

# Determinación de los niveles de expresión del gen del lumicano, en el estroma corneal de conejos sometidos a crosslinking

Tte. Nav. SSN. M.C.N. José Isabel **Pozos-Domingo**,\* Mayor M.C. Gabriel Antonio **Sierra-Acevedo**,<sup>†</sup> Mayor M.C. Mtra. en Biol. Molec. Hilda Beatriz **Gómez-Robledo**,<sup>‡</sup> Tte. Quím. Biol. Pascual Francisco **Lucio-Monter**,<sup>§</sup> Mayor M.V.Z. Sergio **Ramírez-Silva**<sup>||</sup>

Hospital Central Militar/Escuela Militar de Graduados de Sanidad. Ciudad de México.

## RESUMEN

**Introducción.** El término crosslinking puede traducirse como “enlaces cruzados”, y consiste en una fotopolimerización de las fibras estromales mediante riboflavina y rayos ultravioleta tipo A (UVA), que forma nuevos enlaces covalentes entre las láminas de colágeno del estroma corneal, incrementando su rigidez hasta un 70%. El lumicano es una proteína que pertenece al grupo de los llamados pequeños proteoglicanos ricos en leucina y tiene como función entre otras regular el diámetro de las fibras de colágeno y el espacio interfibrilar.

**Objetivo.** Medir los niveles de expresión del gen del lumicano en estromas corneales de conejos tratados con crosslinking y compararlos con estromas corneales no tratados.

**Materiales y métodos.** Dos grupos: grupo 1, cinco ojos izquierdos se trataron con crosslinking; Grupo 2, cinco ojos derechos sanos que no se trataron con crosslinking formando el grupo control. A los tres días de haber tratado al Grupo 1 se extrajeron las córneas de ambos grupos con la finalidad de medir la expresión del gen que codifica la proteína lumicano mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con método semicuantitativo (RT-PCR) y se correlacionaron dichos resultados.

**Resultados.** Se encontró una diferencia estadísticamente significativa al correlacionar los resultados de RT-PCR de ambos grupos, las diferencias fueron a favor de un aumento en la expresión del gen del lumicano en el grupo tratado.

**Palabras clave:** Crosslinking, queratocono, RT-PCR, riboflavina, UVA.

## *Determination of levels of gene expression lumicano in the corneal stroma in rabbits subjected to crosslinking*

### SUMMARY

**Introduction.** The crosslinking is a photopolymerization of stromal fibers using riboflavin and A ultraviolet light (UVA), which form new covalent bonds between the layers of corneal stromal collagen, increasing its rigidity up 70%. The lumican is a protein that belongs to the so-called small leucine-rich proteoglycans, and functions including regulating the diameter of collagen fibers and interfibrillar space.

**Objective.** Measure gene expression levels of lumican in corneal stroma of rabbits treated with crosslinking and compared with untreated corneal stroma.

**Materials and methods.** Two groups: group 1, 5 left eyes was treated with crosslinking, group 2, 5 healthy right eyes were not treated with crosslinking formed the control group. After 3 days of having tried to group 1 were extracted corneas of both groups in order to measure the expression of the gene encoding the protein lumican chain reaction of real-time polymerase semiquantitative method (RT-PCR) and correlated those results.

**Results.** There was a statistically significant difference to correlate the results of RT-PCR in both groups; the differences were in favor of increased gene expression of lumican in the treated group.

**Key words:** Crosslinking, keratoconus, RT-PCR, riboflavin, UVA.

\* Escuela Militar de Graduados de Sanidad Universidad del Ejército y Fuerza Aérea. <sup>†</sup> Especialista en Oftalmología y subespecialista en córnea del Departamento de Córnea del Hospital Central Militar. <sup>‡</sup> Departamento de Biología Molecular de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad. <sup>§</sup> Departamento de Biología Molecular de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad. <sup>||</sup> Departamento de Bioterio de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad.

#### Correspondencia:

Tte. Nav. SSN. M.C.N. José Isabel Pozos-Domingo.

Escuela Militar de Graduados de Sanidad Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, Cerrada de Palomas S/N Esq. Periférico, Col. Lomas de San Isidro, C.P. 11200, México, D.F.

Correo electrónico: pozos59@hotmail.com

Recibido: Noviembre 4, 2011.

Aceptado: Julio 19, 2012.

## Introducción

El queratocono es una enfermedad de la córnea cuya patología radica en las fibras de colágeno del estroma corneal, es un padecimiento sin etiología específica y sin tratamiento definitivo. En la actualidad está en boga la aplicación de crosslinking en córneas con queratocono, el cual para algunos autores sus resultados son muy prometedores, pero, sin embargo, este procedimiento aún no supera las pruebas del tiempo.

Las fibrillas de colágeno en el estroma corneal están puenteadas y conectadas por los glucosaminoglicanos aniónicos (GAGs) de los pequeños proteoglicanos ricos en leucina (SLRPs), ayudando a definir la forma del tejido, y, por lo tanto, son llamados “moduladores de forma”.<sup>1</sup> Cuatro SLRPs están presentes en la matriz extracelular del estroma corneal: decorina (dermatán sulfato), lumicano, mimecano y queratocano (los tres queratán sulfato).<sup>2</sup> Estos SLRPs poseen las siguientes características: un dominio N-terminal, seguido de una región que contiene un racimo de cuatro cisteínas, el cual incluye un grupo de aminoácidos Cis-X-Cis, seguido por el núcleo de la proteína que consiste en 7-11 arreglos ricos en leucina con una secuencia de consenso L-X-X-L-X-L-X-X-N/C-X-L hacia la C-terminal antes del cual hay un puente de disulfuro adicional.<sup>3,4</sup> Los núcleos proteicos de los SLRPs son sintetizadas en el retículo endoplasmático rugoso de los queratocitos del estroma corneal y luego en el aparato de Golgi se adicionan múltiples cadenas de polisacáridos (90-95% del peso total), en número y composición variable.<sup>5</sup> Las cadenas de GAGs, se sintetizan en el aparato de Golgi y son unidades de disacáridos aniónicos no ramificados que se repiten n veces (siendo n desde 1 a < 100). Las unidades de disacáridos se constituyen de manera alternada de un ácido urónico que puede ser ácido D-glucurónico (GlcA) o ácido L-idurónico (IdoA) y un amino-azúcar, ya sea D-galactosamina (GalN), D-glucosamina (GlcN) o galactosa (Gal).<sup>6</sup>

Debido a los grupos carboxilo y sulfato en la cadena del polisacárido, los GAGs presentan una carga electrostática negativa global y por lo tanto, son hidrofílicos y debido a repulsiones electrostáticas intramoleculares adoptan configuraciones lineales y flexibles, recubierto por radicales aniónicos.<sup>7,8</sup> En general los proteoglicanos queratán sulfato están relacionados con la regulación del diámetro de las fibras de colágeno y los proteoglicanos dermatán sulfato participan en el control del espacio interfibrilar.<sup>4</sup> El lumicano pertenece a los SLRPs,<sup>3</sup> en el conejo el gen (Lum) que codifica para el lumicano se localiza en el cromosoma 4.<sup>9</sup> El lumicano corneal tiene 3-4 cadenas laterales de GAGs del tipo KS, su núcleo proteico es de 38 kDa. Sus funciones conocidas son:

- Regular el ensamble del colágeno de la matriz extracelular estromal.
- Mantener una arquitectura fibrilar normal en el estroma posterior mediante la regulación del ensamble fibrilar.
- Mantener un contenido óptimo de queratán sulfato requerido para la transparencia corneal.<sup>10,11</sup>

La relación entre el lumicano y la transparencia de la córnea ha sido estudiado en embriones de pollo,<sup>12</sup> en éstos la transparencia corneal inicia en el día 15 del desarrollo y se completa en el día 20. El precursor del lumicano en estas córneas tiene cadenas laterales de polilactosamina (queratán no sulfatados), el cual se incrementa entre los días 7 y 9 del desarrollo y disminuye exponencialmente hasta el día 18. El lumicano con cadenas laterales de glucosaminoglicanos sulfatados (es decir, proteoglucano) se detecta a partir del día 15 del desarrollo embrionario, cuando la transparencia corneal se incrementa y se acumula considerablemente hasta el día 18. La interrupción de la producción de lumicano con cadenas laterales de polilactosamina y el inicio de la síntesis de lumicano como proteoglucano en el inicio de la transparencia corneal sugiere que la sulfatación de las cadenas laterales del lumicano es importante para la transparencia corneal. Esto también es apoyado por estudios en ratones,<sup>13</sup> donde se observó que la sulfatación de la molécula de lumicano, el momento de la apertura del ojo y la transparencia corneal son concurrentes, probablemente porque la abundancia de KS está relacionado con el mantenimiento de un nivel de hidratación del tejido fundamental para la transparencia corneal,<sup>14</sup> estando demostrado que en los niveles de hidratación normal del estroma corneal los proteoglicanos (PGs) dermatán sulfato están totalmente hidratados, mientras que los KS están sólo parcialmente hidratados, lo que sugiere que KS proporciona un búfer dinámico para la hidratación corneal y además el lumicano es capaz de organizar las fibras de colágeno de manera más efectiva, como lo afirman otros autores.<sup>15</sup> El papel crucial del lumicano en la regulación del ensamble de colágeno en fibras ha sido establecido por estudios en ratones homocigotos por una mutación nula en lumicano,<sup>15</sup> estos ratones knock-out sin lumicano desarrollan opacidad corneal bilateral y fragilidad de la piel, parecido a algún tipo de síndrome de Ehler Danlos, en los que se observó pérdida de 25% del keratán sulfato corneal, los diámetros de las fibrillas de colágeno están anormalmente aumentados, no hay regulación del crecimiento de las fibras de colágeno, viéndose afectados la organización y la regulación de los espacios entre las fibras de colágeno.<sup>16</sup> En general la síntesis de proteoglicanos se ve disminuida 24 h después de la aplicación de LASIK en córneas humanas con un marcado cambio en la organización de las fibras de colágeno.<sup>17</sup>

La idea de reforzar de forma terapéutica las estructuras de colágeno, tiene más de 30 años.<sup>18</sup> En 1993 es introducido en oftalmología el “crosslinking corneal” por investigadores de la Universidad de Dresden, Alemania (Wollensak, Spoerl y Seiler)<sup>19-22</sup> como nuevo tratamiento del queratocono realizando estudios de seguridad, toxicidad y eficacia en animales (cerdo y conejo), y cuyo fin es evitar o al menos retrasar la evolución típica de la enfermedad.

El crosslinking se basa en un proceso de fotosensibilización mediante riboflavina (vitamina B12) y radiación UVA, una vez que se ha retirado el epitelio corneal, la solución de riboflavina al 0.1% y dextrano al 20% es absorbido por la

córnea, permitiendo la aplicación segura de UVA de 365 a 370 nm sin lesionar el endotelio ni estructuras intraoculares porque tiene dos funciones: liberar radicales libres y actuar como filtro de las radiaciones.<sup>22</sup> En experimentos en animales se ha demostrado que los queratocitos presentan muerte celular hasta en los 350 µm de profundidad del estroma anterior, a los seis meses el área vuelve a poblarse y la pérdida de células en el estroma corneal no es considerada crítica.<sup>23</sup>

Se han reportado complicaciones de crosslinking como son:

- Haze precoz 11% y tardío (al año) 4%.
- Edema corneal precoz (12/34).
- Pérdida de más de dos líneas de visión (3/34).
- Queratitis lamelar difusa.
- Queratitis herpética con iritis y endotelitis.

Otros son derivados de la luz ultravioleta como son:

- Fotoqueratitis en la córnea .
- Catarata.
- Daño térmico o fotoquímico en la retina.<sup>24-26</sup>

### Material y métodos

Se incluyeron diez ojos de cinco conejos machos adultos Nueva Zelanda, y el estudio se llevó a cabo de acuerdo con la declaración para el uso de animales en investigación oftalmológica y visual de la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (siglas en inglés ARVO). Los conejos fueron enumerados del 1 al 5, formándose dos grupos de córneas: grupo tratado formado por los ojos izquierdos de cada conejo y se les sometió a crosslinking corneal, y el grupo no tratado formado por los ojos derechos de los mismos conejos y a los cuales no se les aplicó crosslinking. La aplicación de crosslinking fue de acuerdo con el protocolo de Siena, usando el equipo de crosslinking modelo XLamp marca MEC (medical Engineering Colombia), que emite luz UV-A con una longitud de onda de 370 nm. Tres días después de aplicar crosslinking a las córneas izquierdos de cada conejo, todos los conejos fueron sacrificados para tomar los botones corneales tanto derecho como izquierdo. Ambos grupos de córneas fueron trasladados y procesados en el laboratorio de biología molecular para extraer el ARN de los queratocitos estromales y posteriormente se obtuvo el ADN complementario del lumicano y del gen endógeno GADPh para poder realizar RT-PCR tiempo real de tipo semicuantitativo. Los primers utilizados para llevar a cabo la reacción fueron los siguientes:

- Gen Lum Sentido: 5'CATCTCTGGTTGAGCTGGATCTC3'.
- Antisentido: 5'GAGTAGGATAGTGGCCCCAGG3'.
- Gen GADPh Sentido 5'TGCCCTCAATGACCACTTTG3.
- Antisentido: 5'CCTTGGAGGCCATGTGGAC3'.

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el programa SPSS 12.0 (SPSS Chicago IL), el cual consistió en la realización del coeficiente de correlación lineal de Pearson y la

prueba de la  $\chi^2$  para la comparación de los dos grupos de ojos con respecto al grado de expresión del gen Lum en los dos grupos.

### Resultados

Demostramos que sí hay modificaciones en los niveles de expresión del gen del lumicano en los queratocitos posterior al tratamiento con crosslinking corneal. En el caso número 1 el ojo derecho no tratado (*Cuadro 1 y Figura 1*), el 1 indica que el gen se expresó en igual proporción comparado con el gen endógeno, el valor de 0.9997 del ojo izquierdo tratado se interpreta como un nivel de expresión por abajo comparado con el endógeno, ya que no llega a la unidad, quedando invertida esta situación en el caso número 2, porque aquí el ojo derecho no tratado fue el que presentó una expresión del gen por debajo de la unidad (0.92172), en contraste con el ojo izquierdo tratado del mismo caso que tiene un valor de 1.5039, el cual muestra que el gen se expresó un poco mas de 1.5 veces comparado con el gen endógeno utilizado.

En el caso 3 se presentó una sobreexpresión en el ojo no tratado y en el ojo tratado, en el ojo no tratado con un valor de 3.2504, y el ojo izquierdo tratado presentó la expresión más alta registrada en todos los casos con un valor de 9.3396 veces el valor de la expresión del gen endógeno. En el caso número 4 ambos ojos tuvieron una sobreexpresión del gen, el derecho no tratado con un valor de 2.2618 y el ojo izquierdo tratado registró el segundo nivel más alto de todos los casos con un valor de 6.4368. En el caso número 5 tanto el ojo derecho como el izquierdo presentaron sobreexpresión del gen, con valores de 1.7035 y 2.94336, respectivamente.

El resultado de la prueba de  $\chi^2$  para los valores obtenidos de ambos grupos de ojos tratados y no tratados, fue  $p < 0.00041936$ .

El resultado del coeficiente de correlación lineal de Pearson entre ambos grupos de ojos tratados y no tratados fue  $r = 0.98537901$ .

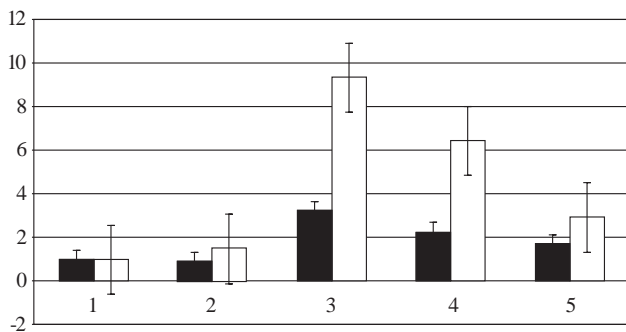
### Discusión

Aunque al comparar de manera independiente el grupo tratado y el no tratado no se mantuvieron niveles constantes

**Cuadro 1.** Cuantificación relativa de la expresión del gen del lumicano.

No. progresivo	Ojos no tratados	Ojos tratados
1	1	0.9997
2	0.92172	1.5039
3	3.2504	9.3396
4	2.2618	6.4368
5	1.7035	2.94336

La primera columna de la izquierda corresponde al número progresivo con el que fue etiquetado cada uno de las muestras en su respectivo grupo, la columna de OD corresponde al grupo de ojos no tratados, la columna de OI corresponde al grupo de ojos tratados. Fuente: Directa.



**Figura 1.** Cuantificación relativa o semicuantitativa de la expresión del lumicano comparado entre el grupo de ojos tratados (blanco) y no tratados (negro). Se observa aumento de la expresión del gen en el grupo de ojos tratados. La prueba de  $\chi^2$  resultó con una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos con una  $p = 0.00041936$ . La correlación de Pearson entre ambos resultó  $r = 0.98537901$ , lo cual demuestra una correlación positiva entre ambas variables. Fuente: Cuadro 1.

de expresión, al comparar ambos grupos las modificaciones se presentaron en su mayoría como una sobreexpresión del gen del lumicano por parte del grupo de córneas tratadas. Al realizar la prueba de  $\chi^2$  para los valores obtenidos de ambos grupos, ésta resultó con una diferencia estadísticamente significativa, con una  $p < 0.00041936$ , lo cual muestra que los resultados obtenidos entre ambos grupos se dieron por influencia del tratamiento. Por otro lado, al realizar el coeficiente de correlación lineal de Pearson entre ambos grupos, resultó  $r = 0.98537901$ , lo cual muestra una correlación lineal positiva entre ambos grupos de variables.

Nuestro resultado es compatible con los obtenidos por Rebouças Martins S.A., quien estudió la cantidad de proteoglicanos en córneas humanas 24 horas después de ser sometidos a láser *in situ* keratomileusis (LASIK)<sup>17</sup> midiendo los niveles de proteoglicanos con método de electroforesis con gel de agarosa y encontrado bajos niveles de proteoglicanos, por lo que estos niveles bajos de proteoglicanos en el estroma corneal estimulan a los queratocitos para la síntesis de proteoglicanos, mismo que corroboramos en nuestro estudio.

El primer estímulo para el aumento de la expresión del gen puede ser la desepitelización corneal antes de la aplicación de crosslinking y también como parte de la respuesta inflamatoria, estimulando a los queratocitos que quedan viables por debajo de las 300  $\mu\text{m}$  del espesor estromal, para sintetizar nuevas proteínas de lumicano y subsanar la pérdida ocasionado por la aplicación de crosslinking, según lo observado por E.C. Carlson<sup>27</sup> en procesos inflamatorios provocados por lipopolisacáridos bacterianos hay aumento de la expresión del lumicano y participando éste en el infiltrado de células polimorfonucleares en el estroma corneal, por otro lado, Saika S<sup>28</sup> refirió que el lumicano también participa en la migración de células epiteliales en el proceso de cicatrización aguda.

Es probable que el aumento del diámetro de las fibras de colágeno observado por otros investigadores<sup>21</sup> en realidad

se trate de una pérdida funcional de proteoglicanos, los cuales, como se mencionó en los antecedentes, regulan el diámetro de las fibras de colágeno y el espacio interfibrilar, esta pérdida funcional es fácilmente explicable con la teoría de John E. Scott y Alison M. Thomlinson,<sup>1</sup> quienes proponen que los radicales libres de oxígeno (en este caso liberados por la riboflavina), fragmentan las cadenas de GAGs que mantienen los espacios interfibrilares y como consecuencia hay una disfunción global del proteoglicano.

Por otro lado, es probable que la opacidad permanente observada en las córneas tratadas con crosslinking se deba a apoptosis masiva de queratocitos o probablemente a que no hay una respuesta adecuada por parte de los mismos para restaurar la cantidad de proteoglicanos necesario para mantener la arquitectura normal de las fibras de colágeno y por otro lado al no haber proteínas centrales de lumicano, las moléculas de GAGs no tienen un sitio de adhesión para cumplir con la función de aportar las moléculas sulfatadas y mantener la carga negativa global necesaria para la hidratación adecuada del estroma.<sup>14</sup>

Los efectos disfuncionales ocasionados por alteraciones de la molécula del lumicano pueden ser acompañados por alteraciones en los niveles de expresión de queratán sulfato otro proteoglicano presente en el estroma corneal y que ocupa el segundo lugar en el aporte de cadenas de GAGs necesarios para regular diámetros de fibras de colágeno y la hidratación corneal, como se ha demostrado en córneas de ratones, la expresión del gen del queratán sulfato es directamente proporcional a la expresión del gen del lumicano.<sup>29</sup>

Otra mecanismo probable de opacidad corneal posterior a crosslinking probablemente se deba a la producción de moléculas de lumicano no glucosilado y, por lo tanto, carentes de moléculas de sulfato como menciona Winston W.-Y. Kao.<sup>10</sup>

## Conclusiones

Son variables los niveles de expresión del gen del lumicano entre córneas no tratadas y entre córneas tratadas; sin embargo, cuando comparamos córneas tratadas con córneas no tratadas se observa una diferencia en los niveles de expresión, siendo mayor la expresión en las córneas lesionadas.

## Referencias

1. Scott JE, Thomlinson AM. The structure of interfibrillar proteoglycan bridges ('shape modules') in extracellular matrix of fibrous connective tissues and their stability in various chemical environments. *J Anat* 1998; 192(Pt 3): 391-405.
2. Michelacci YM. Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36(8).
3. Heinegard D, Franzen A, Hedbom E, Sommarin Y. Common structures of the core proteins of interstitial proteoglycans. *Ciba Found Symp* 1986; 124: 69-88)
4. Lizzo R. The biology of the small leucine-rich proteoglycans. *J Biol Chem* 1999; 274: 18843-6.
5. Hascall VC, Heinegard DK, Wight TN. Proteoglycans. Metabolism and pathology. In: Hay ED (ed.). *Cell biology of extracellular matrix*. New York, USA: Plenum Press; 1991, p. 149-75.

6. Wight TN, Heinegard DK, Hascall VC. Proteoglycans. Structure and function. In: Hay ED, editor. Cell biology of extracellular matrix. New York, USA: Plenum Press; 1991. p. 45-78.
7. Jaques LB. Glycosaminoglycans as polyelectrolytes: rejuvenation of original concepts. *Sem Thromb Hemost* 1991; 17: 1-4.
8. Casu B. Structural features and binding properties of chondroitin sulfates, dermatan sulfate, and heparan sulfate. *Sem Thromb Hemost* 1991; 17: 9-14.
9. U.S. National Library of Medicine, National Institutes of Health. Pag. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.
10. Winston W.-Y. Kao, James L. Funderburgh, Ying Xia, Chia-Yang Liu, Gary W. Conrad. Focus on molecules:lumican. *Exp Eye Res* 2006; 82(1): 3-4.
11. Rada JA, Cornuet PK, Hassell JR. Regulation of corneal collagen fibrillogenesis in vitro by corneal proteoglycan (lumican and decorin) core proteins. *Exp Eye Res* 1993; 56: 635-48.
12. Cornuet PK, Blochberger TC, Hassell JR. Molecular polymorphism of lumican during corneal development. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, March 1994, Vol. 35 No.3.
13. Ying S, Shiraishi A, Kao CWC, Converse RL, Funderburgh JL, Swiergel J, Roth MR, Comrad GW, Kao WWY. Characterization and expression of the mouse lumican gene. *J Biol Chem* 1997; 272: 30306-13.
14. Bettelheim FA, Plessy B. The hydration of proteoglycans of bovine cornea. *Biochim Biophys Acta* 1975; 381: 203-14.
15. Chakravarti S, Magnuson T, Lass JH, Jepsen KJ, LaMantia C, Carroll H. Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican. *J Cell Biol* 1998; 141: 1277-86.
16. Chakravarti S, Petroll WM, Hassell JR, Jester JV, Lass JH, Paul J, Birk DE. Corneal opacity in lumican-null mice: defects in collagen fibril structure and packing in the posterior stroma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000; 41: 3365-73.
17. Rebouças MSA, Campos MQ, Vidal BC, Berto GA, Aguiar JAK, Michelacc YM. Proteoglycan synthesis by human corneal explants submitted to laser in situ keratomileusis (LASIK). *Mol Vis* 2007; 13: 142-50.
18. Mazzotta C. Chemical and physical background of combined Riboflavin UV-A treatment for keratoconus. *Cornea* 2002; 21: 212-9.
19. Wollensak GE, Spoerl E, et al. Riboflavin/ultraviolet-A-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol* 2003; 135(5): 620-7.
20. Wollensak G, Spoerl E, et al. Corneal endothelial cytotoxicity of riboflavin/UVA treatment in vitro. *Ophthalmic Res* 2003; 35(6): 324-8.
21. Wollensak G, Wilsch M, et al. Collagen fiber diameter in the rabbit cornea after collagen crosslinking by riboflavin/UVA. *Cornea* 2004; 23(5): 503-7.
22. Wollensak G, Aurich H, et al. Hydration behavior of porcine cornea crosslinked with riboflavin and ultraviolet A. *J Cataract Refract Surg* 2007; 33(3): 516-21.
23. Wollensak G, Spoerl E, Reber F, Seiler T. Keratocyte cytotoxicity of riboflavin/uvatreatment in vitro. *Eye* 2004; 18: 718-22).
24. Mazzotta C, Balestrazzi A, et al. Stromal haze after combined riboflavin-UVA corneal collagen cross-linking in keratoconus: in vivo confocal microscopic evaluation. *Clin Experiment Ophthalmol* 2007; 35(6): 580-2.
25. Kymionis GD, Bouzoukis DI, et al. Diffuse lamellar keratitis after corneal crosslinking in a patient with post-laser in situ keratomileusis corneal ectasia. *J Cataract Refract Surg* 2007; 33(12): 2135-7.
26. Kymionis GD, Portaliou DM, et al. Herpetic keratitis with iritis after corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet A for keratoconus. *J Cataract Refract Surg* 2007; 33(11): 1982-4.
27. Carlson EC, Lin M, Yang Liu C, Pérez VL. Keratocan and Lumican Regulate Neutrophil Infiltration and Corneal Clarity in Lipopolysaccharide-induced Keratitis by Direct Interaction with CXCL1. *JBC. Dic. 7, 2007; 282: 35502-9*.
28. Saika S, Ohnishi Y, Ooshima A, Liu CY, Kao WW. Epithelial repair: roles of extracellular matrix. *Cornea* 2002; 21(2 Suppl. 1): S23-9.
29. Carlson EC, Liu CY, Chikama T, Hayashi Y, Kao CW, Birk DE, Funderburgh JL, Jester JV, Kao WW. Keratocan, a cornea-specific keratan sulfate proteoglycan, is regulated by lumican. *J Biol Chem* 2005; 280: 25541-7.

