

Ricerca Clinica e di Base

La ricerca nell'Occhio Secco: Rapporto del Sottocomitato Ricerca del Workshop Internazionale dell'Occhio Secco (2007)

ABSTRACT. I membri del Sottocomitato Ricerca del DEWS hanno esaminato i dati in letteratura relativi meccanismi base della malattia dell'occhio secco. Sono state valutate le evidenze scientifiche riguardanti il film lacrimale, la ghiandola lacrimale primaria e le ghiandole lacrimali accessorie, gli epitelii della superficie oculare (incluse cornea e congiuntiva), le ghiandole di Meibomio, il sistema dei dotti lacrimali e il sistema immunitario. Sono state fatte delle considerazioni sui dati di ricerca su animali e sull'uomo. Sono stati presentati i risultati che evidenziano le attuali conoscenze supportate dai riferimenti bibliografici. Si è tentato di delineare le aree che necessitano di ulteriori indagini.

PAROLE CHIAVE: DEWS, occhio secco, Workshop dell'occhio secco, meccanismi dell'occhio secco, patogenesi dell'occhio secco

I. INTRODUZIONE

I membri del Sottocomitato di Ricerca sono stati divisi in gruppi secondo le loro particolari esperienze ed è stato chiesto loro di rivedere le evidenze scientifiche per i meccanismi alla base della patogenesi dell'occhio secco.

Per facilitare questo processo, è stato sviluppato uno schema standardizzato (DEWS Research Committee Report Form - *Appendice 1* [visibile sul sito: www.tearfilm.org]), che è stato utilizzato dai membri per presentare i loro risultati. Sulla base delle informazioni scaturite dai vari resoconti, sono stati sviluppati gli schemi con i dati.

Membri del Sottocomitato Ricerca: Ilene K. Gipson, PhD (Chair); Pablo Argüeso, PhD; Roger Beuerman, PhD; Stefano Bonini, MD; Igor Butovich, PhD; Reza Dana, MD, MPH; Darlene Dartt, PhD; Dan Gamache, PhD; Bryan Ham, PhD; Marcia Jumblatt, PhD; Donald Korb, OD; Friederich Kruse, MD; Yoko Ogawa, MD; Friedrich Paulsen, MD, PhD; Michael Stern, PhD; Deborah F. Sweeney, PhD; John Tiffany, PhD; John Ubels, PhD; Mark Willcox, PhD.

Si potrà avere accesso agli articoli originali presso: www.tearfilm.org.

La corrispondenza legata a questo capitolo del rapporto DEWS dovrebbe essere indirizzata a: Ilene K. Gipson PhD, Schepens Eye Research Inst, 20 Staniford Street, Boston, MA 02114-2500. Tel: 617-912-0210. Fax: 617-912-0126. Email: gipson@vision.eri.harvard.edu

Pablo Argüeso ha partecipato alla redazione di questo manoscritto.

Sono state valutate le evidenze scientifiche relative al film lacrimale, alla ghiandola lacrimale primaria, alle ghiandole lacrimali accessorie, agli epitelii della superficie oculare (incluse cornea e congiuntiva), alle ghiandole di Meibomio, al sistema dei dotti lacrimali e al sistema immunitario. Sono state fatte delle considerazioni sui dati ottenuti da studi su modelli animali e sull'uomo. I risultati sono stati riportati in schemi informativi che identificano le attuali conoscenze, la bibliografia di supporto e delineano le aree che necessitano ulteriori indagini.

II. OBIETTIVI DEL SOTTOCOMITATO RICERCA

Gli obiettivi del Sottocomitato Ricerca sono stati i seguenti:
A. Valutare se esistono evidenze sufficienti a definire i meccanismi alla base della malattia dell'occhio secco.

1. Riassumere le conoscenze attuali riguardo le alterazioni primarie e/o le risposte secondarie delle seguenti componenti sistemiche e oculari che contribuiscono alla disfunzione del film lacrimale.
 - a. Film lacrimale.
 - b. Ghiandola lacrimale primaria e ghiandole lacrimali accessorie.
 - c. Epitelii della superficie oculare: cornea e congiuntiva.
 - d. Ghiandole di Meibomio.
 - e. Sistema dei dotti lacrimali.
 - f. Sistema immunitario.

2. Creare una tabella con tutte le informazioni per identificare le aree in cui le attuali conoscenze sono insufficienti e per determinare se esistono dei meccanismi patogenetici comuni alla base della patologia dell'occhio secco.

3. Identificare le aree in cui le informazioni cliniche sono disponibili o insufficienti.

B. Sulla base dei dati derivanti dalla Sezione A, rispondere alla domanda 2: le conoscenze di base sul meccanismo dell'occhio secco sono sufficienti per determinare il modo in cui questo dà origine ai sintomi della malattia?
C. Sviluppare, se possibile, delle definizioni del meccanismo patogenetico dell'occhio secco o sviluppare delle ipotesi che potrebbero essere testate.

STRUTTURA DEL CAPITOLO

- I. Introduzione
- II. Obiettivi del Sottocomitato Ricerca
- III. Le lacrime e il film lacrimale
 - A. La patologia nell'uomo
 - B. Modelli animali di occhio secco
- IV. Superficie oculare
 - A. La patologia nell'uomo
 - B. Modelli *in vitro* e animali
- V. Sistema immunitario
 - A. La patologia nell'uomo
 - B. Modelli animali e *in vitro* dell'occhio secco - Sistema immunitario
- VI. Ipotesi del meccanismo dell'infiammazione acuta e cronica nella malattia dell'occhio secco
- VII. Ghiandola lacrimale primaria/ghiandole accessorie/dotto nasolacrimale
 - A. La patologia nell'uomo
 - B. Modelli *in vitro* e animali
- VIII. Ghiandole di Meibomio
 - A. La patologia nell'uomo
 - B. Modelli *in vitro* e animali
- IX. Meccanismi alla base della patologia dell'occhio secco

III. LE LACRIME E IL FILM LACRIMALE**A. La patologia nell'uomo**

Le evidenze presentate nell'ultimo Rapporto del Workshop dell'occhio secco (*National Eye Institute [NEI]/ Industry Workshop* del 1995, qui definito il «Workshop del 1995») hanno suggerito che l'osmolarità del film lacrimale aumenta in tutte le forme di occhio secco (DE) e che il volume lacrimale e alcune proteine del film lacrimale, come lisozima e lattoferrina, diminuiscono nell'occhio secco da deficit della componente acquosa⁽¹⁾. E' stata riconosciuta anche una forma di occhio secco evaporativo causata, ad esempio, da un'alterazione dell'integrità dello strato lipidico del film lacrimale.

Le evidenze emerse successivamente al Workshop del '95 indicano che nel DE, la composizione e la distribuzione della componente lipidica delle ghiandole di Meibomio sono alterate, aumenta il numero di proteine bioattive, tra cui la plasmina, le metalloproteinasi (MMP), le molecole difensive e la fosfolipasi A2 gruppo IIa. Si verificano inoltre un aumento delle citochine infiammatorie sia nella sindrome di Sjogren (SS) che nei quadri clinici non-Sjogren (NSS) e una diminuzione delle mucine delle cellule caliciformi MUC-5AC (*Tab. 1*).

Data la scarsità di informazioni disponibili sui cambiamenti nella composizione del film lacrimale descritti in precedenza, non è chiaro come questi cambiamenti siano correlati con la disfunzione lacrimale. Per meglio comprendere i meccanismi della malattia dell'occhio secco, è necessaria un'analisi del proteoma, del profilo lipidico e

Abbreviazioni usate nel testo e nelle tabelle

- ↑ = Aumento in/ aumentato
- ↓ = Diminuzione in/ diminuito
- Δ = Cambiamento in/
- /- = topo omozigote (genotipo nullo)
- = totale mancanza
- ACAT-1 = Acyl-CoA: colesterolo aciltransferasi-1
- Auto- AG= Autoantigene
- BUT = Tempo di rottura
- CALT = tessuto linfoide associato alla congiuntiva
- Chr Bleph = Blefarite cronica
- CIC = malattia cicatriziale
- Cong. = Congiuntiva/ congiuntivale
- Cont Lens = lenti a contatto
- DE = Occhio secco
- DES = sindrome dell'occhio secco
- EDA = displasia ectodermica
- STR AMB = Stress ambientale
- Epi. = Epiteli / epiteliale
- Epi. Diff/ sq metaplasia = differenziazione epiteliale/metaplasia squamosa
- GVHD = Graft versus Host Disease
- KCS = Cheratocongiuntivite secca
- Lac = Lacrimale
- Meibom = di Meibomio
- ↓ MG = insufficienza delle ghiandole di Meibomio
- MGD = Disfunzione delle ghiandole di Meibomio
- NSS = Non Sjogren Sindrome
- NSS/ACQ = Non Sindrome di Sjogren con deficit della componente acquosa lacrimale
- Nasolac. = Nasolacrimale
- NLD = Dotto nasolacrimale
- RA-MGD = Acido retinoico che determina MGD
- SCOP = scopolamina
- siRNA = Small Interfering RNA
- DE Spont. = Occhio secco spontaneo
- TALT = tessuto linfoide associato al dotto lacrimale
- TBUT = tempo di rottura film lacrimale
- KCS indif = cheratocongiuntivite secca non differenziata
- ↓ Vit A = deficit di Vitamina A
- Vit A = Assenza di Vitamina A

glicidico delle lacrime in un gruppo di pazienti o in popolazioni ben definite, stadiate e omogenee per età, in modo da poter sviluppare dei *biomarker* specifici per la patologia dell'occhio secco.

Sono stati fatti dei progressi nello sviluppo di studi sulle proteine lacrimali, ma mancano degli studi che confrontino le lacrime di soggetti normali con quelle di pazienti affetti da occhio secco⁽⁴¹⁻⁴⁴⁾. La spettrometria è un utile strumento analitico per l'identificazione⁽⁴⁵⁾ delle molecole e dei componenti del film lacrimale ed è utilizzata per sviluppare un profilo lipidico standard delle lacrime normali e per identificare, in modelli di DE, le differenze delle specifiche componenti lacrimali.

Tabella 1
Schema informativo: film lacrimale umano

| | KCS* | NSS | SS | MGD | Deficienza androgenica | Lenti a contatto/DE | Bibl. |
|--|------|-----|----|-----|------------------------|---------------------|------------|
| Volume lacrimale/Osmolarità | | | | | | | |
| ↑ Osmolarità, ↓ Volume | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 2-6 |
| ↑ Evaporazione | ✓ | | | | | | 1, 7-9 |
| ↓ Menisco | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 5,10-13 |
| Correlazione: evaporazione, osmolarità e strato lipidico | ✓ | | | | | | 14,15 |
| ↓ BUT, ↑ tensione superficiale | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | 5,12,16-20 |
| Mucine | | | | | | | |
| ↓ Glicoproteine, MUC-5AC | ✓ | | ✓ | ✓ | | | 21-23 |
| Lipidi | | | | | | | |
| Δ Patterns lipidici, Distribuzione | | | | | | | 24,25 |
| ↓ Lipidi polari | ✓ | | | | | | 26 |
| ↓ Strato lipidico, ↑ Evaporazione | ✓ | | | | | | 14 |
| Proteine | | | | | | | |
| Δ Proteine | ✓ | | | | | | 27, 28 |
| ↑ Livelli plasmina | ✓ | | | | | | 29 |
| ↑ MMP | | | | ✓ | | | 30, 31 |
| ↑ Marker di infiammazione, PRP | ✓ | | | ✓ | | | 32 |
| ↓ Lattoferrina | | | | | | | 33 |
| ↑ Nove molecole difensive | | | | ✓ | | | 34 |
| ↓ Lisozima, Lattoferrina | | | | | | | 35 |
| ↑ Fosfolipasi A2 IIa | ✓ | | | | | ✓ | 36, 37 |
| Mediatori infiammatori | | | | | | | |
| Citochine proinfiammatorie: IL-1, IL-6, IL-8 TNF-α | | | ✓ | ✓ | | | 38-40 |

*Tipo non definito

L'applicazione della spettrometria di massa per la caratterizzazione e l'identificazione dei lipidi secreti dalle ghiandole di Meibomio dimostra che i dati precedentemente riportati in letteratura necessitano di una revisione. Inoltre si osserva che i lipidi sono molto diversi a seconda del tipo e della funzione e occorrono diversi approcci analitici per isolare le diverse classi di lipidi e comprenderne le differenze.

Attualmente sono disponibili molte indagini di laboratorio basate sull'analisi spettroscopica di massa e sull'esame del profilo glicomico nelle lacrime dei pazienti normali e in quelli affetti da DE. Analogamente, è necessario poter determinare la quantità di mucine associate alla membra-

na e secrete nel film lacrimale. Sarà anche importante determinare la correlazione tra i risultati dei vari test di stabilità lacrimale (p.es. tempo di rottura del film lacrimale [TFBUT]) e la quantità di mucine e di lipidi e le caratteristiche delle lacrime.

B. Modelli animali di occhio secco

I modelli animali discussi nel Workshop del 1995 includevano uno studio fatto nei conigli a cui veniva eseguita un'ablazione delle ghiandole lacrimali e di Meibomio e delle membrane nictitanti, con conseguente iperosmolarità lacrimale e danno alla superficie oculare. Si riprodu-

cevano in questo modo le caratteristiche del DE umano. I modelli e le scoperte successive al Workshop del 1995 includono:

- Modelli di topi con DE, trattati con scopolamina ed esposti a stress ambientali che creano secchezza, mostrano un aumento delle citochine infiammatorie e dell'osmolarità lacrimale.
- Topi con deficit di neurturina che sviluppano il DE mostrano aumento dei mediatori infiammatori nel loro film lacrimale.
- Un modello realizzato tramite ablazione delle ghiandole lacrimali nei conigli dimostra che il trattamento con desametasone agisce favorevolmente sulla diminuzione di TFBUT e sul danno alla superficie oculare.
- Modelli di conigli con denervazione delle ghiandole lacrimali presentano profili alterati delle proteine e dei lipidi presenti nelle lacrime (Tab. 2).

Una parte importante dello studio riguarda la necessità di correlare l'osmolarità lacrimale, la rottura del film e l'infiammazione conseguente lo stress.

Oggi sono state realizzate e rese disponibili delle linee cellulari di epitelio umano congiuntivale e corneale che mostrano le caratteristiche di differenziazione degli epiteliali naturali^(46,47). Queste linee saranno utili per studiare gli effetti dell'osmolarità lacrimale, dei mediatori infiammatori e delle lacrime del DE sugli epiteliali superficiali.

La spettrometria di massa, lo studio del profilo lipidico e proteico in modelli animali di occhio secco dovrebbero essere effettuati per studiare più a fondo la condizione del DE.

Un confronto con le proteine, i lipidi e i polisaccaridi delle lacrime animali aiuterà a stabilire i modelli animali più appropriati (p.es. le lacrime dei conigli sono simili alle lacrime degli umani)⁽⁴⁵⁾.

IV SUPERFICIE OCULARE

A. La patologia nell'uomo

Gli aspetti della patologia dell'occhio secco discussi nell'ambito del Workshop del 1995 comprendevano la mancanza della funzione di barriera epiteliale come dimostrato dall'aumento dell'impregnazione della colorazione (senza dati disponibili sul meccanismo), dall'aumento dell'osmolarità del film lacrimale che porta al danno della superficie oculare, dalla perdita di cellule caliciformi congiuntivali e dall'aumento della metaplasia squamosa delle cellule epiteliali della superficie (osservazione morfologica).

Le nuove evidenze indicano che ci sono delle alterazioni nella superficie cellulare, nelle mucine secrete e nelle proteine correlate alla cheratinizzazione, espresse dalle cellule epiteliali. Esistono inoltre evidenze scientifiche circa la presenza di alterazioni nella densità e nella sensibilità dell'innervazione corneale.

Gli studi documentano un aumento nel *turnover* delle cellule epiteliali congiuntivali. Alcune evidenze indicano che le cellule epiteliali congiuntivali sono attive nella risposta immunologica e fonte di mediatori infiammatori⁽⁸⁵⁾ (Tab. 3).

Malgrado le conoscenze attuali, si riscontra ancora una mancanza di informazioni sul film lacrimale e sulla superficie oculare nella malattia dell'occhio secco.

Sarebbe interessante determinare i valori proteici e dei polisaccaridi attraverso uno studio effettuato su una popolazione di occhio secco confrontata con una popolazione di controllo di uguale età e sesso per identificare i cambiamenti comuni nelle componenti della superficie affetta da malattia.

Sarebbe opportuno determinare se l'età e il sesso, o una combinazione di questi fattori, possa influenzare gli effetti dello stress ambientale sull'epitelio della superficie oculare. È importante determinare fattori genetici che possano

Tabella 2
Schema informativo: film lacrimale animale

| | Coniglio | Topo | Bibl. |
|--|---|----------------|-------|
| Volume lacrimale/Osmolarità | | | |
| ↑ Osmolarità + ↓ Volume lacrimale | - Ghiandole di Meibomio | Scop & Str Amb | 48-49 |
| ↑ Osmolarità, ↑ Danno di superficie | - ghiandola lacrimale | | 50 |
| ↓ BUT ↓ Danno di superficie con desometasone | - ghiandola lacrimale | | 51 |
| Lipidi | | | |
| ↑ Aciglicerolo | - ghiandola lacrimale/membrana nictitante | | 45 |
| Confronto di lipidi nel coniglio/ umano | - ghiandola lacrimale/membrana nictitante | | 45 |
| Proteine | | | |
| Δ Proteine | - Nervi | | 52 |
| ↑ IL-1 β | | - Neurturina | 53 |

Tabella 3
Schema informativo: superficie oculare umana

| | KCS Indif. | NSS/ACQ | SS | CIC | ↓ Vit A | Lenti a contatto | LASIK | Bibl. |
|--|------------|---------|----|-----|---------|------------------|-------|----------------|
| Danno cell. epit. cong. e corn. indicato dalla colorazione con fluoresceina, verde lissamina, rosa bengala | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | Ben stabilite |
| Mucine | | | | | | | | |
| ↓ Cellule mucipare | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ↑ | ✓ | 54-61 |
| ↓ MUC-5AC | ✓ | | ✓ | | | | | 22, 23 |
| Alterata Glicosilazione mucina | | | | | | | | 62-65 |
| Δ Glicosiltransferase | | | | ✓ | | | | 66 |
| Δ Mucine associate alla membrana | | ✓ | ✓ | | | | | 22, 57, 65, 67 |
| Δ Cong. Cell- Epiteliale | | | | | | | | |
| ↓ Microplicae | | | ✓ | | | | | 68 |
| Cheratite filamentosa | ✓ | | | | | | | 69 |
| ↑ Stratificazione | ✓ | | | ✓ | | | | 66, 70 |
| Proliferazione epi. | | | ✓ | | | | | 71 |
| Δ Struttura nucleare/ cromatina | ✓ | | ✓ | | | | | 72-74 |
| ↑ Apoptosi | ✓ | ✓ | ✓ | | | | | 75 |
| Δ Innervazione | | ✓ | ✓ | | | | ✓ | 76-80 |
| ↑ Infezione | ✓ | | | | | | | 35, 81 |
| ↑ Cheratinizzazione legata a proteine | | | ✓ | | ✓ | | | 82-84 |
| Marker infiammatori su cong. Cell. Epi. | ✓ | ✓ | ✓ | | | | | 75, 85 |

indicare la predisposizione al DE. Infine, un confronto degli stadi iniziali della malattia con la malattia cronica può permettere di distinguere i percorsi che portano al DE dalle risposte secondarie associate alla patologia.

B. Modelli *in vitro* e animali

Le informazioni raccolte da modelli *in vitro* e animali nel Workshop 1995 hanno identificato una mancanza di funzione di barriera come dimostrato in molti modelli animali di occhio secco dall'impregnazione con colorante, perdita delle cellule calciformi e cheratinizzazione dell'epitelio della superficie oculare in mancanza di vitamina A. Sin dal Workshop del 1995, le ricerche hanno identificato

il ruolo delle mucine associate alla membrana come barriera protettiva (cellule epiteliali umane *in vitro*), l'aumento del turnover cellulare (sperimentazione sui topi) e l'aumento dell'espressione delle citochine infiammatorie (sperimentazione sui topi). Nuovi modelli murini sono stati sviluppati per studiare i meccanismi molecolari del danno della superficie oculare. I modelli su topi in cui si riscontra una disfunzione delle ghiandole lacrimali e/o di Meibomio hanno permesso di caratterizzare in maniera più approfondita la patologia della superficie oculare (colorazione, densità cellule calciformi ecc.) (Tab. 4).

Considerate le conoscenze attuali, è necessario condurre ulteriori ricerche per determinare il ruolo della malattia

della superficie oculare nel meccanismo della disfunzione lacrimale.

Confrontando le lacrime nell'uomo e nel topo, i profili proteici e glicidici della superficie apicale epiteliale si potrebbero identificare le componenti comuni per la convalida dei modelli animali in modo da facilitare l'interpretazione dei dati estrapolati. Bisognerebbe sviluppare dei modelli di occhio secco - inducibili e specifici per le diverse forme - e modelli di malattia cronica.

È necessario caratterizzare i meccanismi di differenziazione delle cellule caliciformi dalle cellule staminali dell'epitelio e i meccanismi che determinano la perdita di cellule caliciformi, visto che la riduzione di queste ultime caratterizza tutte le forme di DE. Sarebbe utile sviluppare dei test funzionali *in vitro* attraverso le tecniche siRNA per spiegare il contributo delle diverse molecole delle cellule di superficie nel mantenimento della funzione di barriera dell'epitelio corneale.

Si dovrebbero studiare le tecniche avanzate di manipolazione genetica attraverso animali *knockout*, *knockin* e *knockdown* per mettere in atto dei test funzionali nei modelli animali standardizzati di occhio secco. È necessario

determinare la causa della colorazione corneale con fluoresceina, verde lissamina e rosa bengala. Sarebbe opportuno determinare se le interazioni stroma-epitelio influenzano lo sviluppo del DE.

V. SISTEMA IMMUNITARIO

A. La patologia nell'uomo

Le evidenze del Workshop 1995 indicavano che la SSDE è il risultato di una malattia autoimmune in cui la reazione agli antigeni-self causa un'alterazione, di natura infiammatoria, del tessuto lacrimale.

Le nuove evidenze successive al report del 1995 indicano che le citochine proinfiammatorie e la popolazione di cellule T aumentano nel tessuto congiuntivale e lacrimale sia in presenza di NSSDE che in presenza di SSDE. Le chemochine e i loro recettori aumentano in presenza di occhio secco. L'occhio secco nella GVHD (*Graft vs Host Disease*) è associato all'infiammazione e all'infiltrazione di cellule immunitarie nelle ghiandole lacrimali e nell'epitelio corneale.

La malattia è anche caratterizzata da fibrosi con infiltrazione di fibroblasti e cellule derivanti dal midollo osseo. È

Tabella 4
Schema informativo: epitelio della superficie oculare animale

| Epi. sup. ocu. in vitro/umano | Coniglio | Topo | Ratto | Cane | Bibl. |
|---|--|---|---------|-----------|----------------|
| Cellule caliciformi; mucine/glicoproteine | | | | | |
| Penetrazione rosa bengala | - MUC-16 | | | | 86 |
| ↓ Cellule caliciformi, MUC-5AC | - Vit A - ghiandole di Meibomio - cheratite neurotrofica | Scop & Str Amb -/- Nerturina -/- I κ β - ζ | - Vit A | | 48, 53, 87-91 |
| Δ Glicosilazione Mucina | | | | DE Spont. | 92 |
| ↓ Mucine associate alla membrana | - Vit A - Siero | -/- Neurturina | - Vit A | | 53, 89, 93 94 |
| ↓ Glicogeno | - ghiandole di Meibomio - ghiandole lacrimali - cheratite neurotrofica | | | | 48, 50, 88 |
| Epi. Diff/ Metaplasia sq. | | | | | |
| ↑ Cheratinizzazione | - Vit A | | - Vit A | DE Spont. | 95-97 |
| ↑ Proliferazione epi. cong. | | Scop & Str Amb | | | 90 |
| ↑ Apoptosi | | Scop & Str Amb | | | 98 |
| ↑ Citochine infiammatorie/MMP | | | | | |
| | + Iperosmolarità Str. | -/- Neurturina Scop & Str Amb + iperosmolare str. | | | 49, 53, 99-101 |
| Difetti superficie oculare/infiammazione senza ghiandole di Meibomio | | | | | |
| | | Eda knockin | | | 102 |

chiaro che le cellule epiteliali della superficie oculare possono modulare le risposte infiammatorie (Tab. 5).

Mancano ancora informazioni riguardo al ruolo del sistema immunitario nella disfunzione lacrimale umana nel DE. Si hanno scarsissime informazioni circa i cambiamenti nella cornea (film lacrimale o congiuntiva) o sul ruolo dei fattori immunitari che causano la malattia. Non si sa quali siano i cambiamenti primari e quali i secondari, sono necessarie delle informazioni per determinare «la causa e l'effetto».

È necessario determinare in modo più accurato il ruolo delle proteine immunomodulatrici e dei peptidi presenti nella cornea e nel film lacrimale (TGF- β , α -MSH, IL-1Ra ecc) e delineare il ruolo dell'immunità innata nella malattia dell'occhio secco (lattoferrina, lisozima, recettori toll-like, complementi, metabolici dell'acido arachidonico, neuropeptidi).

B. Modelli animali / *in vitro* dell'occhio secco – Sistema immunitario

I modelli e le scoperte del Workshop del 1995 hanno confermato che la ciclosporina A è efficace nel trattamento del modello di occhio secco canino spontaneo. Nuove evidenze disponibili successive al report 1995 indicano che l'IFN- γ può indurre overespressione di HLA-DR e ICAM-1 nelle cellule congiuntivali umane, questo dimostra che le cellule della superficie oculare possono reagire all'infiammazione e modularla. I modelli murini di occhio secco indotto sia con scopolamina che con stress ambientale, o solo con quest'ultimo, dimostrano che lo stress della superficie oculare può comportare alterazioni infiammatorie/cellule T, evidenziate nell'occhio secco umano.

Tali lavori suggeriscono che l'infiammazione indotta da stress da essiccamento è mediata dalle cellule T⁽¹²⁶⁾ (Tab. 6). Quali sono le domande a cui si può dare una risposta o

Tabella 5
Schema informativo: sistema immunitario umano/occhio secco

| | KCS indiff. | NSS | DE Rosacea | SS | GVHD | Bibl. |
|--|----------------|-----|---------------|----|------|-----------------------|
| Congiuntiva | | | | | | |
| ↑ Cellule CD3, CD8 | | | | ✓ | ✓ | 103 |
| ↑ CD4 e Cellule T | | ✓ | | ✓ | ✓ | 104-108 |
| ↑ Recettore Chemochina CCR5 | ✓ | ✓ | | ✓ | ✓ | 109,110 |
| ↑ Fas | | ✓ | | | | 75 |
| ↑ ICAM-1 | | | | | ✓ | 111 |
| Congiuntiva e Lacrime | | | | | | |
| ↑ IL-1, TNF- α e IL-8, IL-6 | | | ✓ | ✓ | | 38-40 |
| Congiuntiva e ghiandola lacrimale | | | | | | |
| ↑ MHC classe II, HLA-DR | ✓ | ✓ | | ✓ | ✓ | 75, 105, 107, 110-113 |
| ↑ CD40, CD40 ligand, CD80, CD86 | ✓ | ✓ | | ✓ | ✓ | 75, 107 |
| Fibrosi | | | | | ✓ | 107, 108, 114 |
| Ghiandola lacrimale | | | | | | |
| Ghiandola lacrimale: ↑ CD4, Cellule T e B | ✓ | | | ✓ | ✓ | 108, 115-117 |
| ↑ ICAM-1 | ✓ | | | | ✓ | 107,118 |
| Infiltrato infiammatorio | | ✓ | | ✓ | | 119,120 |
| Autoantigeni condivisi, ghiandole salivari e lacrimali | | ✓ | | | | 115 |
| ↑ Fas- ligand di Fas, IL-1 β , IL-6, IFN- γ , molecola -1 di adesione delle cellule vascolari & molecola-1 di adesione intracellulare. Infiltrati linfocitari, apoptosi | | ✓ | | | | 121-123 |

Tabella 6
Schema informativo: sistema immunitario animale

| | Animale in vitro | Coniglio | Topo | Cane | Bibl. |
|---|------------------------|----------|-----------------------------|-----------|----------|
| IFN- γ \uparrow HLA-DR, ICAM-1 | Coltura Cong. primaria | | | | 124 |
| \uparrow Infiammazione Cong., Apoptosi ghiandola lacrimale | | | Scop e Str Amb | DE Spont. | 96,98 |
| IFN- γ in infiammazioni tipo TH-1 e DE | | | Scop e Str Amb e Str Amb | | 118, 125 |
| Cellule T mediano infiammazione locale – DE | | | Scop e Str. Amb | | 126 |
| Infiammazione lacr. e DE | | | | | |
| \uparrow Cellule T, specialmente CD4 | | | Dacrioadeniti autoimmuni | | 127 |
| \uparrow Cellule T CD3; CD8, CD4 | | | Modello GVHD | | 128 |
| \uparrow ICAM-1 | | | MRL/lpr topi | | 118 |
| \uparrow MHC classe II | | DE | | | 129 |

quali tipi di ricerca di base bisogna sviluppare per determinare il ruolo del sistema immunitario nel meccanismo della disfunzione lacrimale nel DE?

Si hanno pochissime informazioni circa il ruolo delle cellule T negli stadi iniziali dell'immunopatogenesi dell'alterazione della superficie oculare (vs ghiandole lacrimali) nel DE. Occorre chiarire il grado in cui la malattia della superficie oculare è mediata dalle cellule T. E' anche necessario determinare il ruolo dell'autoimmunità in questo disordine e la natura degli autoantigeni. Sono necessari degli studi per caratterizzare l'effetto delle citochine infiammatorie sui geni che codificano le mucine e sulle proteine. È necessario inoltre delineare il ruolo del sistema immunitario innato nella sindrome dell'occhio secco (lattoferrina, lisozima, complementi, kinin/kininogen, metaboliti dell'acido arachidonico, nerupeptidi, recettori *toll-like* e proteina surfattante-D)

VI. IPOTESI DEL MECCANISMO DELL'INFIAMMAZIONE ACUTA E CRONICA NELLA MALATTIA DELL'OCCHIO SECCO

Il *Cullen Symposium on Corneal & Ocular Surface Inflammation* (Baylor College of Medicine, Houston, TX, January, 2005, *The Ocular Surface*, Vol. 3, Suppl.) ha cercato di fornire una visione meccanicistica unificata dell'infiammazione acuta e cronica della superficie oculare (Fig. 1), inclusa quella che si riscontra nel DE⁽¹³⁰⁾.

- 1) Acuta: irritazione della superficie oculare (virale, batterica, ambientale) che porta ad una rapida espressione delle selectine endoteliali vascolari e diapedesi delle cellule T non attivate nella congiuntiva.
- 2) Cronica: insulto prolungato sulla superficie oculare che porta all'attivazione e al passaggio delle cellule presen-

tanti antigeni (incluse quelle dendridiche) verso gli organi linfoidi, determinando l'attivazione delle cellule T che agiscono sulla superficie oculare.

- 3) I sintomi sono correlati con il danno dell'epitelio corneale e sembrano essere dovuti all'insieme degli effetti citotossici e pro-apoptosici degli stimoli infiammatori e dall'iperosmolarità. Insieme al danno epiteliale si verifica la stimolazione delle terminazioni nervose nocicettive corneali.

VII. GHIANDOLA LACRIMALE PRIMARIA/GHIANDOLE ACCESSORIE/ DOTTO NASOLACRIMALE

A. La patologia nell'uomo

Il Workshop del 1995 ha indicato che le ghiandole lacrimali dei pazienti affetti da SSDE sono infiltrate da linfociti e che il volume della secrezione lacrimale diminuisce.

Alcune evidenze hanno suggerito un potenziale collegamento tra l'infezione del virus Epstein-Barr e l'occhio secco, anche se questa ipotesi è controversa. È risaputo che occludendo il dotto nasolacrimale, la colorazione della superficie oculare nel DE migliora.

Le evidenze raccolte dal Workshop del 1995 hanno identificato i vari tipi di linfociti, l'espressione di Fas-ligand di Fas e i *marker* dell'apoptosi nelle ghiandole lacrimali dei pazienti affetti da SS. Ci sono studi che suggeriscono un legame tra l'epatite C e l'infezione da HIV con l'NS DE e SSDE. E' stato identificato un autoanticorpo, rivolto verso il recettore muscarinico dell'acetilcolina M3, i cui aumentati livelli sierici sono in correlazione con una diminuzione dei valori del test di Schirmer e un aumento della colorazione con rosa bengala. È stato anche riportato un aumento delle mucine lacrimali nel DE (Tabelle 7 e 8).

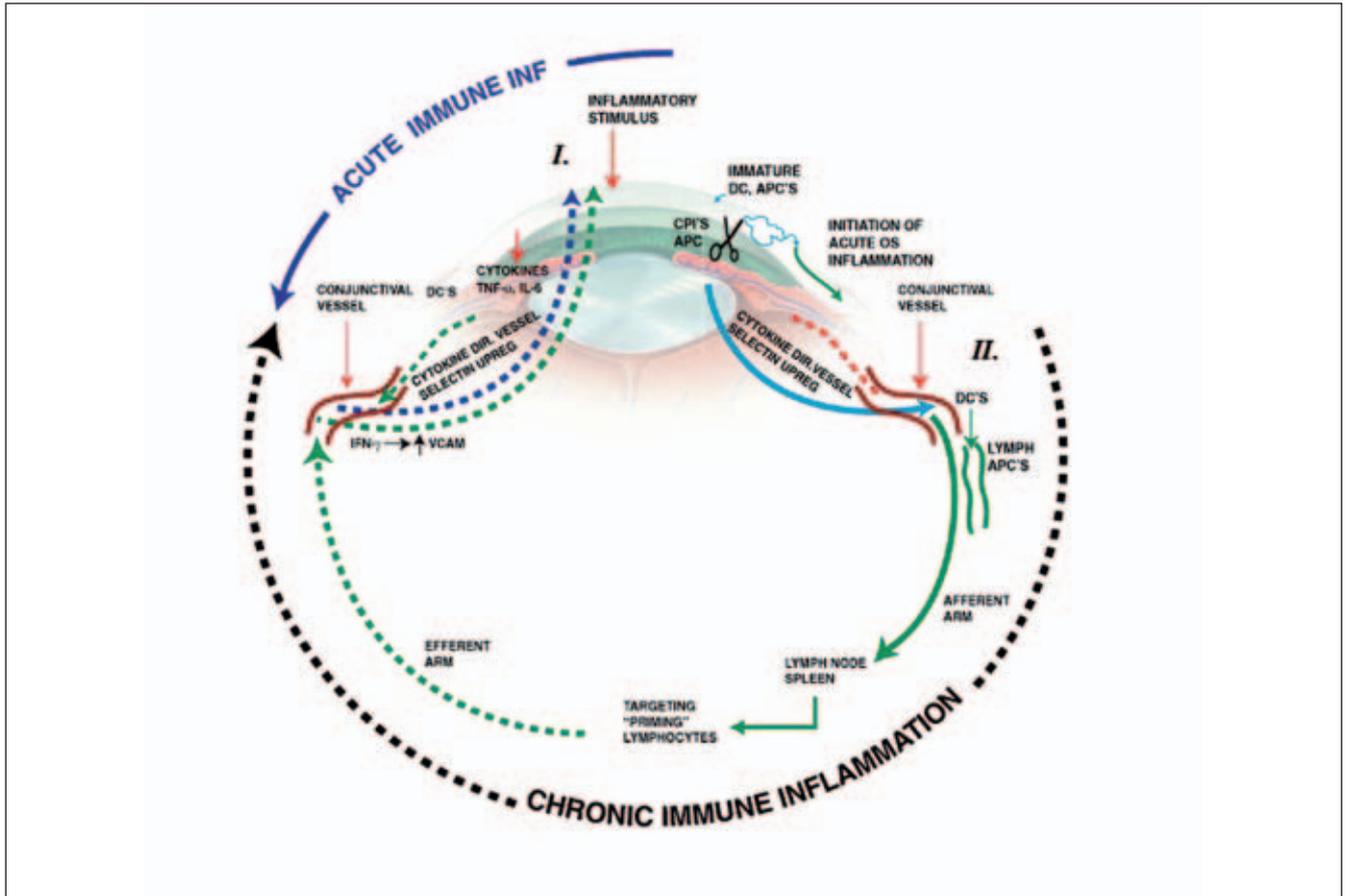


Figura 1. Ipotesi del meccanismo di infiammazione di natura immunologica acuta e cronica.

I. Gli stimoli infiammatori (microbi, antigeni, traumi, raggi UV, stress iperosmolare) scatenano un'infiammazione autoimmune acuta stimolando la produzione e il rilascio di citochine infiammatorie (p.es. IL-1, TNF- α e IL-6) da parte delle cellule epiteliali della superficie oculare, che attivano macrofagi (APC) e portano ad un incremento dell'espressione delle molecole di adesione (p.es. ICAM-1) e delle selectine nell'endotelio vascolare congiuntivale, che facilitano il reclutamento delle cellule infiammatorie nella superficie oculare.

II. L'infiammazione autoimmune cronica implica la fagocitosi e il processamento di antigeni da parte di APC oculari che migrano nei linfonodi e nella milza attraverso i vasi linfatici congiuntivali e le vene, e innescano le cellule T naive. Le cellule T CD4+ viaggiano lungo la congiuntiva dove aderiscono all'endotelio vascolare attivato ed entrano nel tessuto per diapedesi. Le citochine prodotte dalle cellule T attivate, come l'IFN- γ , amplificano la risposta immunologica aumentando l'espressione delle molecole di adesione (p.es. VCAM) nei vasi sanguigni congiuntivali.

APC = cellule che presentano gli antigeni; CPI = proteasi corneale; DC= cellula dendritica; TNF- α = fattore di necrosi tumorale alfa; IL-6 = interleuchina 6; IFN- γ = interferoni gamma.

(Ristampato da McDermott AM et al, Pathways of corneal and ocular surface inflammation: a perspective from the Cullen Symposium. *Ocul Surf* 2005;3(4):S131-S138).

È ancora necessario capire bene il ruolo della ghiandola lacrimale primaria, delle ghiandole lacrimali accessorie e del dotto nasolacrimale nell'occhio secco. Sulla base delle informazioni attuali, sarebbe utile confrontare il proteoma lacrimale di una popolazione di individui normali ben caratterizzata con quello di una popolazione di pazienti affetti da occhio secco di stessa età e sesso e confrontare inoltre i proteomi lacrimali delle diverse KCS per identificare i potenziali *biomarker* dei vari tipi di patologie. Le informazioni riguardo le ghiandole lacrimali accessorie e il dotto nasolacrimale in pazienti affetti da occhio secco

sono molto poche.

Tutti i dati istologici e immunoistochimici sulle ghiandole lacrimali accessorie provengono da tessuti normali; non ci sono informazioni disponibili riguardo le ghiandole di qualsiasi tipo di occhio secco. Non sappiamo fino a che punto vengano coinvolte in presenza di DE; essendo situate nel tessuto sottocongiuntivale della superficie oculare, sono un importante obiettivo terapeutico per i secretagoghi lacrimali topici. L'espressione genica nelle ghiandole accessorie, paragonata a quella della ghiandola lacrimale principale, non è definita. Non si conoscono i contribu-

Tabella 7
Schema informativo: ghiandole lacrimali umane/ dotti nasolacrimali

| | KCS | SS | GVHD | Invecchiamento | Bibl. |
|--|-----|----|------|----------------|--------------------|
| Ghiandole lacrimali | | | | | |
| Infiltrato infiammatorio | | ✓ | ✓ | | 107, 108, 119, 120 |
| Autoantigeni condivisi, Ghiandole lacrimali e salivari | | ✓ | | | 115 |
| ↑ FAS-ligand di FAS, IL-1 β , IL-6, IFN- γ , VCAM-1, ICAM-1, Infiltrati linfocitari, apoptosi | | ✓ | | | 121-123 |
| Eziologia virale di epatite C, HIV, Epstein Barr | ✓ | ✓ | | | 131-135 |
| Autoanticorpi avverso recettori muscarinici M3 dell'acetilcolina | | ✓ | | | 136 |
| Correlazione: livelli di autoanticorpi sierici <i>versus</i> Schirmer con stimolazione nasale e colorazione rosa bengala/ fluoresceina | | ✓ | | | 137 |
| ↑ MUC-4, 5AC & 5B nelle ghiandole lacrimali umane (4 cadaveri con occhio secco) | | | | ✓ | 138 |
| ↓ Innervazione nelle ghiandole lacrimali | ✓ | ✓ | | | 139 |
| ↑ Fibrosi | | | | ✓ | 140 |
| Dotti nasolacrimali (NLD) | | | | | |
| Sist. di occlusione nasolac. (punctum plug ecc.) migliora sup. ocu. in DE | ✓ | ✓ | | | > 100 voci |
| Malattie di DE & nasolac. si verificano frequentemente in donne in età avanzata | ✓ | ✓ | | | 141 |

Tabella 8
Schema informativo: ghiandole lacrimali accessorie umane (non relative al DE)

| | Bibl. |
|---|---------------|
| Struttura degli acini simile nella ghiandola principale e accessorie | 142, 143 |
| Sistema immunitario secretorio simile nella ghiandola principale e accessorie | 142, 144, 145 |
| Innervazione simile nella ghiandola principale e accessorie | 146, 147 |
| Secrezione proteica simile nella ghiandola principale e accessorie | 145, 148, 149 |

ti delle ghiandole accessorie e principale alla secrezione lacrimale basale o all'insufficienza della secrezione lacrimale. Mancano, inoltre, informazioni riguardanti la funzione del dotto nasolacrimali nella malattia dell'occhio secco. Mancano studi a lungo termine sugli effetti benefici dell'occlusione del puntino lacrimale. Yen et al.⁽¹⁵⁰⁾ hanno scoperto che la sensibilità della superficie oculare e la produzione lacrimale diminuivano dopo l'occlusione temporanea del puntino lacrimale in soggetti normali. Nei soggetti normali, infatti, sembra esserci un meccanismo autoregolatore che riporta, 14-17 giorni dopo l'inter-

vento, la produzione e l'eliminazione delle lacrime ai livelli precedenti l'occlusione, questo meccanismo sembra non essere presente nei pazienti affetti da DE⁽¹⁵⁰⁾. Quindi, si potrebbe dedurre che l'assorbimento del film lacrimale nei vasi sanguigni del corpo cavernoso che circonda i dotti nasolacrimali^(151,152) potrebbe generare un segnale per la produzione del film lacrimale che in mancanza di lacrime si interrompe.

Sono necessari ulteriori studi per la caratterizzazione dei sistemi di *feedback* negli epitelii del dotto nasolacrimali e per approfondire le loro connessioni con la superficie oculare.

B. Modelli *in vitro* / Animali

Nel report del Workshop del 1995 sono stati identificati dei modelli di topi con SS in cui l'infiammazione lacrimale veniva ridotta con gli androgeni.

Dopo quel resoconto, sono stati condotti degli studi con analisi *microarray* che dimostrano dei significativi cambiamenti nell'espressione genica delle ghiandole lacrimali dopo un trauma acuto della cornea del topo. Nel modello di topo con SS sono state identificate le citochine e le chemochine ed è stata riscontrata un'alterazione della funzione colinergica e del rilascio del neurotrasmettitore. È stata riscontrata la presenza di Alfa-fodrina identificata come autoantigene nel modello di topo NFS con SS, ed è stato identificato l'autoantigene ICA69 nel modello murino NOD con SS.

I recettori muscarinici sono autoantigeni per il modello di ratto con SS. È stato dimostrato inoltre che i dotti nasolacrimali possono assorbire cortisolo marcato, il che indica che l'assorbimento delle componenti lacrimali può avvenire all'interno del dotto (Tab. 9).

Per convalidare i modelli animali di occhio secco, potrebbe essere importante caratterizzare e confrontare il trascrittoma (insieme di tutti gli m-RNA trascritti) e il proteoma di topi e uomo. Potrebbe essere utile confrontare i proteomi delle ghiandole lacrimali di topi normali e con DE. E' anche importante determinare quali siano i segnali alterati che causano la diminuzione della secrezione delle ghiandole lacrimali che avviene durante l'invecchiamento nei modelli di topi e ratti. Il ruolo delle cellule mioepiteliali nella disfunzione delle ghiandole lacrimali deve essere ancora stabilito. Per la determinazione dei meccanismi cellulari usati per indurre la malattia autoimmune nelle ghiandole lacrimali si potrebbe anche utilizzare il modello di coniglio con linfocita autologo. Questo modello potrebbe anche essere usato per determinare se il processo di esocitosi per la secrezione di proteine è coinvolto nella disfunzione delle ghiandole lacrimali e per determinare il ruolo delle cellule dei dotti delle ghiandole lacrimali nella disfunzione di queste ultime attraverso microdissezione laser.

Riguardo ai dotti nasolacrimali, mancano informazioni relative alle cellule dei dotti e linee cellulari dell'epitelio dei dotti nasolacrimali non sono al momento disponibili. Parlando di modelli animali non sappiamo ancora se l'assorbimento delle componenti fluide delle lacrime nei vasi sanguigni del corpo cavernoso che circonda i dotti nasolacrimali cambia o si interrompe nei modelli con occhio secco e cosa accade al fluido lacrimale quando, passando nel dotto nasolacrimale, viene drenato.

VIII. GHIANDOLE DI MEIBOMIO

A. La patologia nell'uomo

Il report del Workshop 1995 ha documentato un aumento e/o un'alterazione nei lipidi secreti dalle ghiandole di Meibomio in pazienti affetti da DE e anomalie morfologiche degli acini e dei dotti delle ghiandole.

Evidenze successive al Workshop del 1995 hanno dimostrato una cheratinizzazione dell'epitelio dei dotti, una metaplasia dell'orifizio e una ridotta qualità della secrezione delle ghiandole di Meibomio in pazienti in età avanzata, in pazienti che seguivano una terapia antiandrogena e/o in donne con con sindrome da insensibilità completa agli androgeni (*Syndrome-Androgen Deficiency*). Sono state fatte delle correlazioni tra l'assunzione di integratori (acidi grassi omega-3, vitamina B6, vitamina D) e i profili lipidici polari delle secrezioni delle ghiandole di Meibomio in donne affette da SS. E' stato evidenziato che la malattia delle ghiandole di Meibomio può contribuire per più del 60% nei pazienti con DE (Tab. 10).

Mancano informazioni circa il ruolo delle ghiandole di Meibomio umane nella disfunzione lacrimale dell'occhio secco. I fattori che influenzano la cheratinizzazione del dotto di Meibomio dovrebbero essere studiati ulteriormente, seguendo l'ipotesi (non nuova) che l'ipercheratinizzazione dei dotti sia un fattore comune e un evento chiave che porta alla malattia delle ghiandole di Meibomio (MGD) sia nelle MGD primarie che secondarie.

Alcuni dati ci vengono forniti dalla letteratura riguardante la tossicità dell'epinefrina nei conigli e, forse cosa più importante, la tossicità del retinoide nell'uomo. Altri dati potrebbero essere forniti dalla letteratura, priva di evidenze certe, che suggerisce che la congiuntivite (p.es. allergica, cronica) o l'occhio secco SS siano associati alla MGD, con implicazioni che riguardano i mediatori (proinfiammatori o altro) che potrebbero arrivare alle ghiandole di Meibomio e ai dotti attraverso la congiuntiva.

Gli approcci investigativi potrebbero includere:

- Una revisione della letteratura sui processi di cheratinizzazione dei vari epitelii.
- Una revisione del meccanismo d'azione del retinoide e dei processi, geneticamente regolati, coinvolti nella cheratinizzazione delle mucose, epitelii di transizione (come l'epitelio del dotto di Meibomio) e della cute.
- Un'attenzione all' istochimica ed elettroistochimica della cheratinizzazione a livello cellulare, *markers* di cheratinizzazione.
- Uno studio su retinoidi e altri componenti capaci di bloccare o invertire l'azione anti-acne dei retinoidi.
- Studi clinici per confrontare la frequenza di MGD in occhi trattati con agonisti adrenergici per il glaucoma, specialmente quando gli agonisti sono utilizzati in maniera unilaterale.

Dobbiamo conoscere il numero minimo di ghiandole necessario per fornire un adeguato strato lipidico per la funzione del film lacrimale e i meccanismi molecolari che portano alla perdita o ad anomalie morfologiche delle ghiandole di Meibomio. È importante determinare in che misura lo strato lipidico è adeso allo strato acquoso e

Tabella 9
Schema informativo: ghiandole lacrimali/ dotti nasolacrimali animali.

| | in vitro | Coniglio | Topo | Ratto | Cane | Bibl. |
|---|---------------------|--|---|--|-------------------|--------------------|
| Ghiandola lacrimale | | | | | | |
| Cocoltura di cellule acinari lacrimali/ linfociti attivano i linfociti e causano infiammazione nella ghiandola lacrimale | Ghiandola lacrimale | ✓ | | | | 153-157 |
| ↑ infiltrazione linfocitica CD4, CD8; ↑ Fas- Ligante Fas & citochine | | | Topo MRL/lpr Topo NOD Modello di SS | | | 158-166 |
| Gli androgeni ↓ infiammazione, sono immunosoppressivi e diminuzione dei recettori androgeni | | | Topi MRL/ Mo-lpr/lpr NZB/NZW Topo F1 | Dacroadeniti Sp. Autoimmune | Cane DE | 161, 167-176 |
| Autoantigeni della ghiandola lacrimale causano infiltrazione linfocitica nelle ghiandole lacrimali | | | Topo <i>in vivo</i> | Tatto <i>in vivo</i> | | 172, 173, 177, 178 |
| Alterata funzione colinergica nella sindrome di Sjogren ICA69 | | | Topo NOD Modello di SS | | | 179, 180 |
| Infiltrazione linfocitica blocca secrezione ghiandole lacrimali previene il rilascio di neurotrasmettitori nella sindrome Sjogren | | | Topo MRL/lp Modello di SS | | | 181 |
| α-fodrina è un autoantigene per ghiandole lacrimali e causa sindrome Sjogren | | | Topo NFS Modello di SS | | | 182 |
| ↑ Vulnerabilità a <i>herpes</i> | | | | Cellule di ghiandole lacrimali femminili | | 174 |
| Δ Espressione genica nelle ghiandole lacrimali nel danno corneale | | | Topo normale | | | 183 |
| Dotti nasolacrimali (NLD) | | | | | | |
| ³ H-cortisol incorporato da NLD nel sangue di coniglio | | Assorb. di sostanze lipofile da fluido lacr. da epit. di NLD | | Nessun assorbimento di sostanze lipofile da lacrime da epi. di NLD | | 184, 185 |
| Anatomia utile per indagini NLD | | Studi comparativi | | | Studi comparativi | 184-186 |
| ↓ Secrezione ↓ Innervazione ↑ Lipofuscina | | | Modello di invecchiamento | | | 187 |

Tabella 10
Schema informativo: ghiandola di Meibomio umana

| | KCS | Blefarite cronica | MGD | NSS | SS | Insufficienza Androgena | Invecchiamento | Lenti a contatto | Bibl. |
|--|-----|-------------------|-----|---------|-------|-------------------------|----------------|------------------|--------------------------|
| Perdita ghiandole di Meibomio/ Ostruzione/distorsione Diminuzione secrezioni | | ✓ | ✓ | ✓ 18.5% | ✓ 60% | | ✓ | ✓ | 6, 188-195 |
| Δ profili lipidici | | | | | | ✓ | ✓ | ✓ | 36, 196-198 |
| Cheratinizzazione, metaplasia orifizio | | | | | | ✓ | ✓ | | 5, 10 |
| Pnt di fusione del 3° lipide più alto del normale | | | ✓ | | | | | | 199 |
| Ceppi batteriologici associati alla blefarite cronica | | ✓ | | | | | | | 200 |
| ↑ Fluoresceina, rosa bengala | | | ✓ | | | | | | 195 |
| Δ strato lipidico; ↑ spessore | ✓ | | | | | ✓ | ✓ | ✓ | 36, 197, 198 201, 202 |

quanto questo influisca nel DE. E' importante, inoltre, definire il ruolo della lipocalina e di altri *carrier* lipidici nella stabilità del film lacrimale. Abbiamo bisogno di una valutazione globale qualitativa e quantitativa delle secrezioni delle ghiandole di Meibomio nei soggetti normali e affetti da DE, ottenuta mediante moderne tecniche analitiche, in particolare, utilizzando la cromatografia liquida/spettrometria di massa per determinare se il rapporto molare dei lipidi più importanti presenti nelle secrezioni delle ghiandole di Meibomio cambia con lo sviluppo del DE. Sarebbe utile creare un modello artificiale di strato lipidico del film lacrimale che sia simile alla composizione lipidica delle secrezioni delle ghiandole di Meibomio raccolte da soggetti normali e che abbia simili proprietà biofisiche. Esistono ancora delle domande riguardo l'eziologia dell'ostruzione delle ghiandole di Meibomio come per esempio, perché non si forma un calazio per ogni ostruzione? Inoltre, abbiamo bisogno di avere più informazioni riguardo le modificazioni, correlate all'età, delle ghiandole di Meibomio e la relazione tra l'ostruzione di queste ghiandole e l'alimentazione. Bisognerebbe chiarire il ruolo di questi lipidi nella lubrificazione della palpebra e della superficie oculare. Esiste una relazione tra la cinetica palpebrale e l'epiteliopatia nella MGD?

B. Modelli *in vitro*/animali

All'epoca del Workshop del 1995 si sapeva relativamente poco circa i modelli animali di MGD oltre al fatto che si verificava la cheratinizzazione dell'epitelio del dotto nei

modelli di conigli trattati con epinefrina.

Da allora, nuovi modelli e scoperte hanno dimostrato che l'insufficienza di androgeni, che nell'uomo è associata alla disfunzione della ghiandola di Meibomio, altera i profili lipidici delle secrezioni delle ghiandole di Meibomio e causa l'instabilità del film lacrimale e l'occhio secco da evaporazione.

L'insufficienza di androgeni nei topi e nei conigli è associata ad alterazione dei profili lipidici e dell'espressione genica nelle ghiandole di Meibomio (Tab. 11).

Ci sono ancora un certo numero di domande a cui non è stata data risposta e sono necessarie ulteriori ricerche, su modelli sperimentali, per determinare il ruolo delle ghiandole di Meibomio nelle varie forme di DE e nel meccanismo che determina la disfunzione lacrimale.

Bisogna comprendere soprattutto la struttura e la composizione dello strato lipidico e i suoi cambiamenti nella MGD sperimentale cercando di determinare quali componenti della secrezione delle ghiandole di Meibomio troviamo effettivamente nel film lacrimale.

Infine è necessario conoscere quali significativi cambiamenti, nella composizione della componente lipidica, sono necessari affinché si modifichi il punto di fusione e l'espressione del lipide.

IX. MECCANISMI ALLA BASE DELLA PATOLOGIA DELL'OCCHIO SECCO

Sulla base dei dati scaturiti dalle informazioni raccolte nei rapporti precedenti, è opinione del gruppo che non ci sia-

Tabella 11
Schema informativo: ghiandole di Meibomio animali

| | Coniglio | Topo | Criceto | Bibl. |
|---|--------------------------|--------------------------|----------------|---------------|
| ↓ MG, eritema congiuntivale | Modello RA-MGD | -/- EDA | Modello RA-MGD | 102, 203, 204 |
| ↑ Cheratinizzazione dei dotti | Modello MGD/ epinefrina | | | 205 |
| ↑ Steroli e ceramidi | Modello MGD/epinefrina | | | 206 |
| MG atrofico con danno alla superficie oculare | | -/- ACAT-1 | | 207 |
| ↓ Androgeni △ Lipidi, espressione genica nelle ghiandole di Meibomio | Modello maschio castrato | Modello maschio castrato | | 208-210 |

no informazioni sufficienti per definire il meccanismo alla base dell'occhio secco, ma che si possano fare delle ipotesi a questo riguardo. Le evidenze indicano che l'occhio secco è una malattia multifattoriale: fattori quali l'età, gli ormoni, la genetica, il sesso, il sistema immunitario, il sistema di innervazione, l'alimentazione, gli agenti patogeni e lo stress ambientale alterano la struttura/funzione cellulare e molecolare delle componenti del *Sistema della Superficie Oculare*. Il termine e il concetto di «*Sistema della Superficie Oculare*» è stato adottato, dopo unanime consenso, al Meeting DEWS di Miami, in Florida, nel Maggio del 2006. Il *Sistema della Superficie Oculare* è definito come gli epiteli di cornea, congiuntiva, ghiandola lacrimale primaria, ghiandole lacrimali accessorie, dotto nasolacrimale, ghiandole di Meibomio e loro matrici basali e apicali, concepiti come un unico sistema funzionale, legati dalla continuità degli epiteli, attraverso il sistema nervoso, endocrino e immunitario (*per ulteriori spiegazioni vedi Gipson, 2007*⁽²¹¹⁾). Nel *Sistema della Superficie Oculare* sono incluse anche le porzioni delle palpebre.

Il fondamento per la descrizione dell'unità vista come *Sistema della Superficie Oculare* ha varie motivazioni. In primo luogo, le funzioni primarie del sistema sono quelle di fornire alla cornea (la superficie oculare) una superficie refrattiva uniforme oltre che di proteggere e mantenere intatta questa superficie. Quindi il nome *Sistema della Superficie Oculare* è legato alla sua funzione primaria nell'ambito della superficie oculare. Secondariamente, tutti gli epiteli della superficie oculare sono in continuità e derivano embriologicamente dal foglietto dell'ectoderma. Gli epiteli corneali e congiuntivali sono in continuità attraverso l'epitelio del dotto, con la ghiandola lacrimale, epitelio ghiandolare,

come pure con le ghiandole lacrimali accessorie, le ghiandole di Meibomio e il sistema nasolacrimale. I sistemi ghiandolari sono essenzialmente delle invaginazioni dell'epitelio della superficie oculare con attività specifiche. Inoltre, tutte le parti degli epiteli producono i componenti del film lacrimale.

Le funzioni dei vari epiteli sono integrate dal sistema nervoso, endocrino, immunitario e vascolare e sono supportate dal tessuto connettivo con i suoi elementi cellulari. Per finire la patologia dell'occhio secco interessa la superficie oculare.

* Il termine *Sistema della Superficie Oculare* rappresenta un'elaborazione dell'Unità Funzionale Lacrimale, che era stata precedentemente descritta da Stern, Pflugfelder e Beuerman⁽²¹²⁻²¹⁵⁾ ed è discussa nei dettagli nel capitolo «*Definizione e Classificazione*» di questa edizione⁽²¹⁶⁾. Le alterazioni di uno e di più componenti del sistema della superficie oculare o delle sue secrezioni porta a dei cambiamenti nel film lacrimale o nelle caratteristiche della superficie epiteliale corneale (p.es. osmolarità lacrimale, volume), causando una predisposizione alla secchezza e al danno epiteliale (come evidenziato dalla colorazione). Il danno epiteliale porta al rilascio di mediatori infiammatori. L'infiammazione amplifica e provoca un ulteriore danno con la alterazione cronica del sistema della superficie oculare.

* Nota aggiunta dal Comitato Estensore

Bibliografia

1. Lemp MA. Report of the National Eye Institute/Industry Workshop on clinical trials in dry eyes. *CLAO J* 1995;21:221-2.
2. Gilbard JP, Farris RL, Santamaria J 2nd. Osmolarity of tear microvolumes in keratoconjunctivitis sicca. *Arch Ophthalmol* 1978;96:677-81.
3. Farris RL, Gilbard JP, Stuchell RN, Mandell UD. Diagnostic tests in keratoconjunctivitis sicca. *CLAO J* 1983;9:23-8.
4. Nichols JJ, Sinnott, LT. Tear film, contact lens, and patient-related factors associated with contact lens-related dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:1319-28.
5. Krenzer KL, Dana MR, Ullman MD, et al. Effect of androgen deficiency on the human meibomian gland and ocular surface. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:4874-82.
6. Mathers WD, Shields WJ, Sachdev MS, et al. Meibomian gland dysfunction in chronic blepharitis. *Cornea* 1991;10:277-285.
7. Tsubota K, Yamada M. Tear evaporation from the ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33:2942-50.
8. Mathers WD, Daley TE. Tear flow and evaporation in patients with and without dry eye. *Ophthalmology* 1996;103:664-9.
9. Goto E, Endo K, Suzuki A, et al. Tear evaporation dynamics in normal subjects and subjects with obstructive meibomian gland dysfunction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:533-9.
10. Cermak JM, Krenzer KL, Sullivan RM, et al. Is complete androgen insensitivity syndrome associated with alterations in the meibomian gland and ocular surface? *Cornea* 2003;22:516-21.
11. Mainstone JC, Bruce AS, Golding TR. Tear meniscus measurement in the diagnosis of dry eye. *Curr Eye Res* 1996;15:653-61.
12. Kallarackal GU, Ansari EA, Amos N, et al. A comparative study to assess the clinical use of fluorescein meniscus time (FMT) with tear break up time (TBUT) and Schirmer's tests (ST) in the diagnosis of dry eyes. *Eye* 2002;16:594-600.
13. Savini G, Barboni P, Zanini M. Tear meniscus evaluation by optical coherence tomography. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2006;37:112-8.
14. Craig JP, Tomlinson A. Importance of the lipid layer in human tear film stability and evaporation. *Optom Vis Sci* 1997;74:8-13.
15. Craig JP, Singh I, Tomlinson A, et al. The role of tear physiology in ocular surface temperature. *Eye* 2000;14 (Pt 4):635-41.
16. Tiffany JM, Winter N, Bliss G. Tear film stability and tear surface tension. *Curr Eye Res* 1989;8:507-15.
17. Nagyoa, B, Tiffany JM. Components responsible for the surface tension of human tears. *Curr Eye Res* 1999;19:4-11.
18. Glasson MJ, Stapleton F, Keay L, et al. Differences in clinical parameters and tear film of tolerant and intolerant contact lens wearers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:5116-24.
19. Begley CG, Chalmers RL, Abetz L, et al. The relationship between habitual patient-reported symptoms and clinical signs among patients with dry eye of varying severity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4753-61.
20. Yamada M, Mochizuki H, Kawai M, et al. Decreased tear lipocalin concentration in patients with meibomian gland dysfunction. *Br J Ophthalmol* 2005;89:803-5.
21. Dohlman CH, Friend J, Kalevar V, et al. The glycoprotein (mucus) content of tears from normals and dry eye patients. *Exp Eye Res* 1976;22:359-65.
22. Argueso P, Balaram M, Spurr-Michaud S, et al. Decreased levels of the goblet cell mucin MUC 5AC in tears of patients with Sjogren's syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:1004-11.
23. Zhao H, Jumblatt JE, Wood TO, Jumblatt MM. Quantification of MUC 5AC protein in human tears. *Cornea* 2001;20:873-7.
24. Goto E, Tseng SC. Differentiation of lipid tear deficiency dry eye by kinetic analysis of tear interference images. *Arch Ophthalmol* 2003;121:173-80.
25. Danjo Y, Hamano T. Observation of precorneal tear film in patients with Sjogren's syndrome. *Acta Ophthalmol Scand* 1995;73:501-5.
26. Shine WE, McCulley JP. Keratoconjunctivitis sicca associated with meibomian secretion polar lipid abnormality. *Arch Ophthalmol* 1998;116:849-52.
27. Grus FH, Sabuncuo P, Herber S, Augustin AJ. Analysis of tear protein patterns for the diagnosis of dry eye. *Adv Exp Med Biol* 2002;506:1213-6.
28. Ohashi Y, Ishida R, Kojima T, et al. Abnormal protein profiles in tears with dry eye syndrome. *Am J Ophthalmol* 2003;136:291-9.
29. Virtanen T, Konttinen YT, Harkonen M, Tervo T. Tear fluid plasmin activity of dry eye patients with Sjogren's syndrome. *Acta Ophthalmol Scand* 1997;75:137-41.
30. Afonso AA, Sobrin L, Monroy DC, et al. Tear fluid gelatinase B activity correlates with IL-1alpha concentration and fluorescein clearance in ocular rosacea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:2506-12.
31. Sobrin L, Liu A, Monroy DC, et al. Regulation of MMP-9 activity in human tear fluid and corneal epithelial culture supernatant. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:1703-9.
32. Grus FH, Podust VN, Bruns K, et al. SEL DI-TOF-MS ProteinChip array profiling of tears from patients with dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46: 863-76.
33. Danjo Y, Lee M, Horimoto K, Hamano T. Ocular surface damage and tear lactoferrin in dry eye syndrome. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1994;72:433-7.
34. Koo BS, Lee DY, Ha HS, et al. Comparative analysis of the tear protein expression in blepharitis patients using two-dimensional electrophoresis. *J Proteome Res* 2005;4:719-24.
35. Seal DV. The effect of aging and disease on tear constituents. *Trans Ophthalmol Soc UK* 1985;104 (Pt 4):355-62.
36. Glasson, M, Stapleton F, Willcox M. Lipid, lipase and lipocalin differences between tolerant and intolerant contact lens wearers. *Curr Eye Res* 2002;25:227-35.
37. Aho VV, Nevalainen TJ, Paavilainen V, Saari KM. Group IIA phospholipase A2 content of tears in patients with keratoconjunctivitis sicca. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2002 Jul;240(7):521-3.
38. Tishler M, Yaron I, Geyer O, et al. Elevated tear interleukin-6 levels in patients with Sjogren syndrome. *Ophthalmology* 1998;105:2327-9.
39. Pflugfelder SC, Jones D, Ji Z, et al. Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva of patients with Sjogren's syndrome keratoconjunctivitis sicca. *Curr Eye Res* 1999;19:201-11.
40. Solomon A, Dursun D, Liu Z, et al. Pro- and anti-inflammatory forms of interleukin-1 in the tear fluid and conjunctiva of patients with dry-eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:2283-92.
41. Molloy MP, Bolis S, Herbert BR, et al. Establishment of the human reflex tear 2D-PA GE reference map: a first step towards the diagnosis of disease. *Electrophoresis* 1997;18: 2811-5.
42. Tsai PS, Evans JE, Green KM, et al. Proteomic analysis of human meibomian gland secretions. *Br J Ophthalmol* 2006;90:372-7.
43. Mulvenna I, Stapleton F, Hains PG, et al. Low molecular weight analysis of tears using matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Clin Experiment Ophthalmol* 2000;28:205-7.
44. Fung K, Morris C, Duncan M. Mass spectrometric techniques applied to the analysis of human tears: a focus on the peptide and protein constituents. *Adv Exp Med Biol* 2002;506(PtA):601-5.
45. Ham BM, Jacob JT, Keese MM, Cole RB. Identification, quantification and comparison of major non-polar lipids in normal and dry eye tear lipidomes by electrospray tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2004;39:1321-36.
46. Gipson IK, Spurr-Michaud SJ, Argueso P, et al. Mucin gene expression in immortalized human corneal-limbal and conjunctival epithelial cell lines. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:2496-506.
47. Robertson DM, Li L, Fisher S, et al. Characterization of growth and differentiation in a telomerase-immortalized human corneal epithelial cell line. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:470-8.
48. Gilbard JP, Rossi SR, Heyda KG. Tear film and ocular surface changes after closure of the meibomian gland orifices in the rabbit. *Ophthalmology* 1989;96: 1180-6.
49. Stewart P, Chen Z, Farley W, et al. Effect of experimental dry eye on tear sodium concentration in the mouse. *Eye Contact Lens* 2005;31:175-8.
50. Gilbard JP, Rossi SR, Gray KL, et al. Tear film osmolarity and ocular surface disease in two rabbit models for keratoconjunctivitis sicca. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988;29:374-8.
51. Nagelhout TJ, Gamache DA, Roberts L, et al. Preservation of tear film integrity and inhibition of corneal injury by dexamethasone in a rabbit model of lacrimal gland inflammation-induced dry eye. *J Ocul Pharmacol Ther* 2005;21:139-48.
52. Salvatore MF, Pedroza L, Beuerman RW. Denervation of rabbit lacrimal gland increases levels of transferrin and unidentified tear proteins of 44 and 36 kDa. *Curr Eye Res* 1999;18:455-66.
53. Song XJ, Li DQ, Farley W, et al. Neurturin-deficient mice develop dry eye and keratoconjunctivitis sicca. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4223-9.
54. Poon AC, Geerling G, Dart JK, et al. Autologous serum eyedrops for dry eyes and epithelial defects: clinical and in vitro toxicity studies. *Br J Ophthalmol* 2001;85:1188-97.
55. Ralph RA. Conjunctival goblet cell density in normal subjects and in dry eye syndromes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1975;14:299-302.
56. Nelson JD, Havener VR, Cameron JD. Cellulose acetate impressions of the ocular surface. Dry eye states. *Arch Ophthalmol* 1983;101:1869-72.
57. Pflugfelder SC, Tseng SC, Yoshino K, et al. Correlation of goblet cell density and mucosal epithelial membrane mucin expression with rose bengal staining in patients with ocular irritation. *Ophthalmology* 1997;104:223-35.
58. Blodi BA, Byrne KA, Tabbara KF. Goblet cell population among patients with inactive trachoma. *Int Ophthalmol* 1988;12:41-5.
59. Sommer A. Treatment of corneal xerophthalmia with topical retinoic acid. *Am J Ophthalmol* 1983;95:349-52.
60. Lievens CW, Connor CG, Murphy H. Comparing goblet cell densities in patients wearing disposable hydrogel contact lenses versus silicone hydrogel contact lenses in an extended-wear modality. *Eye Contact Lens* 2003;29:241-4.
61. Albiets JM, McLennan SG, Lenton LM. Ocular surface management of photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis. *J Refract Surg* 2003;19:636-44.
62. Versura P, Maltarello MC, Cellini M, et al. Detection of mucus glycoconjugates in human conjunctiva by using the lectin-colloidal gold technique in TEM. II. A quantitative study in dry-eye patients. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1986;64: 451-5.

63. Garcher C, Bron AJ, Baudouin C, et al. CA 19-9 ELISA test: a new method for studying mucus changes in tears. *Br J Ophthalmol* 1998;82:88-90.
64. Versura P, Maltarello MC, Cellini M, et al. Detection of mucus glycoconjugates in human conjunctiva by using the lectin-colloidal gold technique in TEM. II. A quantitative study in asymptomatic contact lens wearers. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1987;65:661-7.
65. Hayashi Y, Kao WW, Kohno N, et al. Expression patterns of sialylated epitope recognized by KL-6 monoclonal antibody in ocular surface epithelium of normals and dry eye patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:2212-7.
66. Argueso P, Tisdale A, Mandel U, et al. The cell-layer- and cell-type-specific distribution of GalNAc-transferases in the ocular surface epithelia is altered during keratinization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:86-92.
67. Danjo Y, Watanabe H, Tisdale AS, et al. Alteration of mucin in human conjunctival epithelia in dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:2602-9.
68. Koufakis DI, Karabatsas CH, Sakkas LI, et al. Conjunctival surface changes in patients with Sjogren's syndrome: a transmission electron microscopy study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:541-4.
69. Albiez J, Sanfilippo P, Troutbeck R, Lenton LM. Management of filamentary keratitis associated with aqueous-deficient dry eye. *Optom Vis Sci* 2003;80:420-30.
70. Murube J, Rivas L. Biopsy of the conjunctiva in dry eye patients establishes a correlation between squamous metaplasia and dry eye clinical severity. *Eur J Ophthalmol* 2003;13:246-56.
71. Kunert KS, Tisdale AS, Gipson IK. Goblet cell numbers and epithelial proliferation in the conjunctiva of patients with dry eye syndrome treated with cyclosporine. *Arch Ophthalmol* 2002;120:330-7.
72. Meller D. The fine structure of chromatin alterations in conjunctival epithelial cells in keratoconjunctivitis sicca. *Cornea* 1999;18:225-32.
73. Albiez JM, Bruce AS. The conjunctival epithelium in dry eye subtypes: effect of preserved and non-preserved topical treatments. *Curr Eye Res* 2001;22:8-18.
74. Bjerrum KB. Snake-like chromatin in conjunctival cells of normal elderly persons and of patients with primary Sjogren's syndrome and other connective tissue diseases. *Acta Ophthalmol Scand* 1995;73:33-6.
75. Brignole F, Pisella PJ, De Saint Jean M, et al. Flow cytometric analysis of inflammatory markers in conjunctival epithelial cells of patients with dry eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:1356-63.
76. Benitez del Castillo JM, Wasfy MA, Fernandez C, Garcia-Sanchez J. An in vivo confocal masked study on corneal epithelium and subbasal nerves in patients with dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:3030-5.
77. Xu KP, Yagi Y, Tsubota K. Decrease in corneal sensitivity and change in tear function in dry eye. *Cornea* 1996;15:235-9.
78. Horowitz-Winter J, Vidic B, Schantz G, Schmut O. Early changes in corneal sensation, ocular surface integrity, and tear-film function after laser-assisted subepithelial keratectomy. *J Cataract Refract Surg* 2004;30:2316-21.
79. Hovanesian JA, Shah SS, Maloney RK. Symptoms of dry eye and recurrent erosion syndrome after refractive surgery. *J Cataract Refract Surg* 2001;27:577-84.
80. Wilson SE. Laser in situ keratomileusis-induced (presumed) neurotrophic epitheliopathy. *Ophthalmology* 2001;108:1082-7.
81. Scott IU, Flynn HW Jr, Feuer W, et al. Endophthalmitis associated with microbial keratitis. *Ophthalmology* 1996;103:1864-70.
82. Kawasaki S, Kawamoto S, Yokoi N, et al. Up-regulated gene expression in the conjunctival epithelium of patients with Sjogren's syndrome. *Exp Eye Res* 2003;77:17-26.
83. Nakamura T, Nishida K, Dota A, et al. Elevated expression of transglutaminase 1 and keratinization-related proteins in conjunctiva in severe ocular surface disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:549-56.
84. Nakamura T, Nishida K, Dota A, Kinoshita S. Changes in conjunctival clusterin expression in severe ocular surface disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:1702-7.
85. Narayanan S, Miller WL, McDermott AM. Conjunctival cytokine expression in symptomatic moderate dry eye subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:2445-50.
86. Argueso P, Tisdale A, Spurr-Michaud S, et al. Mucin characteristics of human corneal- limbal epithelial cells that exclude the rose bengal anionic dye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:113-9.
87. Hatchell DL, Sommer A. Detection of ocular surface abnormalities in experimental vitamin A deficiency. *Arch Ophthalmol* 1984;102:1389-93.
88. Gilbard JP, Rossi SR. Tear film and ocular surface changes in a rabbit model of neurotrophic keratitis. *Ophthalmology* 1990;97:308-12.
89. Tei M, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS, Gipson IK. Vitamin A deficiency alters the expression of mucin genes by the rat ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:82-8.
90. Dursun D, Wang M, Monroy D, et al. A mouse model of keratoconjunctivitis sicca. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:632-8.
91. Ueta M, Hamuro A, Yamamoto M, et al. Spontaneous ocular surface inflammation and goblet cell disappearance in I kappa B zeta gene-disrupted mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:579-88.
92. Corfield AP, Donapaty SR, Carrington SD, et al. Identification of 9-O-acetyl- N-acetylneuraminic acid in normal canine pre-ocular tear film secreted mucins and its depletion in keratoconjunctivitis sicca. *Glycoconj J* 2005;22:409-16.
93. Tsubota K, Goto E, Fujita H, et al. Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjogren's syndrome. *Br J Ophthalmol* 1999;83:390-5.
94. Hori Y, Spurr-Michaud S, Russo CL, et al. Differential regulation of membrane-associated mucins in the human ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:114-22.
95. Tseng SC, Hatchell D, Tierney N, et al. Expression of specific keratin markers by rabbit corneal, conjunctival, and esophageal epithelia during vitamin A deficiency. *J Cell Biol* 1984;99:2279-86.
96. Gao J, Schwab TA, Addeo JV, et al. The role of apoptosis in the pathogenesis of canine keratoconjunctivitis sicca: the effect of topical Cyclosporin A therapy. *Cornea* 1998;17:654-63.
97. Toshino A, Shiraishi A, Zhang W, et al. Expression of keratinocyte transglutaminase in cornea of vitamin A-deficient rats. *Curr Eye Res* 2005;30:731-9.
98. Yeh S, Song XJ, Farley W, et al. Apoptosis of ocular surface cells in experimentally induced dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:124-9.
99. Luo L, Li DQ, Doshi A, et al. Experimental dry eye stimulates production of inflammatory cytokines and MMP-9 and activates MAP K signaling pathways on the ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:4293-301.
100. Li DQ, Chen Z, Song XJ, et al. Stimulation of matrix metalloproteinases by hyperosmolarity via a JNK pathway in human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:4302-11.
101. Li DQ, Luo L, Chen Z, et al. JNK and ER K MAP kinases mediate induction of IL-1beta, TNF-alpha and IL-8 following hyperosmolar stress in human limbal epithelial cells. *Exp Eye Res* 2006;82:588-96.
102. Cui CY, Smith JA, Schlessinger D, Chan CC. X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia disruption yields a mouse model for ocular surface disease and resultant blindness. *Am J Pathol* 2005;167:89-95.
103. Rojas B, Cunha R, Zafirakis P, et al. Cell populations and adhesion molecules expression in conjunctiva before and after bone marrow transplantation. *Exp Eye Res* 2005;81:313-25.
104. Raphael M, Bellefgh S, Piette JC, et al. Conjunctival biopsy in Sjogren's syndrome: Correlations between histological and immunohistochemical features. *Histopathology* 1988;13:191-202.
105. Stern ME, Gao J, Schwab TA, et al. Conjunctival T-cell subpopulations in Sjogren's and non-Sjogren's patients with dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:2609-14.
106. Pflugfelder SC, Huang AJ, Feuer W, et al. Conjunctival cytologic features of primary Sjogren's syndrome. *Ophthalmology* 1990;97:985-91.
107. Ogawa Y, Kuwana M, Yamazaki K, et al. Periductal area as the primary site for T-cell activation in lacrimal gland chronic graft-versus-host disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:1888-96.
108. Ogawa Y, Yamazaki K, Kuwana M, et al. A significant role of stromal fibroblasts in rapidly progressive dry eye in patients with chronic GVHD. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:1111-9.
109. Gulati A, Sacchetti M, Bonini A, Dana MR. Chemokine receptor CCR 5 expression in conjunctival epithelium of patients with dry eye syndrome. *Arch Ophthalmol* 2006;124:710-6.
110. Baudouin C, Liang H, Bremond-Gignac D, et al. CCR 4 and CCR 5 expression in conjunctival specimens as differential markers of T(H)1/T(H)2 in ocular surface disorders. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:614-9.
111. Aronni S, Cortes M, Sacchetti M, et al. Upregulation of ICA M-1 expression in the conjunctiva of patients with chronic graft-versus-host disease. *Eur J Ophthalmol* 2006;16:17-23.
112. Tsubota K, Fujihara T, Saito K, Takeuchi T. Conjunctival epithelium expression of HLA-DR in dry eye patients. *Ophthalmology* 1999;106:213-16-9.
113. Jones DT, Monroy D, Ji Z, et al. Sjogren's syndrome: cytokine and Epstein-Barr viral gene expression within the conjunctival epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:3493-3504.
114. Ogawa Y, Kodama H, Kameyama K, et al. Donor fibroblast chimerism in the pathogenic fibrotic lesion of human chronic graft-versus-host disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:4519-27.
115. Matsumoto I, Tsubota K, Satake Y, et al. Common T cell receptor clonotype in lacrimal glands and labial salivary glands from patients with Sjogren's syndrome. *J Clin Invest* 1996;97:1969-77.
116. Pevsner JS, Akata RF, Pflugfelder SC, Voight W. Mononuclear cell phenotypes and immunoglobulin gene rearrangements in lacrimal gland biopsies from patients with Sjogren's syndrome. *Ophthalmology* 1990;97:1599-605.
117. Williamson J, Gibson AA, Wilson T, et al. Histology of the lacrimal gland in keratoconjunctivitis sicca. *Br J Ophthalmol* 1973;57:852-8.
118. Gao J, Morgan G, Tieu D, et al. ICA M-1 expression predisposes ocular tissues to immune-based inflammation in dry eye patients and Sjogren's syndrome-like MRL/lpr mice. *Exp Eye Res* 2004;78:823-35.
119. Sullivan D, et al. Aqueous tear deficiency in Sjogren's syndrome: Possible causes and potential treatment, in Pleyer U, et al (eds). *Oculodermatologic diseases-immunology of bullous ocular-cutaneous disorders*. Buren, The Netherlands, Aeolus Press, 1997, pp 95-152.
120. Zoukhri D. Effect of inflammation on lacrimal gland function. *Exp Eye Res* 2006;82:885-98.

121. Tsubota K, Fujita H, Tsuzaka K, Takeuchi T. Quantitative analysis of lacrimal gland function, apoptotic figures, Fas and Fas ligand expression of lacrimal glands in dry eye patients. *Exp Eye Res* 2003;76:233-40.
122. Saito I, Terauchi K, Shimuta M, et al. Expression of cell adhesion molecules in the salivary and lacrimal glands of Sjogren's syndrome. *J Clin Lab Anal* 1993;7:180-7.
123. Ono M, Yoshino K, Tsubota K, Saito I. Subclass expression of IgA in lacrimal glands of patients with Sjogren's syndrome. *Adv Exp Med Biol* 1994;350:185-8.
124. Zhan H, Towler HM, Calder VL. The immunomodulatory role of human conjunctival epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:3906-10.
125. Barabino S, Shen L, Chen L, et al. The controlled-environment chamber: a new mouse model of dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:2766-71.
126. Niederkorn J, Stern ME, Pflugfelder SC, et al. Desiccating stress induces T cell-mediated Sjogren's syndrome-like lacrimal keratoconjunctivitis. *J Immunol* 2006;176:3950-57.
127. van Bloklund SC, Versnel MA. Pathogenesis of Sjogren's syndrome: characteristics of different mouse models for autoimmune exocrinopathy. *Clin Immunol* 2002;103:111-24.
128. Hassan AS, Clouthier SG, Ferrara JL, et al. Lacrimal gland involvement in graft-versus-host disease: a murine model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:2692-7.
129. Yang T, Zeng H, Zhang J, et al. MHC class II molecules, cathepsins, and La/SSB proteins in lacrimal acinar cell endomembranes. *Am J Physiol* 1999;277:C994-C1007.
130. McDermott A, Perez V, Huang AJ, et al. Pathways of corneal and ocular surface inflammation: A perspective from the Cullen Symposium. *Ocul Surf* 2005;3:S131-S138.
131. Lee-Wing MW, Hodge WG, Diaz-Mitoma F. Investigating a viral etiology for keratoconjunctivitis sicca among patients who are positive for human immunodeficiency virus. *Cornea* 1999;18:671-4.
132. Matoba AY. Ocular disease associated with Epstein-Barr virus infection. *Surv Ophthalmol* 1990;35:145-50.
133. Tsubota K, Fujishima H, Toda I, et al. Increased levels of Epstein-Barr virus DNA in lacrimal glands of Sjogren's syndrome patients. *Acta Ophthalmol Scand* 1995;73:425-30.
134. Zegans ME, Anninger W, Chapman C, Gordon SR. Ocular manifestations of hepatitis C virus infection. *Curr Opin Ophthalmol* 2002;13:423-7.
135. Merayo-Llloves J, Baltatzis S, Foster CS. Epstein-Barr virus dacryoadenitis resulting in keratoconjunctivitis sicca in a child. *Am J Ophthalmol* 2001;132:922-3.
136. Bacman S, Perez-Leiros C, Sterin-Borda L, et al. Autoantibodies against lacrimal gland M3 muscarinic acetylcholine receptors in patients with primary Sjogren's syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:151-6.
137. Tsubota K, Fujihara T, Takeuchi T. Soluble interleukin-2 receptors and serum autoantibodies in dry eye patients: correlation with lacrimal gland function. *Cornea* 1997;16:339-44.
138. Paulsen F, Langer G, Hoffman W, Berry M. Human lacrimal gland mucins. *Cell Tissue Res* 2004;316:167-77.
139. Rivas L, Murube J, Toledano A. [Innervation of the lachrymal gland in patients with primary Sjogren's syndrome. An immunohistopathological study]. *Arch Soc Esp Ophthalmol* 2002;77:623-29.
140. Obata H, Yamamoto S, Horiuchi H, Machinami R. Histopathologic study of human lacrimal gland. Statistical analysis with special reference to aging. *Ophthalmology* 1995;102:678-86.
141. McCarty CA, Bansal AK, Livingston PM, et al. The epidemiology of dry eye in Melbourne, Australia. *Ophthalmology* 1998;105:1114-9.
142. Gillette T, Allansmith MR, Greiner JV, Janusz M. Histologic and immunohistologic comparison of main and accessory lacrimal tissue. *Am J Ophthalmol* 1980;89:724-30.
143. Seifert P, Spitznas M, Koch F, Cusumano A. The architecture of human accessory lacrimal glands. *Ger J Ophthalmol* 1993;2:444-54.
144. Allansmith MR, Kajiyama G, Abelson MB, Simon MA. Plasma cell content of main and accessory lacrimal glands and conjunctiva. *Am J Ophthalmol* 1976;82:819-26.
145. Hunt S, Spitznas M, Seifert P, Rauwolf M. Organ culture of human main and accessory lacrimal glands and their secretory behaviour. *Exp Eye Res* 1996;62:541-54.
146. Seifert P, Spitznas M. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) innervation of the human eyelid glands. *Exp Eye Res* 1999;68:685-92.
147. Esmail-Gutstein B, Hewlett BR, Harvey JT. Characterization of adrenergic receptors in the accessory lacrimal glands of the upper eyelid. *Ophthalm Plast Reconstr Surg* 1999;15:245-51.
148. Gillette TE, Greiner JV, Allansmith MR. Immunohistochemical localization of human tear lysozyme. *Arch Ophthalmol* 1981;99:298-300.
149. Obata H, Horiuchi H, Dobashi Y, et al. Immunohistochemical localization of epidermal growth factor in human main and accessory lacrimal glands. *Jpn J Ophthalmol* 1993;37:113-21.
150. Yen MT, Pflugfelder SC, Feuer WJ. The effect of punctal occlusion on tear production, tear clearance, and ocular surface sensation in normal subjects. *Am J Ophthalmol* 2001;131:314-23.
151. A yub M, Thale AB, Hedderich J, et al. The cavernous body of the human efferent tear ducts contributes to regulation of tear outflow. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4900-7.
152. Paulsen FP, Thale AB, Hallman UJ, et al. The cavernous body of the human efferent tear ducts: function in tear outflow mechanism. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:965-70.
153. Guo Z, Azzarolo AM, Schechter JE, et al. Lacrimal gland epithelial cells stimulate proliferation in autologous lymphocyte preparations. *Exp Eye Res* 2000;71:11-22.
154. Guo Z, Song D, Azzarolo AM, et al. Autologous lacrimal-lymphoid mixed cell reactions induce dacryoadenitis in rabbits. *Exp Eye Res* 2000;71:23-31.
155. Zhu Z. Lacrimal histopathology and ocular surface disease in a rabbit model of autoimmune dacryoadenitis. *Cornea* 2003;22:25-32.
156. Franklin R, McGee DW, Shepard KE. Lacrimal gland-directed B cell responses. *J Immunol* 1985;135:95-99.
157. Liu S, Zhou DH, Franklin RM. Lacrimal gland-derived lymphocyte proliferation potentiating factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:650-7.
158. Jabs DA, Enger C, Prendergast RA. Murine models of Sjogren's syndrome. Evolution of the lacrimal gland inflammatory lesions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:371-80.
159. Jabs DA, Prendergast RA, Rorer EM, et al. Cytokines in autoimmune lacrimal gland disease in MRL/MPJ mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:2567-71.
160. A kpek EK, Jabs DA, Gerard HC, et al. Chemokines in autoimmune lacrimal gland disease in MRL/MPJ mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:185-90.
161. Sato EH, Ariga H, Sullivan DA. Impact of androgen therapy in Sjogren's syndrome: hormonal influence on lymphocyte populations and Ia expression in lacrimal glands of MRL/MPJ/lpr mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33:2537-45.
162. Rocha E, Wickham LA, Huang Z, et al. Presence and testosterone influence on the levels of anti- and pro-inflammatory cytokines in lacrimal tissues of a mouse model of Sjogren's syndrome. *Adv Exp Med Biol* 1998;438:485-91.
163. Toda I, Wickham LA, Sullivan DA. Gender and androgen treatment influence the expression of proto-oncogenes and apoptotic factors in lacrimal and salivary tissues of MRL/lpr mice. *Clin Immunol Immunopathol* 1998;86:59-71.
164. Toda I, Sullivan BD, Wickham LA, Sullivan DA. Gender- and androgen-related influence on the expression of proto-oncogene and apoptotic factor mRNAs in lacrimal glands of autoimmune and non-autoimmune mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999;71:49-61.
165. Tornwall J, Lane TE, Fox RI, Fox HS. T cell attractant chemokine expression initiates lacrimal gland destruction in nonobese diabetic mice. *Lab Invest* 1999;79:1719-26.
166. Robinson CP, Cornelius J, Bounous DE, et al. Characterization of the changing lymphocyte populations and cytokine expression in the exocrine tissues of autoimmune NOD mice. *Autoimmunity* 1998;27:29-44.
167. Vendramini AC, Soo C, Sullivan DA. Testosterone-induced suppression of autoimmune disease in lacrimal tissue of a mouse model (NZB/NZW F1) of Sjogren's syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:3002-6.
168. Sullivan DA, Edwards JA. Androgen stimulation of lacrimal gland function in mouse models of Sjogren's syndrome. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997;60:237-45.
169. Ariga H, Edwards J, Sullivan DA. Androgen control of autoimmune expression in lacrimal glands of MRL/MPJ/lpr mice. *Clin Immunol Immunopathol* 1989;53:499-508.
170. Sato E, Sullivan D. Comparative influence of steroid hormones and immunosuppressive agents on autoimmune expression in lacrimal glands of a female mouse model of Sjogren's syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:2632-42.
171. Rocha E, et al. Effect of androgen analogue treatment and androgen withdrawal on lacrimal gland inflammation in a mouse model (MRL/Mplpr/lpr) of Sjogren's syndrome. *Reg Immunol* 1994;6:270-7.
172. Liu SH, Prendergast RA, Silverstein AM. Experimental autoimmune dacryoadenitis. I. Lacrimal gland disease in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987;28:270-5.
173. Mizejewski G. Studies of autoimmune induction in the rat lacrimal gland. *Experientia* 1978;34:1093-5.
174. Huang Z, Lambert RW, Wickham LA, Sullivan DA. Analysis of cytomegalovirus infection and replication in acinar epithelial cells of the rat lacrimal gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:1174-86.
175. Stern M. Ocular surface inflammation: a causative factor in dry eye. *J Rheumatol* 1997;50(Suppl):42.
176. Gao J, Stern M. Modulators of apoptosis in the lacrimal gland of dry eye dogs. *J Rheumatol* 1997;50(Suppl):43.
177. Liu SH, Zhou DH, Hess AD. Adoptive transfer of experimental autoimmune dacryoadenitis in susceptible and resistant mice. *Cell Immunol* 1993;150:311-20.
178. Ono M, Rocha FJ, Sullivan DA. Immunocytochemical location and hormonal control of androgen receptors in lacrimal tissues of the female MRL/MPJ/lpr mouse model of Sjogren's syndrome. *Exp Eye Res* 1995;61:659-66.
179. Yamamoto H, Sims NE, Maccauley SP, et al. Alterations in the secretory response of non-obese diabetic (NOD) mice to muscarinic receptor stimulation. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;78:245-55.
180. Winer S, Assaturov I, Cheung R, et al. Primary Sjogren's syndrome and deficiency of ICA 69. *Lancet* 2002;360:1063-9.
181. Zoukhri D, Kublin CL. Impaired neurotransmitter release from lacrimal and salivary gland nerves of a murine model of Sjogren's syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:925-32.

182. H anej N, Nakamura T, Takio K, et al. Identification of alpha-fodrin as a candidate autoantigen in primary Sjogren's syndrome. *Science* 1997;276:604-7.
183. F ang Y, Choi D, Searles RP, Mathers WD. A time course microarray study of gene expression in the mouse lacrimal gland after acute corneal trauma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:461-9.
184. P aulsen FP, Foge M, Thale AB, et al. Animal model for the absorption of lipophilic substances from tear fluid by the epithelium of the nasolacrimal ducts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:3137-43.
185. P aulsen F, Thale AB, Mentlein R. What happens to tears inside the efferent lacrimal passage? An animal experimental study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2000;238:496-9.
186. H irt RA. Comparative anatomy of the canine efferent tear duct system with regard to mucin production. *Ann Anat Supp* 2003;185:259-260.
187. R ios JD, Horikawa Y, Chen LL, et al. Age-dependent alterations in mouse exorbital lacrimal gland structure, innervation and secretory response. *Exp Eye Res* 2005;80:477-91.
188. Sullivan BD, Cermak JM, Sullivan RM, et al. Correlations between nutrient intake and the polar lipid profiles of meibomian gland secretions in women with Sjogren's syndrome. *Adv Exp Med Biol* 2002;506(Pt A):441-7.
189. R obin JB, Jester JV, Nobe J, et al. In vivo transillumination biomicroscopy and photography of meibomian gland dysfunction. A clinical study. *Ophthalmology* 1985;92:1423-6.
190. G utgesell VJ, Stern GA, Hood CI. Histopathology of meibomian gland dysfunction. *Am J Ophthalmol* 1982;94:383-7.
191. Matsuoka T. Video-meibographic observations of the meibomian gland. *Jpn J Clin Ophthalmol* 1996;50:351-4.
192. Y okoi N, Mossa F, Tiffany JM, Bron AJ. Assessment of meibomian gland function in dry eye by meibometry. *Arch Ophthalmol* 1999;117:723-9.
193. H ykin PG, Bron AJ. Age-related morphological changes in lid margin and meibomian gland anatomy. *Cornea* 1992;11:334-42.
194. Shimazaki J, Goto E, Ono M, et al. Meibomian gland dysfunction in patients with Sjogren syndrome. *Ophthalmology* 1998;105:1485-8.
195. Shimazaki J, Sakata M, Tsuboto K. Ocular surface changes and discomfort in patients with meibomian gland dysfunction. *Arch Ophthalmol* 1995;113:1266-70.
196. Sullivan BD, Evans JE, Dana MR, Sullivan DA. Impact of androgen deficiency on the lipid profiles in human meibomian gland secretions. *Adv Exp Med Biol* 2002;506(Pt A):449-58.
197. Sullivan BD, Evans JE, Krenzer KL, et al. Impact of antiandrogen treatment on the fatty acid profile of neutral lipids in human meibomian gland secretions. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:4866-73.
198. Sullivan BD, Evans JE, Cermak JM, et al. Complete androgen insensitivity syndrome: effect on human meibomian gland secretions. *Arch Ophthalmol* 2002;120:1689-99.
199. Ong BL, Larke JR. Meibomian gland dysfunction: some clinical, biochemical and physical observations. *Ophthalmic Physiol Opt* 1990;10:144-8.
200. Dougherty JM, McCulley JP. Bacterial lipases and chronic blepharitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986;27:486-91.
201. I sreb MA, Greiner VJ, Korb DR, et al. Correlation of lipid layer thickness measurements with fluorescein tear film break-up time and Schirmer's test. *Eye* 2003;17:79-83.
202. Sullivan BD, Evans JE, Dana MR, Sullivan DA. Influence of aging on the polar and neutral lipid profiles in human meibomian gland secretions. *Arch Ophthalmol* 2006;124:1286-92.
203. L ambert RW, Smith RE. Pathogenesis of blepharoconjunctivitis complicating 13-cis-retinoic acid (isotretinoin) therapy in a laboratory model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988;29:1559-64.
204. L ambert RW, Smith RE. Effects of 13-cis-retinoic acid on the hamster meibomian gland. *J Invest Dermatol* 1989;92:321-5.
205. J ester JV, Nicolaides N, Kiss-Palvolgyi I, Smith RE. Meibomian gland dysfunction. II. The role of keratinization in a rabbit model of MGD. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30:936-45.
206. Nicolaides N, Santos EC, Smith RE, Jester JV. Meibomian gland dysfunction. III. Meibomian gland lipids. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30:946-51.
207. Y agyu H, Kitamine T, Osuga J, et al. Absence of ACA T-1 attenuates atherosclerosis but causes dry eye and cutaneous xanthomatosis in mice with congenital hyperlipidemia. *J Biol Chem* 2000;275:21324-30.
208. Steagall R, Yamagami H, Wickham LA, Sullivan DA. Androgen control of gene expression in the rabbit meibomian gland. *Adv Exp Med Biol* 2002;506(Pt A):465-476.
209. Sullivan DA, Sullivan BD, Ullman MD, et al. Androgen influence on the meibomian gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:3732-42.
210. Schirra F, Suzuki T, Richards SM, et al. Androgen control of gene expression in the mouse meibomian gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:3666-75.
211. Gipson IK. Friedenwald Lecture: The ocular surface: the challenge to enable and protect vision. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (2007, in press).
212. Stern ME, Beuerman RW, Fox RI, et al. The pathology of dry eye: the interaction between the ocular surface and lacrimal glands. *Cornea* 1998;17:584-9.
213. P flugfelder SC, Solomon A, Stern ME. The diagnosis and management of dry eye: a twenty-five year review. *Cornea* 2000;19:644-9.
214. Beuerman RW, Mircheff AK, Pflugfelder SC, Stern ME. The lacrimal functional unit, in Pflugfelder SC, Stern ME, Beuerman RW. Dry eye and the ocular surface—a unified approach. New York, Marcel Dekker, 2004.
215. Stern ME, Gao J, Siemasko KF, et al. The role of the lacrimal functional unit in the pathophysiology of dry eye. *Exp Eye Res* 2004;78:409-16.
216. (No authors listed) Definition and classification of dry eye: Report of the Definition and Classification Subcommittee of the 2007 Dry Eye Workshop. *Ocul Surf* 2007;5:75-92.