mușchi în dilatația sacului lacrimal <sup>35</sup>. Henke (1858), cit.de <sup>35</sup>, considera că mușchiul lacrimal posterior comprima sacul lacrimal în timpul relaxării pleoapelor. Wolfe (1955), cit.de <sup>35</sup>, a propus ca fasciculul profund al mușchiului pretarsal, prin inserțiile sale pe fascia lacrimală, ar fi responsabil de dilatația sacului lacrimal în decursul contracției m.orbicular al ochiului. De când Jones (1957) a descris fasciculul profund al mușchiului preseptal și a insistat asupra importanței acestuia în dilatația sacului lacrimal, mușchiul lui Horner a intrat în penumbră în ceea ce privește rolul său în funcția diafragmei lacrimale <sup>35</sup>.

Receptorul CD21 a fost identificat în limfocitele B mature, și unele linii celulare B limfoblastoide, în timocitele umane, rar în linii celulare T limfoblastoide, în astrocite, epiteliiile cervixului uterin și faringian, ductele glandulare parotidiene și în celulele dendritice foliculare. Faptul că am pus în evidență expresia epitelială, atât în epiteliul de acoperire cât și în epiteliul glandular, a CD21 în sacul lacrimal are justificare. Acest receptor este exprimat în epiteliile ale țesuturilor limfoide asociate mucoaselor (MALT, Mucosal-Associated Lymphoid Tissue) iar infecția cu VEB persistentă poate fi identificată în MALT uman ocular. Intensitatea marcării cu CD21 se corelează cu nivelul de diferențiere epitelială, cel mai slab fiind marcate celulele stem și cele tranzitorii de amplificare – probabil astfel se explică de ce am pus în evidență pe preparate segmente de epitelii negative pentru expresia CD21. A fost sugerat faptul că țesuturile

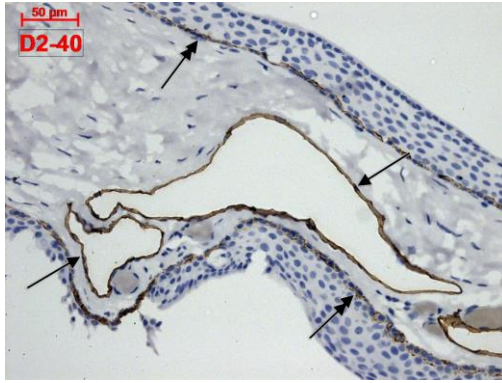


extraoculare ca și alte MALT, au epitelii CD21+ care pot reprezenta ținte pentru infecția cu VEB. Nu în ultimul rând am în vedere evidențe precedente obținute prin studii citomorfologice și imunofenotipice ale existenței MALT în ductul lacrimo-nazal (17 din 41 specimene adulte umane, fără diferențe legate de gen).

Deși corpul cavernos al sacului lacrimal/ductului lacrimo-nazal a fost bine apreciat în anatomie și prin imunohistochimie, nu am identificat detalii privind compoziția limfatică a acestuia. Consider astfel evidențele mele ca fiind primele în ceea ce privește componenta limfatică a sacului lacrimal/ductului lacrimo-nazal.

Suprafața oculară este acoperită de două tipuri de epitelii, conjunctival și corneean, ambele fiind epitelii stratificate nekeratinizate; totuși, celulele conjunctivale sunt diferite biochimic și morfologic de cele corneene, în principal datorită unui fenotip diferit al keratinelor. Conjunctiva este formată din epiteliu stratificat nekeratinizat și variază morfologic de la marginea pleoapei până la limb. Caracterizarea detaliată a epiteliului conjunctival normal prezintă importanță pentru aprecierea modificărilor patologice prin imunohistochimie. Pentru fenotiparea moleculară conjunctivală normală am folosit un set compus din șase anticorpi monoclonali - CD34, D2-40, CD31, CD68, enolaza specifică neuronală, citokeratina 18.

Marcarea cu podoplanina a evidențiat existența unor structuri lacunare la nivelul conjunctivei. Acestea au fost descrise anterior de numeroși autori care le-au studiat prin microscopie confocală in vivo. Ei le-au definit precum *spații negre goale, multiple*, sau ca „*microchisturi* numeroase și largi, *pline cu fluid, hiporeflexive*” sau „*spații intercelulare largi*”. Microscopia confocală nu permite realizarea unui diagnostic citologic și histologic, imunomarcarea în schimb, mi-a permis să pun diagnosticul structural de lacune limfatice conjunctivale.



*Conjunctivă epibulbară umană adultă, imunomarcare cu anticorp anti-D2-40. Anticorpul marchează stratul epitelial bazal (săgeți cu vârf dublu) și lacune limfatice largi (săgeți) plasate subepitelial*

Markerul CD31, cu specificitate pentru linia celulară endotelială se exprimă și la nivelul celulelor epiteliale conjunctivale.

O rețea telocitară bogată, ce îmbracă lacunele limfatice am evidențiat- o folosind markerul CD34.

Markerul CD68, specific pentru monocite și macrofage se exprimă la nivelul conjunctivei și în celulele epiteliale și stromale. Travaglione și colab. (2002) arată că celulele epiteliale pot funcționa ca fagocite profesionale, fiind capabile de macropinocitoză, inclusiv a celulelor apoptotice. În contextul în care epiteliul conjunctival exprimă markeri apoptotici și gene de apoptoză, fagocitele epiteliale conjunctivale pe care le-am evidențiat în imunohistochimie reprezintă o echipare normală a conjunctivei.

În concluzie, având în vedere faptul că am identificat macrofage CD68+ în stroma conjunctivală, aduc aici în discuție faptul că macrofagele au rol în limfangiogenază, după cum urmează. Formarea în exces a vaselor limfatice imature este esențială pentru faza inițială de formare a limfedemului iar acest proces primitiv are deasemenea rol și în patologia ulterioară a limfedemului. Celulele T CD4+ interacționează cu macrofagele pentru a promova limfangiogeneza care, ca și edemul, este puternic redusă la șoareci cu depleție experimentală a macrofagelor. Mecanistic, celulele T-helper activează macrofagele din leziuni să producă VEGF-C care, la rândul lui, promovează limfangiogeneza; inhibiția acestui mecanism suprimă atât limfangiogeneza cât și formarea ulterioară a limfedemului.

Puținele referințe pe care le-am identificat în literatura de specialitate fac referire la posibilitatea transformării epitelial-endoteliale (TEE) și mimetismul vasculogenic (MV) din tumori. Aceste discuții pot fi corelate cu evidența pe care

am obținut-o, cea a fenotipului CD31, deci endotelial, în celule epiteliale conjunctivale. Posibilitatea MV a fost raportată prima oară de către Maniotis și colab. (1999), aceștia descriind potențialul celulelor melanoamelor agresive de a se dediferenția în diferite tipuri celulare, inclusiv celule cu caracteristici endoteliale, celule care ar putea forma structuri de tip vascular care să transporte plasmă și hematii din vasele gazdei. Astfel, TEE din cadrul MV a fost definit de Sun și colab. (2017) ca procesul de diferențiere a celulelor epiteliale tumorale în tipuri celulare specifice, care exprimă markeri endoteliali.

Este foarte probabil ca lacunele întunecate, amorfe, descrise de numeroși autori în antecedente să fie în fapt lacunele limfatice pe care le-am evidențiat în imunohistochimie, cu perete D2-40-pozitiv.

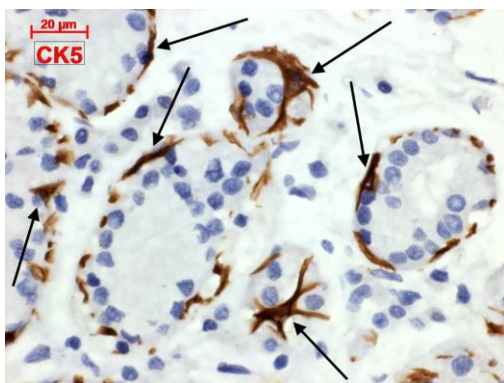
Glanda lacrimală este o glandă exocrină importantă asociată cu sănătatea oculară. În mod normal suprafața oculară este acoperită de un film lacrimal care reprezintă o barieră între această suprafață oculară și mediul exterior <sup>3</sup>. Filmul lacrimal menține pleoapele umede și protejează epiteliile corneean și conjunctival atât de alterări fizice cât și de reacții imune iar glanda lacrimală are un rol fundamental în menținerea suprafeței oculare lubrefiată. Deși glanda lacrimală are funcții fiziologice importante, înțelegerea morfogenezei și patologiei acestei glande sunt limitate de studii incomplete. Sindromul de ochi uscat necesită tratamente efective și nu doar paleative. Dezvoltarea accelerată a medicinei regenerative atrage atenția asupra potențialului mare de regenerare de organ și transplant pentru restaurarea glandei lacrimale. Înțelegerea anatomiei moleculare a glandei lacrimale este importantă astfel pentru a putea dezvolta terapii funcționale sustenabile ale sindromului de ochi uscat și pentru a pune la punct metode de regenerare sau de bioinginerie ale glandei lacrimale.

Pentru realizarea studiului imunohistochimic asupra glandei lacrimale am folosit un panel constituit din 11 anticorpi primari - alfa-actina mușchiului neted, CD117/c-kit, CD34, D2-40, lanțul greu de miozină din mușchiul neted, CD10, CD146, citokeratina 5, Stro-1, neurofilamente, factor von Willebrand.

În literatura modernă există un consens că nișa stem universală este situată perivascular. Expresia CD117/c-kit la nivelul celulelor musculare netede

vasculare nu este așadar ceva surprinzător. Markerul CD117 este specific liniei celulare stem progenitoare.

Citokeratina 5, marker absolut specific liniei celulare epiteliale, se exprimă la nivelul glandei lacrimale în celulele mioepiteliale.



Glandă lacrimală umană adultă.  
Expresia mioepitelială a  
citokeratinei 5 (CK5)

Celulele mioepiteliale, așa cum era de așteptat exprimă și  $\alpha$ -SMA cât și miozina mușchiului neted. Exprimă de asemenea și CD146, acesta este și marker de celule stem mezenchimale pe care îl regăsim și în celulele endoteliale microvasculare ale glandei lacrimale. Am concluzionat așadar, că celulele mioepiteliale ale glandei lacrimale constituie substrat morfologic al regenerării fiziologice.

Markerul von Willebrand, cunoscut ca marker endotelial, l-am pus în evidență la nivelul glandei lacrimale și în celulele epiteliale. Astfel am putut specula în mod rezonabil capacitatea de transdiferențiere epitelial-endotelială.

Podoplanina marchează la nivelul glandei lacrimale limfaticile intrinseci și celulele mioepiteliale.

Am pus din nou problema diagnosticului diferențial al telocitelor. Prin marcarea în tandem cu CD34 și CD10 am demonstrat că este vorba în fapt de celule endoteliale (CD34+) și de celule endoteliale și pericite (CD10+).

Stro-1 este un antigen endotelial de 75kDa exprimat și în celulele stem mezenchimale. La nivelul glandei lacrimale îl regăsim în celule endoteliale vasculare, în celule perivasculare și în celule stromale izolate.

Cu ajutorul anticorpilor anti-neurofilament am pus în evidență prezența de neuroni solitari intraglandulari. Aceștia cel mai probabil sunt migrați de la nivelul ganglionului pterigopalatin.

În concluzie, celulele mioepiteliale se află în diverse glande exocrine, inclusiv în glanda lacrimală. Deși celulele mioepiteliale sunt importante funcțional pentru glanda lacrimală, sunt puține studii anterioare care să fi caracterizat imunohistochimic aceste celule. Unul dintre scopurile acestei cercetări a fost acela de a investiga fenotipul molecular al celulele mioepiteliale din glanda lacrimală.

Expresia podoplaninei (D2-40) a fost demonstrată anterior în celulele mioepiteliale ale glandelor salivare și ale glandelor linguale. S-a sugerat că expresia podoplaninei în celule acinare și celulele mioepiteliale ale glandelor sublinguală și submandibulară ar putea fi legată de excreția de salivă mucoasă. Totuși, deși orbita a fost testată pentru localizarea limfaticelor, puține studii au documentat expresia acestui marker limfatic în celulele mioepiteliale ale glandei lacrimale.

Van der Werf și colab. (1996) au folosit traser retrograd pentru a determina la maimuțe localizarea neuronilor distribuiți glandei lacrimale și au decelat pe preparatele lor neuroni localizați periductal în glanda lacrimală. Acești autori discută faptul că prezența neuronilor în glanda lacrimală nu este excepțională deoarece se cunoaște faptul că neuroni ai ganglionului pterigopalatin pot migra la/în țintele lor tisulare periferice 55.

Adeghate și Singh (1994) au lucrat pe țesut porcine – glandă lacrimală, realizând un studiu imunohistochimic cu anticorpi pentru galanină și leucina-encefalină. Au identificat neuroni multipolari în zonele periacinare și cele interlobulare ale glandei lacrimale. Neuronii respectivi proiectau prelungiri către țesuturile glandulare. Autorii discută faptul că leucina-encefalina este un stimulent puternic al secrețiilor lacrimale și pancreatică. Nu aduc însă și comentarii anatomice privind neuronii intrinseci ai glandei lacrimale umane. Consider că am realizat prima evidență a acestor neuroni solitari intraglandulari la om.

## Concluziile Tezei de Doctorat

1. Expresia epitelială și mioepitelială a podoplaninei la nivelul sistemului lacrimal are importanță deoarece în diagnosticul patologic al tumorilor trebuie evitată confuzia celulelor mioepiteliale podoplanin-pozitive cu carcinomul ductal in situ sau confuzia țesutului normal cu cel cu invazie limfatică tumorală.
2. Componenta epitelială a sistemului eferent ductal lacrimal poate reprezenta un rezervor de fagocite, care poate fi adăugat, constitutiv, la sistemul MALT asociat mucoasei.
3. Rețeaua miofibroblastică de la nivelul sacului lacrimal și ductului lacrimonazal poate reprezenta structura cu proprietăți contractile a acestora ce poate fi considerată în mecanismele de pompă fiziologice.
4. Rețeaua miofibroblastică a sacului lacrimal și ductului lacrimonazal are un fenotip  $\alpha$ -SMA-pozitiv dar h-caldesmon-negativ.
5. Am obiectivat existența limfaticelor intrinseci de la nivelul sacului lacrimal și ductului lacrimonazal. Acest fapt reprezintă un avans al cunoașterii structurale și necesită corelarea cu modificările funcționale și procesele patologice de la nivelul acestor structuri.
6. Stroma conjunctivală are un conținut de macrofage demonstrat care pot contribui la procesul de angiogeneză prin formarea de microvase non- endoteliale cu peretele constituit din celule cu morfologie telocitară. Astfel de macrofage angiogenetice pot exprima CD31 iar microvasele mimetice pot exprima CD68, putând fi însă lipsite de potențialul fagocitar comun.
7. Expresia CD31 în macrofage se detectează cu ușurință pe țesuturi procesate după includere la parafină și poate conduce la erori diagnostice în patologia chirurgicală.
8. La nivelul conjunctivei normale au loc procese de transformare epitelial-mezenchimală care reprezintă atât o premiză fiziologică a regenerării tisulare cât și un substrat favorabil al evoluției patologice spre pterigium.
9. Metodologia de cercetare diferită conduce la rezultate care pot fi interpretate diferit. Astfel, microscopia confocală in vivo a conjunctivei nu poate decela cu acuratețe structurile celulare și caracteristicile lor moleculare, identificând lacune

interpretate speculativ precum edem tisular, microchisturi sau spații intercelulare largi, în timp ce imunohistochimia pentru podoplanină, markerul limfatic, identifică aceste lacune cu certitudine ca fiind lacune limfatice. Rolul fiziologic și cel patologic al lacunelor limfatice conjunctivale este de apreciat în cercetări ulterioare.

10. Lacunele limfatice par a reprezenta o particularitate a conjunctivei. Aceste lacune sunt înglobate într-o rețea de telocite CD34-pozitive.

11. Atunci când se caută discriminarea corectă a telocitelor CD34-pozitive trebuie aplicați încă doi markeri care nu sunt exprimați în telocite: CD31, marker endotelial ce exclude celulele liniei endoteliale și un marker limfatic specific, cum este podoplanina, care dacă este negativ exclude confuzia dintre telocite și celulele endoteliale limfatice.

12. Podoplanina este exprimată în celulele mioepiteliale ale glandei lacrimale, trebuie astfel să fie adăugată în panelul deja cunoscut de markeri imunohistochimici ai acestor celule.

13. Interstițiile glandei lacrimale conțin, însă rar, neuroni solitari. Aceștia pot fi celule migrate distal ale ganglionului pterigopalatin cu rol în reglarea locală. Cantitatea de neuroni solitari lacrimali este însă minoră iar efectul fiziologic nu poate fi relevant.

14. Structuri celulare interstițiale ale glandei lacrimale prezintă morfologii telocitare dar faptul că exprimă CD34 și CD10, precum și lipsa în prezent a unui marker absolut specific al telocitelor, recomandă discriminarea acestora precum celule endoteliale și, respectiv, pericite. Este astfel dificil de considerat că la nivelul glandei lacrimale se localizează telocite.

# Bibliografia Tezei de Doctorat

- 1 Zoukhri, D. Effect of inflammation on lacrimal gland function. *Experimental eye research* **82**, 885-898, doi:10.1016/j.exer.2005.10.018 (2006).
- 2 Zou, X. *et al.* Prevalence and clinical characteristics of dry eye disease in community-based type 2 diabetic patients: the Beixinjing eye study. *BMC ophthalmology* **18**, 117, doi:10.1186/s12886-018-0781-7 (2018).
- 3 Zhou, Y. *et al.* Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *The Journal of clinical investigation* **99**, 2139-2151, doi:10.1172/JCI119387 (1997).
- 4 Zhou, Y., Damsky, C. H. & Fisher, S. J. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *The Journal of clinical investigation* **99**, 2152-2164, doi:10.1172/JCI119388 (1997).
- 5 Zhang, Y. Y. *et al.* CD31 regulates metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma via the ITGB1-FAK-Akt signaling pathway. *Cancer letters* **429**, 29-40, doi:10.1016/j.canlet.2018.05.004 (2018).
- 6 Zhang, X., Zhao, L., Deng, S., Sun, X. & Wang, N. Dry Eye Syndrome in Patients with Diabetes Mellitus: Prevalence, Etiology, and Clinical Characteristics. *Journal of ophthalmology* **2016**, 8201053, doi:10.1155/2016/8201053 (2016).
- 7 Zhang, C., Wu, Q., Cui, Y. & Yu, G. Anatomy of nasolacrimal canal in congenital nasolacrimal duct obstruction - 18 cases retrospective study. *Acta ophthalmologica* **93**, e404-405, doi:10.1111/aos.12615 (2015).
- 8 You, S., Kublin, C. L., Avidan, O., Miyasaki, D. & Zoukhri, D. Isolation and propagation of mesenchymal stem cells from the lacrimal gland. *Investigative ophthalmology & visual science* **52**, 2087-2094, doi:10.1167/iovs.10-5686 (2011).
- 9 You, S. *et al.* Role of epithelial-mesenchymal transition in repair of the lacrimal gland after experimentally induced injury. *Investigative ophthalmology & visual science* **53**, 126-135, doi:10.1167/iovs.11-7893 (2012).
- 10 Yagihashi, S., Yamagishi, S. & Wada, R. Pathology and pathogenetic mechanisms of diabetic neuropathy: correlation with clinical signs and symptoms. *Diabetes research and clinical practice* **77 Suppl 1**, S184-189, doi:10.1016/j.diabres.2007.01.054 (2007).
- 11 Yagihashi, S. Pathology and pathogenetic mechanisms of diabetic neuropathy. *Diabetes Metab. Rev.* **11**, 193-225 (1995).
- 12 Xiao, T. *et al.* Protease-activated receptor-1 (PAR1) promotes epithelial-endothelial transition through Twist1 in hepatocellular carcinoma. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* **37**, 185, doi:10.1186/s13046-018-0858-4 (2018).
- 13 Worth, N. F., Rolfe, B. E., Song, J. & Campbell, G. R. Vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in culture is associated with reorganisation of contractile and cytoskeletal proteins. *Cell motility and the cytoskeleton* **49**, 130-145, doi:10.1002/cm.1027 (2001).
- 14 Wilson, S. E., Liang, Q. & Kim, W. J. Lacrimal gland HGF, KGF, and EGF mRNA levels increase after corneal epithelial wounding. *Investigative ophthalmology & visual science* **40**, 2185-2190 (1999).
- 15 Wentink, M. W. *et al.* CD21 and CD19 deficiency: Two defects in the same complex leading to different disease modalities. *Clinical immunology* **161**, 120-127, doi:10.1016/j.clim.2015.08.010 (2015).
- 16 Wei, A., Hong, J., Sun, X. & Xu, J. Evaluation of age-related changes in human palpebral conjunctiva and meibomian glands by in vivo confocal microscopy. *Cornea* **30**, 1007-1012, doi:10.1097/ICO.0b013e31820ca468 (2011).
- 17 Wang, Y. L., Tan, Y., Satoh, Y. & Ono, K. Morphological changes of myoepithelial cells of mouse lacrimal glands during postnatal development. *Histology and histopathology* **10**, 821-827 (1995).
- 18 Vrapciu, A. D., Rusu, M. C. & Voinea, L. M. Immunohistochemistry of a choroidal melanoma: nestin, CD34 and CD117/c-kit labeling. *Rom J Morphol Embryol* **55**, 437-442 (2014).
- 19 Verdijk, R. M., Pecorella, I. & Mooy, C. M. in *Eye Pathology* 547-731 (Springer, 2015).
- 20 van den Oord, J. J., Sunardhi-Widyaputra, S., Van Damme, B. & De Ley, M. Monoclonal antibody to liver metallothionein: a novel marker for myoepithelial cells. *Pathology, research and practice* **189**, 1187-1190, doi:10.1016/S0344-0338(11)80842-3 (1993).
- 21 Valencia, M. R. P. *et al.* Lacrimal drainage anatomy in the Japanese population. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* **223**, 90-99, doi:10.1016/j.aanat.2019.01.013 (2019).
- 22 Tsuneki, M. *et al.* Podoplanin is a novel myoepithelial cell marker in pleomorphic adenoma and other salivary gland tumors with myoepithelial differentiation. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* **462**, 297-305, doi:10.1007/s00428-012-1359-z (2013).
- 23 Tripathi, B. J. & Tripathi, R. C. Evidence for the neuroectodermal origin of the human lacrimal gland. *Investigative ophthalmology & visual science* **31**, 393-395 (1990).



- 24 Travaglione, S. *et al.* Epithelial cells and expression of the phagocytic marker CD68: scavenging of apoptotic bodies following Rho activation. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **16**, 405-411 (2002).
- 25 Toshida, H., Nguyen, D. H., Beuerman, R. W. & Murakami, A. Evaluation of novel dry eye model: preganglionic parasympathetic denervation in rabbit. *Investigative ophthalmology & visual science* **48**, 4468-4475, doi:10.1167/iovs.06-1486 (2007).
- 26 Thompson, E., Pembrey, M. & Graham, J. M. Phenotypic variation in LADD syndrome. *Journal of medical genetics* **22**, 382-385 (1985).
- 27 Tanaka, Y. *et al.* CD31 expressed on distinctive T cell subsets is a preferential amplifier of beta 1 integrin-mediated adhesion. *The Journal of experimental medicine* **176**, 245-253, doi:10.1084/jem.176.1.245 (1992).
- 28 Tanaka, M. *et al.* Tubular epithelial cells have the capacity to transdifferentiate into CD68-positive macrophage-like cells by oxidative stress. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* **57**, 593-600, doi:10.1007/s00011-008-7171-1 (2008).
- 29 Tammela, T. & Alitalo, K. Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise. *Cell* **140**, 460-476, doi:10.1016/j.cell.2010.01.045 (2010).
- 30 Sun, B., Zhang, D., Zhao, N. & Zhao, X. Epithelial-to-endothelial transition and cancer stem cells: two cornerstones of vasculogenic mimicry in malignant tumors. *Oncotarget* **8**, 30502-30510, doi:10.18632/oncotarget.8461 (2017).
- 31 Stranford, S. & Ruddle, N. H. Follicular dendritic cells, conduits, lymphatic vessels, and high endothelial venules in tertiary lymphoid organs: Parallels with lymph node stroma. *Frontiers in immunology* **3**, 350, doi:10.3389/fimmu.2012.00350 (2012).
- 32 Stifter, S., Patrinicola, F., Taverna, G. & Grizzi, F. in *Biochemical Basis and Therapeutic Implications of Angiogenesis* 241-256 (Springer, 2017).
- 33 Standing, S. *Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice.* (Elsevier Health Sciences, 2015).
- 34 Singh, D. *et al.* The conjunctival lymphatic system. *Ann. Ophthalmol.* **35**, 99-104 (2003).
- 35 Shinohara, H., Taniguchi, Y., Kominami, R., Yasutaka, S. & Kawamata, S. The lacrimal fascia redefined. *Clinical anatomy* **14**, 401-405, doi:10.1002/ca.1074 (2001).
- 36 Seifart, U. & Stempel, I. [The dry eye and diabetes mellitus]. *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* **91**, 235-239 (1994).
- 37 Schechter, J. E., Warren, D. W. & Mircheff, A. K. A lacrimal gland is a lacrimal gland, but rodent's and rabbit's are not human. *The ocular surface* **8**, 111-134 (2010).
- 38 Sanchez-Céspedes, R. *et al.* Use of CD10 as a marker of canine mammary myoepithelial cells. *Veterinary journal* **195**, 192-199, doi:10.1016/j.tvjl.2012.06.003 (2013).
- 39 Rzucidlo, E. M., Martin, K. A. & Powell, R. J. Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *Journal of vascular surgery* **45 Suppl A**, A25-32, doi:10.1016/j.jvs.2007.03.001 (2007).
- 40 Rusu, M. C. *et al.* Transdifferentiations and heterogeneity in the stromal niches of uterine leiomyomas. *Rom J Morphol Embryol* **59**, 663-672 (2018).
- 41 Rusu, M. C., Mogoanta, L., Pop, F. & Dobra, M. A. Molecular phenotypes of the human kidney: Myoid stromal cells/telocytes and myoepithelial cells. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* **218**, 95-104, doi:10.1016/j.aanat.2017.12.015 (2018).
- 42 Ruskell, G. L. Nerve terminals and epithelial cell variety in the human lacrimal gland. *Cell and tissue research* **158**, 121-136, doi:10.1007/bf00219955 (1975).
- 43 Rosa, I. *et al.* Telocytes constitute a widespread interstitial meshwork in the lamina propria and underlying striated muscle of human tongue. *Sci. Rep.* **9**, 5858 (2019).
- 44 Reis-Filho, J. S. *et al.* Novel and classic myoepithelial/stem cell markers in metaplastic carcinomas of the breast. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM* **11**, 1-8, doi:10.1097/00129039-200303000-00001 (2003).
- 45 Reinoso, R. *et al.* Topographical distribution and characterization of epithelial cells and intraepithelial lymphocytes in the human ocular mucosa. *Mucosal immunology* **5**, 455-467, doi:10.1038/mi.2012.27 (2012).
- 46 Rath, R., Stave, J., Guthoff, R., Giebel, J. & Tost, F. [In vivo imaging of the conjunctival epithelium using confocal laser scanning microscopy]. *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* **103**, 401-405, doi:10.1007/s00347-006-1337-4 (2006).
- 47 Popescu, L. M. & Faussone-Pellegrini, M. S. TELOCYTES - a case of serendipity: the winding way from Interstitial Cells of Cajal (ICC), via Interstitial Cajal-Like Cells (ICLC) to TELOCYTES. *Journal of cellular and molecular medicine* **14**, 729-740, doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01059.x (2010).
- 48 Petrea, C. E., Craitoiu, S., Vrapciu, A. D., Manoiu, V. S. & Rusu, M. C. The telopode- and filopode-projecting heterogeneous stromal cells of the human sclera niche. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* **218**, 129-140, doi:10.1016/j.aanat.2017.12.013 (2018).
- 49 Petrea, C. E. *Cercetări exploratorii ale nișelor stromale oculare* Dr.Med. thesis, Universitatea de Medicină și Farmacie Carol Davila, (2018).
- 50 Paulsen, F. P., Paulsen, J. L., Thale, A. B., Schaudig, U. & Tillmann, B. N. Organized mucosa-associated lymphoid tissue in human nasolacrimal ducts. *Advances in experimental medicine and biology* **506**, 873-876 (2002).

- 51 Paulsen, F. *et al.* Functional anatomy of human lacrimal duct epithelium. *Anatomy and embryology* **198**, 1-12 (1998).
- 52 Paulsen, F. *et al.* [Anatomy and physiology of the nasolacrimal ducts]. *Hno* **64**, 354-366, doi:10.1007/s00106-016-0164-4 (2016).
- 53 Paulsen, F. *The human nasolacrimal ducts*. Vol. 170 1-106 (Springer Science & Business Media, 2003).
- 54 Paladino, G. *et al.* Cytokeratin expression in primary epithelial cell culture from bovine conjunctiva. *Tissue & cell* **36**, 323-332, doi:10.1016/j.tice.2004.05.003 (2004).
- 55 Ornek, K., Atilla, H. & Zilelioglu, G. Pediatric alacrima, achalasia, and mental retardation. *Journal of AAPOS : the official publication of the American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus* **6**, 261-263, doi:10.1067/mpa.2002.124653 (2002).
- 56 Ohtani, O. & Ohtani, Y. Organization and developmental aspects of lymphatic vessels. *Archives of histology and cytology* **71**, 1-22 (2008).
- 57 Ogata, F. *et al.* Excess Lymphangiogenesis Cooperatively Induced by Macrophages and CD4(+) T Cells Drives the Pathogenesis of Lymphedema. *The Journal of investigative dermatology* **136**, 706-714, doi:10.1016/j.jid.2015.12.001 (2016).
- 58 Obata, H. Anatomy and histopathology of the human lacrimal gland. *Cornea* **25**, S82-89, doi:10.1097/01.ico.0000247220.18295.d3 (2006).
- 59 Noda, Y., Amano, I., Hata, M., Kojima, H. & Sawa, Y. Immunohistochemical examination on the distribution of cells expressed lymphatic endothelial marker podoplanin and LYVE-1 in the mouse tongue tissue. *Acta Histochem Cytochem* **43**, 61-68, doi:10.1267/ahc.10008 (2010).
- 60 Ning, H., Lin, G., Lue, T. F. & Lin, C. S. Mesenchymal stem cell marker Stro-1 is a 75 kd endothelial antigen. *Biochemical and biophysical research communications* **413**, 353-357, doi:10.1016/j.bbrc.2011.08.104 (2011).
- 61 Nekouzadeh, A., Pryse, K. M., Elson, E. L. & Genin, G. M. Stretch-activated force shedding, force recovery, and cytoskeletal remodeling in contractile fibroblasts. *Journal of biomechanics* **41**, 2964-2971, doi:10.1016/j.jbiomech.2008.07.033 (2008).
- 62 Najafi, L., Malek, M., Valojerdi, A. E., Khamseh, M. E. & Aghaei, H. Dry eye disease in type 2 diabetes mellitus; comparison of the tear osmolarity test with other common diagnostic tests: a diagnostic accuracy study using STARD standard. *Journal of diabetes and metabolic disorders* **14**, 39, doi:10.1186/s40200-015-0157-y (2015).
- 63 Nadri, S., Soleimani, M., Kiani, J., Atashi, A. & Izadpanah, R. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human eye conjunctiva stromal cells. *Differentiation; research in biological diversity* **76**, 223-231, doi:10.1111/j.1432-0436.2007.00216.x (2008).
- 64 Moore, K. L., Dalley, A. F. & Agur, A. M. *Clinically oriented anatomy*. (Lippincott Williams & Wilkins, 2013).
- 65 Miyasaka, M. & Tanaka, T. Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nature reviews. Immunology* **4**, 360-370, doi:10.1038/nri1354 (2004).
- 66 Merjava, S., Neuwirth, A., Tanzerova, M. & Jirsova, K. The spectrum of cytokeratins expressed in the adult human cornea, limbus and perilimbal conjunctiva. *Histology and histopathology* **26**, 323-331, doi:10.14670/HH-26.323 (2011).
- 67 McKenney, J. K., Weiss, S. W. & Folpe, A. L. CD31 expression in intratumoral macrophages: a potential diagnostic pitfall. *The American journal of surgical pathology* **25**, 1167-1173 (2001).
- 68 McDonald, D. M. & Foss, A. J. Endothelial cells of tumor vessels: abnormal but not absent. *Cancer metastasis reviews* **19**, 109-120 (2000).
- 69 Marquez, J. P., Elson, E. L. & Genin, G. M. Whole cell mechanics of contractile fibroblasts: relations between effective cellular and extracellular matrix moduli. *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences* **368**, 635-654, doi:10.1098/rsta.2009.0240 (2010).
- 70 Marelli-Berg, F. M., Clement, M., Mauro, C. & Caligiuri, G. An immunologist's guide to CD31 function in T-cells. *Journal of cell science* **126**, 2343-2352, doi:10.1242/jcs.124099 (2013).
- 71 Lynch, T. J. *et al.* Submucosal Gland Myoepithelial Cells Are Reserve Stem Cells That Can Regenerate Mouse Tracheal Epithelium. *Cell stem cell* **22**, 779, doi:10.1016/j.stem.2018.04.007 (2018).
- 72 Lu, S. *et al.* Localized lymphedema (elephantiasis): a case series and review of the literature. *Journal of cutaneous pathology* **36**, 1-20, doi:10.1111/j.1600-0560.2008.00990.x (2009).
- 73 Lu, L. L. *et al.* Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica* **91**, 1017-1026 (2006).
- 74 Lemullois, M., Rossignol, B. & Mauduit, P. Immunolocalization of myoepithelial cells in isolated acini of rat exorbital lacrimal gland: cellular distribution of muscarinic receptors. *Biology of the cell* **86**, 175-181 (1996).
- 75 Lemp, M. A. Dry eye (Keratoconjunctivitis Sicca), rheumatoid arthritis, and Sjogren's syndrome. *American journal of ophthalmology* **140**, 898-899, doi:10.1016/j.ajo.2005.06.031 (2005).
- 76 Kuroda, N. Application of combined immunohistochemical panel of AMACR(P504S)/p63 cocktail, cytokeratin 5 and D2-40 to atypical glands in prostatic needle biopsy. *The Malaysian journal of pathology* **36**, 169-173 (2014).
- 77 Kunisch, E. *et al.* Macrophage specificity of three anti-CD68 monoclonal antibodies (KP1, EBM11, and PGM1) widely used for immunohistochemistry and flow cytometry. *Ann. Rheum. Dis.* **63**, 774-784 (2004).

- 78 Krenzer, K. L. & Freddo, T. F. Cytokeratin expression in normal human bulbar conjunctiva obtained by  
impression cytology. *Investigative ophthalmology & visual science* **38**, 142-152 (1997).
- 79 Knop, N. & Knop, E. Conjunctiva-associated lymphoid tissue in the human eye. *Investigative  
ophthalmology & visual science* **41**, 1270-1279 (2000).
- 80 Kim, Y. S. *et al.* Epstein-Barr virus and CD21 expression in gastrointestinal tumors. *Pathology, research  
and practice* **194**, 705-711, doi:10.1016/S0344-0338(98)80130-1 (1998).
- 81 Kanner, W. A., Galgano, M. T. & Atkins, K. A. Podoplanin expression in basal and myoepithelial cells:  
utility and potential pitfalls. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM* **18**, 226-  
230, doi:10.1097/PAI.0b013e3181c65141 (2010).
- 82 Kakizaki, H. *et al.* The lacrimal canaliculus and sac bordered by the Horner's muscle form the functional  
lacrimal drainage system. *Ophthalmology* **112**, 710-716, doi:10.1016/j.ophtha.2004.11.043 (2005).
- 83 Kakizaki, H. *et al.* Punctal and canalicular anatomy: implications for canalicular occlusion in severe dry  
eye. *American journal of ophthalmology* **153**, 229-237 e221, doi:10.1016/j.ajo.2011.07.010 (2012).
- 84 Kakizaki, H. [Medial canthal anatomy and the lacrimal drainage system]. *Nippon Ganka Gakkai zasshi*  
**111**, 857-863 (2007).
- 85 Kaiserman, I., Kaiserman, N., Nakar, S. & Vinker, S. Dry eye in diabetic patients. *American journal of  
ophthalmology* **139**, 498-503, doi:10.1016/j.ajo.2004.10.022 (2005).
- 86 Jones, L. T. The lacrimal secretory system and its treatment. *American journal of ophthalmology* **62**, 47-  
60 (1966).
- 87 Jones, L. T. Epiphora. II. Its relation to the anatomic structures and surgery of the medial canthal region.  
*American journal of ophthalmology* **43**, 203-212 (1957).
- 88 Jha, S. K., Rauniyar, K. & Jeltsch, M. Key molecules in lymphatic development, function, and  
identification. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische  
Gesellschaft* **219**, 25-34, doi:10.1016/j.aanat.2018.05.003 (2018).
- 89 Janssen, A. G., Mansour, K., Bos, J. J. & Castelijn, J. A. Diameter of the bony lacrimal canal: normal  
values and values related to nasolacrimal duct obstruction: assessment with CT. *AJNR. American journal  
of neuroradiology* **22**, 845-850 (2001).
- 90 Iruela-Arispe, M. L. Normal placentation: a tale that requires an epithelial-to-endothelial conversion. *The  
Journal of clinical investigation* **99**, 2057-2058, doi:10.1172/JCI119374 (1997).
- 91 Hudon-David, F., Bouzegrane, F., Couture, P. & Thibault, G. Thy-1 expression by cardiac fibroblasts:  
lack of association with myofibroblast contractile markers. *Journal of molecular and cellular cardiology*  
**42**, 991-1000, doi:10.1016/j.yjmcc.2007.02.009 (2007).
- 92 Hu, V. H. *et al.* In vivo confocal microscopy in scarring trachoma. *Ophthalmology* **118**, 2138-2146,  
doi:10.1016/j.ophtha.2011.04.014 (2011).
- 93 Hu, V. H. *et al.* In vivo confocal microscopy of trachoma in relation to normal tarsal conjunctiva.  
*Ophthalmology* **118**, 747-754, doi:10.1016/j.ophtha.2010.08.029 (2011).
- 94 Hu, V. H. *et al.* In vivo confocal microscopy and histopathology of the conjunctiva in trachomatous  
scarring and normal tissue: a systematic comparison. *The British journal of ophthalmology* **97**, 1333-  
1337, doi:10.1136/bjophthalmol-2013-303126 (2013).
- 95 Hollsten, D. A. Complications of lacrimal surgery. *International ophthalmology clinics* **32**, 49-66,  
doi:10.1097/00004397-199223000-00005 (1992).
- 96 Hattori, H. Caution should be taken in using CD31 for distinguishing the vasculature of lymph nodes.  
*Journal of clinical pathology* **56**, 638-639 (2003).
- 97 Hata, M., Ueki, T., Sato, A., Kojima, H. & Sawa, Y. Expression of podoplanin in the mouse salivary  
glands. *Archives of oral biology* **53**, 835-841, doi:10.1016/j.archoralbio.2008.02.006 (2008).
- 98 Hasegawa, M. *et al.* CD109, a new marker for myoepithelial cells of mammary, salivary, and lacrimal  
glands and prostate basal cells. *Pathology international* **57**, 245-250, doi:10.1111/j.1440-  
1827.2007.02097.x (2007).
- 99 Gupta, N. *et al.* Alacrima, a rare cause of pediatric dry eye. *Journal of AAPOS : the official publication  
of the American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus* **22**, 233-235,  
doi:10.1016/j.jaapos.2017.11.003 (2018).
- 100 Gupta, A., Prabhakaran, V. C., Dodd, T. & Selva, D. Characterization of lacrimal sac histology: an  
immunohistochemical study. *Clinical & experimental ophthalmology* **40**, 869-873, doi:10.1111/j.1442-  
9071.2012.02818.x (2012).
- 101 Gruntzig, J. & Hollmann, F. Lymphatic vessels of the eye - old questions - new insights. *Annals of  
anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* **221**, 1-16,  
doi:10.1016/j.aanat.2018.08.004 (2019).
- 102 Gray, H. *et al.* *Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice*. 41 edn, 620 (Elsevier, 2016).
- 103 Girard, J. P. & Springer, T. A. High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for  
lymphocyte migration. *Immunology today* **16**, 449-457 (1995).
- 104 Gillies, P. J. *et al.* Demonstration of P-selectin expression and potential function in human corneal  
epithelial cells. *Experimental eye research* **176**, 196-206, doi:10.1016/j.exer.2018.07.018 (2018).
- 105 Garg, A. & Zhang, X. Lacrimal gland development: From signaling interactions to regenerative  
medicine. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*  
**246**, 970-980, doi:10.1002/dvdy.24551 (2017).

- 106 Gama, A., Paredes, J., Albergaria, A., Gartner, F. & Schmitt, F. P-cadherin expression in canine mammary tissues. *Journal of comparative pathology* **130**, 13-20, doi:10.1016/s0021-9975(03)00064-1 (2004).
- 107 Gama, A., Gartner, F., Alves, A. & Schmitt, F. Immunohistochemical expression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) in canine mammary tissues. *Research in veterinary science* **87**, 432-437, doi:10.1016/j.rvsc.2009.04.016 (2009).
- 108 Freemont, A. J. Functional and biosynthetic changes in endothelial cells of vessels in chronically inflamed tissues: evidence for endothelial control of lymphocyte entry into diseased tissues. *J Pathol* **155**, 225-230, doi:10.1002/path.1711550308 (1988).
- 109 Foschini, M. P., Scarpellini, F., Gown, A. M. & Eusebi, V. Differential Expression of Myoepithelial Markers in Salivary, Sweat and Mammary Glands. *International journal of surgical pathology* **8**, 29-37, doi:10.1177/106689690000800108 (2000).
- 110 Fischer, E. M. *et al.* Expression of CD21 is developmentally regulated during thymic maturation of human T lymphocytes. *International immunology* **11**, 1841-1849 (1999).
- 111 Fayet, B., Racy, E., Assouline, M. & Zerbib, M. Surgical anatomy of the lacrimal fossa a prospective computed tomodensitometry scan analysis. *Ophthalmology* **112**, 1119-1128, doi:10.1016/j.ophtha.2005.01.012 (2005).
- 112 Falzano, L. *et al.* Induction of phagocytic behaviour in human epithelial cells by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor type 1. *Molecular microbiology* **9**, 1247-1254 (1993).
- 113 Entessarian, M. *et al.* FGF10 missense mutations in aplasia of lacrimal and salivary glands (ALSG). *European journal of human genetics : EJHG* **15**, 379-382, doi:10.1038/sj.ejhg.5201762 (2007).
- 114 Elad, D., Wolf, M. & Keck, T. Air-conditioning in the human nasal cavity. *Respiratory physiology & neurobiology* **163**, 121-127, doi:10.1016/j.resp.2008.05.002 (2008).
- 115 Efron, N., Al-Dossari, M. & Pritchard, N. In vivo confocal microscopy of the bulbar conjunctiva. *Clinical & experimental ophthalmology* **37**, 335-344, doi:10.1111/j.1442-9071.2009.02065.x (2009).
- 116 Efron, N., Al-Dossari, M. & Pritchard, N. In vivo confocal microscopy of the palpebral conjunctiva and tarsal plate. *Optometry and vision science : official publication of the American Academy of Optometry* **86**, E1303-1308, doi:10.1097/OPX.0b013e3181bc652e (2009).
- 117 Diaz-Flores, L. *et al.* Behaviour of telocytes during physiopathological activation. *Seminars in cell & developmental biology* **55**, 50-61, doi:10.1016/j.semcdb.2016.01.035 (2016).
- 118 Deugnier, M. A., Teuliere, J., Faraldo, M. M., Thiery, J. P. & Glukhova, M. A. The importance of being a myoepithelial cell. *Breast cancer research : BCR* **4**, 224-230, doi:10.1186/bcr459 (2002).
- 119 Dean, C., Ito, M., Makarenkova, H. P., Faber, S. C. & Lang, R. A. Bmp7 regulates branching morphogenesis of the lacrimal gland by promoting mesenchymal proliferation and condensation. *Development* **131**, 4155-4165, doi:10.1242/dev.01285 (2004).
- 120 de la Cuadra-Blanco, C., Peces-Pena, M. D. & Merida-Velasco, J. R. Morphogenesis of the human lacrimal gland. *Journal of anatomy* **203**, 531-536 (2003).
- 121 Crouse, C. A., Pflugfelder, S. C., Cleary, T., Demick, S. M. & Atherton, S. S. Detection of Epstein-Barr virus genomes in normal human lacrimal glands. *Journal of clinical microbiology* **28**, 1026-1032 (1990).
- 122 Corben, A. D. & Lerwill, M. F. Use of Myoepithelial Cell Markers in the Differential Diagnosis of Benign, In situ, and Invasive Lesions of the Breast. *Surg. Pathol. Clin.* **2**, 351-373, doi:10.1016/j.path.2009.02.003 (2009).
- 123 Ciftci, F., Dinc, U. A. & Ozturk, V. The importance of lacrimal diaphragm and periosteum suturation in external dacryocystorhinostomy. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg* **26**, 254-258, doi:10.1097/IOP.0b013e3181bb5942 (2010).
- 124 Ciancaglini, M. *et al.* Conjunctival modifications in ocular hypertension and primary open angle glaucoma: an in vivo confocal microscopy study. *Investigative ophthalmology & visual science* **49**, 3042-3048, doi:10.1167/iovs.07-1201 (2008).
- 125 Chavis, R. M., Welham, R. A. & Maisey, M. N. Quantitative lacrimal scintillography. *Archives of ophthalmology* **96**, 2066-2068, doi:10.1001/archoph.1978.03910060454013 (1978).
- 126 Chaudhry, A. P., Schmutz, J. A., Cutler, L. S. & Sunderraj, M. Prenatal and postnatal histogenesis of myoepithelium in hamster submandibular gland. An ultrastructural study. *Journal of submicroscopic cytology* **15**, 787-798 (1983).
- 127 Chapman, D. B., Shashi, V. & Kirse, D. J. Case report: aplasia of the lacrimal and major salivary glands (ALSG). *International journal of pediatric otorhinolaryngology* **73**, 899-901, doi:10.1016/j.ijporl.2009.03.004 (2009).
- 128 Bouhenni, R. A. *et al.* Lymphatic and Blood Vessel Density in Human Conjunctiva After Glaucoma Filtration Surgery. *Journal of glaucoma* **25**, e35-38, doi:10.1097/IJG.0000000000000199 (2016).
- 129 Bisaria, K. K. *et al.* The lacrimal fossa in Indians. *Journal of anatomy* **166**, 265-268 (1989).
- 130 Birke, K., Lutjen-Drecoll, E., Kerjaschki, D. & Birke, M. T. Expression of podoplanin and other lymphatic markers in the human anterior eye segment. *Investigative ophthalmology & visual science* **51**, 344-354, doi:10.1167/iovs.08-3307 (2010).
- 131 Beranek, J. CD68 is not a macrophage-specific antigen. *Ann. Rheum. Dis.* **64**, 342-344 (2005).
- 132 Becker, B. B. Tricompartment model of the lacrimal pump mechanism. *Ophthalmology* **99**, 1139-1145, doi:10.1016/s0161-6420(92)31839-1 (1992).

- 133 Beamish, J. A., He, P., Kottke-Marchant, K. & Marchant, R. E. Molecular regulation of contractile smooth muscle cell phenotype: implications for vascular tissue engineering. *Tissue engineering. Part B, Reviews* **16**, 467-491, doi:10.1089/ten.TEB.2009.0630 (2010).
- 134 Batistatou, A., Stefanou, D., Arkoumani, E. & Agnantis, N. J. The usefulness of p63 as a marker of breast myoepithelial cells. *In vivo* **17**, 573-576 (2003).
- 135 Barnett, F. H. *et al.* Macrophages form functional vascular mimicry channels in vivo. *Scientific reports* **6**, 36659, doi:10.1038/srep36659 (2016).
- 136 Bara, R. I., Voinea, L. M., Vrapciu, A. D. & Rusu, M. C. Adding myofibroblasts to the lacrimal pump. *Acta histochemica*, 151536, doi:10.1016/j.acthis.2020.151536 (2020).
- 137 Bajenoff, M. *et al.* Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. *Immunity* **25**, 989-1001, doi:10.1016/j.immuni.2006.10.011 (2006).
- 138 Asproudis, I. *et al.* Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma of the lacrimal gland--a case report. *In vivo* **19**, 1105-1109 (2005).
- 139 Amano, I., Imaizumi, Y., Kaji, C., Kojima, H. & Sawa, Y. Expression of podoplanin and classical cadherins in salivary gland epithelial cells of klotho-deficient mice. *Acta Histochem Cytochem* **44**, 267-276, doi:10.1267/ahc.11037 (2011).
- 140 Alwohaib, M., Schellini, S. A., Elkhamary, S. M. & Al Shaikh, O. Isolated bilateral congenital lacrimal gland agenesis - Report of two cases. *Saudi journal of ophthalmology : official journal of the Saudi Ophthalmological Society* **31**, 257-259, doi:10.1016/j.sjopt.2017.04.008 (2017).
- 141 Albuquerque, R. J. *et al.* Alternatively spliced vascular endothelial growth factor receptor-2 is an essential endogenous inhibitor of lymphatic vessel growth. *Nature medicine* **15**, 1023-1030, doi:10.1038/nm.2018 (2009).
- 142 Akrami, H. *et al.* Evaluation of RPE65, CRALBP, VEGF, CD68, and tyrosinase gene expression in human retinal pigment epithelial cells cultured on amniotic membrane. *Biochemical genetics* **49**, 313-322, doi:10.1007/s10528-010-9409-1 (2011).
- 143 Ahl, N. C. & Hill, J. C. Horner's muscle and the lacrimal system. *Archives of ophthalmology* **100**, 488-493, doi:10.1001/archophth.1982.01030030490025 (1982).
- 144 Ahearn, J. M. & Fearon, D. T. Structure and function of the complement receptors, CR1 (CD35) and CR2 (CD21). *Advances in immunology* **46**, 183-219 (1989).