

# Respuesta inmune frente a antígenos de retina en pacientes con retinitis pigmentosa y síndrome de Usher

ALBERTO GÓMEZ<sup>1</sup>  
MARÍA CONSUELO ROMERO<sup>2</sup>  
MARTALUCÍA TAMAYO<sup>3</sup>

## Resumen

**Introducción.** Diferentes tipos de reacciones inmunológicas han sido implicadas en la retinitis pigmentosa como causantes de degradaciones retinianas que pueden resultar en una pérdida visual acelerada. Sin embargo, éstas no se han asociado a diferentes estados de la enfermedad y no existen reportes de respuesta inmune en el síndrome de Usher.

**Objetivos.** Analizar la respuesta inmune celular y humoral frente a antígenos de retina y péptidos retinianos, tanto en pacientes con retinitis pigmentosa como con síndrome de Usher, y en un grupo control.

**Materiales y métodos.** Se prepararon extractos de retinas humanas y bovinas, y se aislaron sus proteínas para definir su capacidad antigénica mediante pruebas ELISA y Western blot. Se analizó la blastogénesis celular (transformación morfológica de linfocitos pequeños maduros en células grandes capaces de sufrir mitosis) frente a fracciones proteicas obtenidas por transferencia a papel de nitrocelulosa del gel posterior al corrido electroforético, así como frente a dos péptidos (M y D) derivados de la secuencia del antígeno S, reportado como generador de uveítis en modelos de ratón.

**Resultados.** Se encontraron reacciones significativas frente a algunos antígenos y se determinaron diferencias en la especificidad de la respuesta de linfocitos T (inmunidad celular) en función de la patología.

**Conclusiones.** Los pacientes con retinitis pigmentosa presentan inmunidad celular activa frente a los extractos retinianos, frente a la fracción F1, la cual comprende antígenos de bajo peso molecular (<36 kDa), y también frente a los péptidos M y D. Los pacientes con síndrome de Usher y con algunos subtipos genéticos de retinitis pigmentosa presentaron una correlación entre el tipo de la enfermedad y el grado de inmunorreactividad frente a los antígenos utilizados en estos experimentos.

**Palabras clave:** retinitis pigmentosa, síndrome de Usher, autoinmunidad, linfocitos T, Colombia.

- 
- 1 PhD, Profesor Titular, Instituto de Genética Humana, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia.
  - 2 MSc, Grupo de Espondiloartropatías, Servicio de Reumatología e Inmunología, Hospital Militar Central. Docente, Universidad de la Sabana, Bogotá, Colombia.
  - 3 MD, MSc, Profesor Titular, Instituto de Genética Humana, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia.

Recibido: 28-11-2008

Revisado: 01-12-2008

Aceptado: 19/01/2009

**Title:**

Immune responses against retinal antigens in patients with retinitis pigmentosa and Usher syndrome

**Abstract**

**Introduction:** Immune reactions have been implicated in retinitis pigmentosa as the cause of retinal degradations which may result in accelerated visual loss. However, these reactions have not been associated to different subtypes of these pathologies, and they do not include studies on the Usher syndrome.

**Objective:** We tested both humoral and cellular immune responses to isolated retinal antigens and peptides in patients and controls.

**Materials and methods:** We prepared human and bovine retinal extracts, and fractioned their proteins to define their corresponding antigenicity by ELISA and Western Blot assays. We also analyzed the proliferative response to protein fractions obtained in nitrocellulose transferred proteins and to S-antigen derived peptides M and D, which were reported as uveitogenic in mice.

**Results:** Significant reactions were detected against some of the antigens in patients and not in controls, depending on the clinical subtypes.

**Key words.** retinitis pigmentosa, Usher' syndrome, autoimmunity, T lymphocytes, Colombia.

**Introducción**

La retinitis pigmentosa, término común para las retinopatías pigmentarias heredadas, caracteriza diferentes enfermedades que involucran degeneración retiniana. La retinitis pigmentosa se ha definido de varias maneras con un común denominador: se trata de un grupo de alteraciones hereditarias que afectan primariamente

las funciones de los fotorreceptores y del pigmento epitelial[1-9].

Este conjunto de enfermedades genéticas implica la degeneración progresiva de los fotorreceptores como una característica principal[10-12]. El paciente típico con retinitis pigmentosa refiere ceguera nocturna y muestra una pérdida progresiva de la visión periférica, caracterizada clínicamente por la disminución de su campo visual. La duración de la enfermedad depende de la edad de aparición y de la gravedad del tipo de retinitis pigmentosa correspondiente.

Otros hallazgos oftalmológicos característicos son la despigmentación o atrofia del epitelio pigmentario retiniano, los depósitos de pigmento en la retina (espículas de hueso) y el estrechamiento de los vasos retinianos. Las alteraciones pigmentosas suceden principalmente en la periferia y presentan un patrón perivasculare[13,14].

Para entender las degeneraciones retinianas, es necesario entender la estructura de la retina normal, cuya función primaria es la fototransducción o la detección de fotones seguida de un adecuado envío de señales al cerebro. Las primeras etapas de esta vía ocurren en las células de la capa de fotorreceptores, conos y bastones, en donde las moléculas de opsina asociadas a los cromóforos sensibles a la luz están incluidas en la membrana

plasmática de cada célula. Cuando estas opsinas absorben un fotón, se activan y activan a su vez una proteína G denominada transducina. La transducina activada hidroliza al GMP cíclico mediante la fosfodiesterasa (PDE) correspondiente. Cuando bajan los niveles de GMP cíclico no hidrolizado en el citoplasma, los canales iónicos de la membrana plasmática se cierran, lo cual conduce a un aumento de la polarización de la membrana.

Otras proteínas especializadas intervienen en la modulación e inhibición de esta cascada funcional, hasta reconvertir a las opsinas a su estado inactivo fotosensible. Aunque este proceso tiene lugar tanto en conos como en bastones, las enzimas involucradas son específicas de cada tipo celular[11,15]. El proceso degenerativo se inicia cuando un fotorreceptor deja de ser funcional debido a un defecto que puede ser bioquímico o estructural. Si la enfermedad afecta principalmente a los bastones, la pérdida visual progresa desde la periferia hacia el centro de la retina, causando al paciente una visión en túnel y ceguera nocturna.

Por el contrario, las enfermedades que afectan primariamente los conos usualmente destruyen primero la región central de la retina o mácula, en la que los conos son más abundantes[16-18]. La apoptosis también ha sido implicada en la degeneración retiniana, puesto que la desestabiliza-

ción de las membranas con proteínas mutantes y los niveles aumentados de GMP cíclico, causados por la interrupción de la cascada de fototransducción, pueden activar la muerte celular programada[10,11,17]. Las proteínas oculares, en consecuencia, pueden filtrarse al torrente sanguíneo y sensibilizar al paciente, induciendo un proceso autoinmune, el cual ha sido propuesto con base en modelos animales de la enfermedad[19-23] y en estudios *in vitro* en el modelo humano[24-33]. En el presente estudio se prepararon extractos de retina humana y se aislaron las proteínas y péptidos correspondientes, con el propósito de definir su antigenicidad mediante pruebas de ELISA e inmunoelectrotransferencia o Western blot. Además, se analizaron las reactividades blastogénicas celulares frente a fracciones proteicas obtenidas en la transferencia a nitrocelulosa de las proteínas separadas por electroforesis, así como frente a dos péptidos (M y D) derivados de la secuencia del antígeno S, el cual había sido reportado anteriormente como generador de uveítis en el modelo de ratón[20,23,34].

## Materiales y métodos

### Sujetos

Se estudiaron 21 pacientes con retinitis pigmentosa y 10 pacientes con síndrome de Usher (*Usher tipo I* – USH1: OMIM 276900; *Usher tipo II*

– USH2: OMIM 276901, 276905 y 605472; *Usher tipo III* – USH3: OMIM 276902) de la consulta del Instituto de Genética Humana de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Javeriana. El rango de edad de los pacientes de retinitis pigmentosa fue de 13 a 56 años, entre los cuales se incluyeron 10 hombres y 11 mujeres. Los pacientes con retinitis pigmentosa se clasificaron de acuerdo con el patrón de herencia de la enfermedad como: autosómica dominante (n=4), autosómica recesiva (n=9), sindrómica (n=3), esporádica (n=4) y recesiva ligada a X (n=2). Los pacientes con síndrome de Usher se clasificaron según la literatura mundial[38], en Usher tipo I (n=2), Usher tipo II (n=6) y Usher tipo III (n=2), y su rango de edad fue de 16 a 48 años. Se excluyeron los sujetos que presentaran enfermedades autoinmunes de otro tipo. También se estudiaron 20 controles sanos que no presentaban anomalías oculares en el examen oftalmológico y que no tenían historia familiar de enfermedad ocular (edades: 9 a 60 años). Todos los participantes firmaron el respectivo informe de consentimiento y el proyecto fue avalado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Javeriana, y financiado por Colciencias. En términos generales, el diagrama de los procesos experimentales se describe en la figura 3. Además, tuvimos acceso a 18 retinas de individuos humanos y 4 de bovinos que murieron por causas no

relacionadas con patología ocular. Las retinas humanas provenían de individuos donantes *post mortem* a la Corporación Banco de Ojos de Colombia (COBANCOL), a quienes, siguiendo el protocolo de donación de órganos de dicha institución, se les tomó simultáneamente muestra de sangre periférica que fue procesada e incluida como control del sistema autólogo. Los bovinos se utilizaron como fuente principal de antígenos retinianos.

## Antígenos

### *Extractos retinianos*

Las retinas humanas y bovinas se obtuvieron en condiciones de asepsia y se conservaron en PBS (*phosphate buffered saline*) con suplemento de inhibidores de proteasas de serina para preservar su capacidad antigénica (PMSF, Sigma, USA) a una temperatura de 4 a 8°C, antes de ser procesadas en nuestro laboratorio. Las retinas fueron homogeneizadas y fraccionadas por ultrasonido de acuerdo con el protocolo descrito por Brinkman y colaboradores[30]. La concentración de proteínas de los extractos retinianos se determinó por el método del ácido bicinconínico y las soluciones resultantes se separaron y congelaron a -80°C, hasta su utilización.

### *Péptidos*

Se prepararon péptidos sintéticos en un ensayo de fase sólida de síntesis

múltiple. La pureza de los péptidos fue superior al 85% de acuerdo con su análisis en HPLC (*high performance liquid chromatography*) (cromatografía líquida de alta eficiencia). El péptido M, descrito por Yamaki *et al.*[34] como derivado del antígeno S bovino (aa 303-320), presenta la siguiente secuencia: DTNLSASTIIKEGIDKTV. El péptido D (aa 352-362), descrito por Gregerson *et al.*[19], presenta la siguiente secuencia: TEVPFRLMHPQPED. El tercer péptido utilizado como control de especificidad en la respuesta inmune *in vitro*, fue derivado de la secuencia de un receptor de estrógenos, el cual presentaba la siguiente secuencia: KSIQGHNDYMC PATNQCTIDK NRRKSCQACRLRKCYEVGM. Cada péptido fue disuelto en PBS y esterilizado por filtración.

### ***Ensayo inmunoabsorbente enzimático (ELISA)***

Los extractos proteicos se diluyeron en solución tampón de carbonato-bicarbonato para recubrir microplacas estériles (Linbro, USA) a una concentración de 1 µg/pozo, en incubación de una noche a temperatura ambiente. Después de 3 lavados con PBS, las placas fueron utilizadas inmediatamente para las pruebas ELISA o congeladas a -20°C para su posterior utilización. Los sueros de pacientes y controles se añadieron a cada micropozo, y las placas se incubaron por 1 hora a 37°C. Después de 3 a 5 lavados con PBS-Tween (0,05%), se

añadió el conjugado correspondiente (anti-IgG humana marcado con peroxidasa) y las microplacas se incubaron una vez más por 1 hora a 37°C. Después de lavados repetidos, se añadió el sustrato para la enzima OPD (*O-phenylenediamine dihydrochloride*) y 30 minutos después se agregó una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1N) para detener la reacción. La reacción para conocer la concentración de anticuerpos contra los antígenos de retina en cada pozo de las microplacas, se leyó y cuantificó (intensidad de la luz) en un fotómetro Dynatech 600, con una longitud de onda de 492 nm.

### ***Electroforesis SDS-PAGE***

Las proteínas presentes en los extractos proteicos se separaron según su peso molecular en geles de poliacrilamida SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Los extractos humanos y bovinos se procesaron de manera independiente e individual en la electroforesis (150 voltios/50 mAmp), incluyendo marcadores de peso molecular en cada gel. Las bandas proteicas separadas se pusieron en evidencia por coloración con azul de Coomassie.

### ***Inmuno-electrotransferencia (Western blot)***

Las bandas de proteínas obtenidas en la electroforesis se transfirieron a papel de nitrocelulosa en un sándwich catiónico-aniónico durante 1 hora (260

voltios/20 mAmp). El papel transferido se recortó verticalmente en uno de sus extremos y la tira separada se coloreó con azul de Coomassie para verificar la transferencia.

### ***Elución de proteínas (extracción de proteínas a partir de membranas)***

La membrana de nitrocelulosa restante se recortó horizontalmente en 5 secciones correspondientes a los siguientes rangos de peso molecular: F1<36 kDa, F2=36-66 kDa, F3=67-116 kDa, F4=117-200 kDa, F5>200 kDa. Las áreas resultantes tenían 5 mm de ancho y 2 mm de largo, de acuerdo con las recomendaciones de Lamb *et al.*[36]. Cada sección de nitrocelulosa se disolvió y esterilizó en dimetil sulfóxido (DMSO) con agitación constante y las partículas resultantes se precipitaron en una solución tampón de carbonato-bicarbonato (0,05 mM, pH=9,6). La suspensión se diluyó en medio de cultivo estéril RPMI 1640 (Sigma, USA), el cual contiene, entre otros componentes, rojo de fenol y L-glutamina libre de bicarbonato de sodio. La concentración de proteínas se ajustó a 0,01 µg/µl para utilizarse como estímulo antigénico en los análisis de proliferación celular, siguiendo el protocolo descrito por Abou-Zeid *et al.*[35] y por Lamb *et al.*[36].

### ***Ensayos de proliferación de linfocitos***

Se obtuvieron células mononucleares a partir de sangre periférica anti-

coagulada por EDTA en gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque, y se resuspendieron en medio RPMI 1640 con suplemento de 10% de suero fetal bovino en una concentración de 10<sup>6</sup> células/ml.

Los ensayos de proliferación se llevaron a cabo en microplacas estériles de 96 pozos de fondo plano, utilizando los siguientes estímulos antigénicos por separado: 3 µg/100 µl de péptidos sintéticos; 5 µg/100 µl de extractos de retinas humanas o bovinas; 2 µg/100 µl de fracciones disueltas (F1-F5); 1,5 µg/100 µl de concanavalina A (ConA) y 1 µg/100 µl de fitohemaglutinina (PHA). Las microplacas se incubaron por 6 días en 5% CO<sub>2</sub> y 90% de humedad.

Los antígenos se añadieron en el día 0 y los mitógenos, en el día 3 de los cultivos correspondientes. En el día 5 del cultivo, se añadió 1 µCi de timidina tritiada a cada pozo y 18 horas después las células de cada pozo son recolectadas en círculos independientes de papel de fibra de vidrio. Los círculos se secaron a temperatura ambiente y luego se transfirieron a tubos plásticos y su radioactividad se evaluó en un contador de energía beta (Beckman, USA).

Los resultados se expresaron como conteos por minuto (CPM). Se consideraron positivos los índices de estimulación mayores o iguales a 2,0, dato

umbral obtenido por el método de gráfico de control con límite de confianza inferior y superior y el punto de corte de máxima verosimilitud. Esto se hizo con base en el índice de proliferación de cada uno de los experimentos realizados con los grupos de controles sanos, de pacientes con retinitis pigmentosa, de pacientes con síndrome de Usher y de control positivo con el mitógeno concanavalina A (ConA).

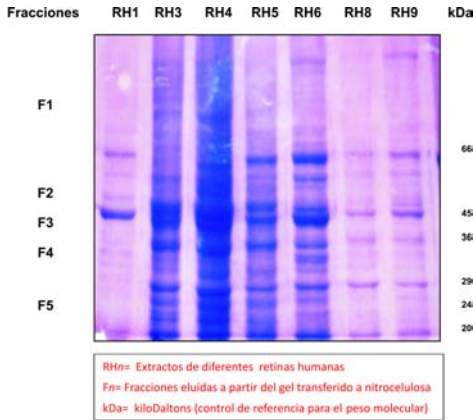
### *Análisis estadísticos*

Se corrió una prueba preliminar univariada de frecuencias simples, para cada grupo de estudio. Luego, se utilizó un análisis bivariado para comparar la edad (varianza simple) y el sexo (valor alfa de  $\chi^2$  al cuadrado = 0,05). El punto de corte para determinar el índice de estimulación se definió por el método de gráfico de control con límite de confianza inferior y superior, y el punto de corte de máxima verosimilitud, estableciéndose en 2,0. Las diferencias obtenidas en los índices de estimulación de cada grupo estudiado se evaluaron por la prueba de Kruskal-Wallis. Un análisis final pareado múltiple indicó diferencias estadísticas con un valor alfa de 0,016 (0,05 en 3 grupos). La base de datos se elaboró en el programa *Lotus Works* y el análisis de esta información se hizo en el programa *Stata* versión 7.0.

## **Resultados**

Para la población incluida en este estudio, el análisis bivariado no mostró diferencias estadísticamente significativas en edad ( $p=0,41$ ) entre los tres grupos, ni según sexo ( $p=0,58$ ). Dieciocho retinas humanas pertenecientes a nueve individuos (edad media de 30,4 años), y 4 retinas bovinas de 2 machos adultos, se prepararon para utilizarlas como estímulo antigénico en pacientes y controles. Las retinas humanas y bovinas fueron convertidas a soluciones de 4 a -16 mg/ml y 30-40 mg/ml, respectivamente, y luego, reunidas en una solución conjunta (*pool*) humana o bovina de 0,5 a 1 mg/ml. Antes de hacer las soluciones conjuntas, tanto en humanos como en bovinos, se analizaron cada uno de los extractos sonicados de manera independiente en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Algunas de las preparaciones individuales se presentan en la figura 1.

La especificidad de los anticuerpos presentes en los sueros de pacientes y controles se analizó con pruebas ELISA. A pesar de encontrarse claras reactividades tanto en los ELISA como en las inmunoelectrotransferencias, no se encontraron diferencias cualitativas o cuantitativas sistemáticas entre pacientes y controles en las reacciones frente a extractos totales. Al analizar las especificidades de los anticuerpos



**Figura 1.** Corrido electroforético (SDS-PAGE) de extractos de retinas humanas.

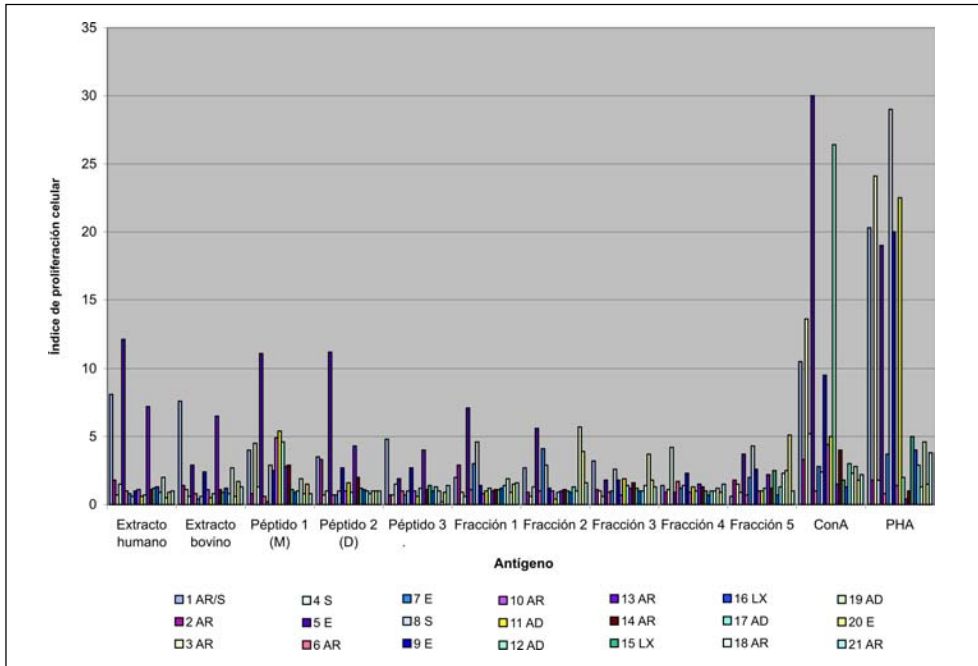
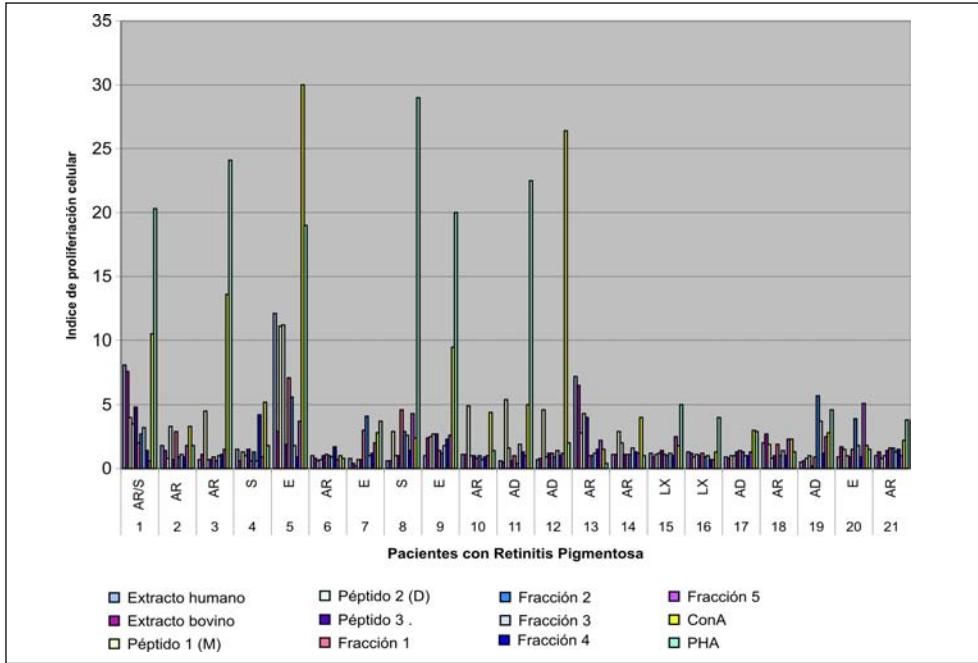
en pruebas de inmunoelectrotransferencia, no se encontraron patrones diferenciales que pudieran asociarse a la enfermedad ocular.

Analizamos luego la especificidad de la respuesta inmune celular (linfocito T) utilizando extractos totales y sus fracciones disueltas, tanto como los péptidos sintéticos derivados de la secuencia del antígeno S, un reconocido inmunógeno en sistemas experimentales de enfermedades oculares tales como la uveítis autoinmune. Las tablas 1, 2 y 3, y las figuras 2a, 2b y 2c, muestran los índices de estimulación en los tres grupos experimentales incluidos en nuestro trabajo: retinitis pigmentosa (21 pacientes), síndrome de Usher (10 pacientes) y controles sanos (20 individuos). Los resultados obtenidos del análisis de las diferentes variables en los diferentes grupos de estudio frente a cada antígeno o

**Tabla 1**

Índices de proliferación de linfocitos de pacientes con retinitis pigmentosa. Los pacientes fueron clasificados en dos categorías: 1- respondedores (negro) y 2- no respondedores (blanco)

Paciente	Subtipo RP	Extracto humano	Extracto bovino	Péptido 1 (M)	Péptido 2 (D)	Péptido 3 .	Fracción 1	Fracción 2	Fracción 3	Fracción 4	Fracción 5	ConA	PHA
1	AR/S	8,1	7,6	4	3,5	4,8	2	2,7	3,2	1,4	0,6	10,5	20,3
2	AR	1,8	1,4	0,8	3,3	0,7	2,9	0,9	1,1	0,9	1,8	3,3	1,8
3	AR	0,7	1,1	4,5	0,7	0,7	0,9	0,6	1	1,1	1,5	13,6	24,1
4	S	1,5	0,6	1,3	1	1,5	0,6	1,3	0,6	4,2	0,9	5,2	1,8
5	E	12,1	2,9	11,1	11,2	1,9	7,1	5,6	1,8	0,9	3,7	30	19
6	AR	1	0,8	0,6	0,7	1	1,1	1	0,9	1,7	0,7	1	0,8
7	E	0,8	0,4	0,2	0,7	0,7	3	4,1	1	1,2	2	2,8	3,7
8	S	0,6	0,6	2,9	1	1	4,6	2,9	2,6	1,4	4,3	2,4	29
9	E	1	2,4	2,5	2,7	2,7	1,4	1,2	1,8	2,3	2,6	9,5	20
10	AR	1,1	1,1	4,9	1	1	0,8	1	0,7	0,9	1	4,4	1,4
11	AD	0,6	0,5	5,4	1,6	0,6	1	0,4	1,9	1,3	1	5	22,5
12	AD	0,7	0,8	4,6	0,9	1,2	1,2	0,9	1,4	1	1,2	26,4	2
13	AR	7,2	6,5	2,8	4,3	4	1	1	1,2	1,5	2,2	1,5	0,4
14	AR	1,1	1,1	2,9	2	1,1	1,1	1,1	1,6	1,3	1,2	4	1
15	LX	1,2	0,9	1,1	1,2	1,4	1,1	1	1,2	1	2,5	1,8	5
16	LX	1,3	1,2	0,9	1,1	1	1,2	0,9	1	0,7	0,7	1,3	4
17	AD	0,9	0,8	1	1	1,3	1,4	1,3	1	1	1,3	3	2,9
18	AR	2	2,7	1,9	0,8	1	1,9	1	1,4	1	2,3	2,3	1,3
19	AD	0,5	0,6	0,8	1	0,2	0,9	5,7	3,7	1,2	2,5	2,8	4,6
20	E	0,9	1,7	1,5	1	0,9	1,5	3,9	1,8	0,9	5,1	1,8	1,5
21	AR	1	1,3	0,8	1	1,4	1,6	1,6	1,3	1,5	1	2,2	3,8
	Promedios	2,2	1,8	2,7	2,0	1,4	1,8	1,9	1,5	1,4	1,9	6,4	8,1

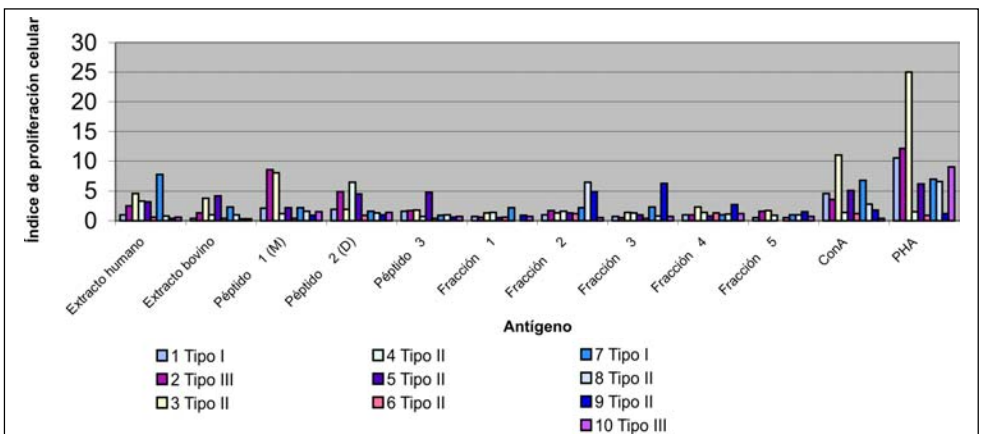
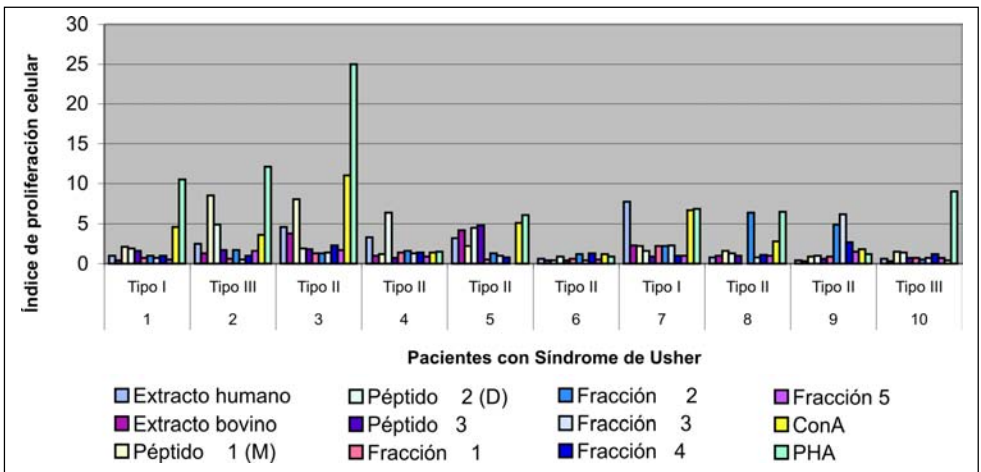


**Figura 2a.** Reactividad inmune celular frente a antígenos retinianos y mitógenos en pacientes con retinitis pigmentosa, expresada en índices de estimulación. ConA: concanavalina; PHA: fitohemaglutinina.

**Tabla 2**

Índices de proliferación linfocitaria en pacientes con síndrome de Usher. Los pacientes fueron clasificados en dos categorías: 1- respondedores (negro) y 2- no respondedores (blanco). ConA: concanavalina; PHA: fitohemaglutinina.

Paciente	Tipo Usher	Extracto humano	Extracto bovino	Péptido 1 (M)	Péptido 2 (D)	Péptido 3	Fracción 1	Fracción 2	Fracción 3	Fracción 4	Fracción 5	ConA	PHA
1	Tipo I	1	0,4	2,1		1,6	0,7	1	0,7	1	0,5	4,6	10,5
2	Tipo III	2,5	1,3	8,5	4,9	1,7	0,6	1,7	0,5	1	1,6	3,6	12,1
3	Tipo II	4,6		8	1,9	1,8	1,3	1,3	1,4	2,3	1,7	11	25
4	Tipo II	3,3	1	1,2	6,4	0,7	1,4	1,6	1,3	1,4	0,9	1,4	1,5
5	Tipo II	3,2			4,5	4,8	0,5	1,3	1	0,8	0	5,1	6,1
6	Tipo II	0,6	0,4	0,4	0,9	0,4	0,6	1,2	0,4	1,3	0,5	1,2	0,9
7	Tipo I	7,7		2,2	1,6	0,9	2,2	2,2	2,3	1	1	6,7	6,9
8	Tipo II	0,8	1	1,6	1,3	1	ND	6,4	0,8	1,1	1	2,8	6,5
9	Tipo II	0,4	0,3	0,9	1	0,6	0,9	4,9	6,2		1,5	1,8	1,2
10	Tipo III	0,6	0,3	1,5	1,4	0,7	0,7	0,5	0,7	1,2	0,7	0,4	9
Promedios		2,5	1,5	2,9	2,6	1,4	1,0	2,2	1,5	1,4	0,9	3,9	8,0

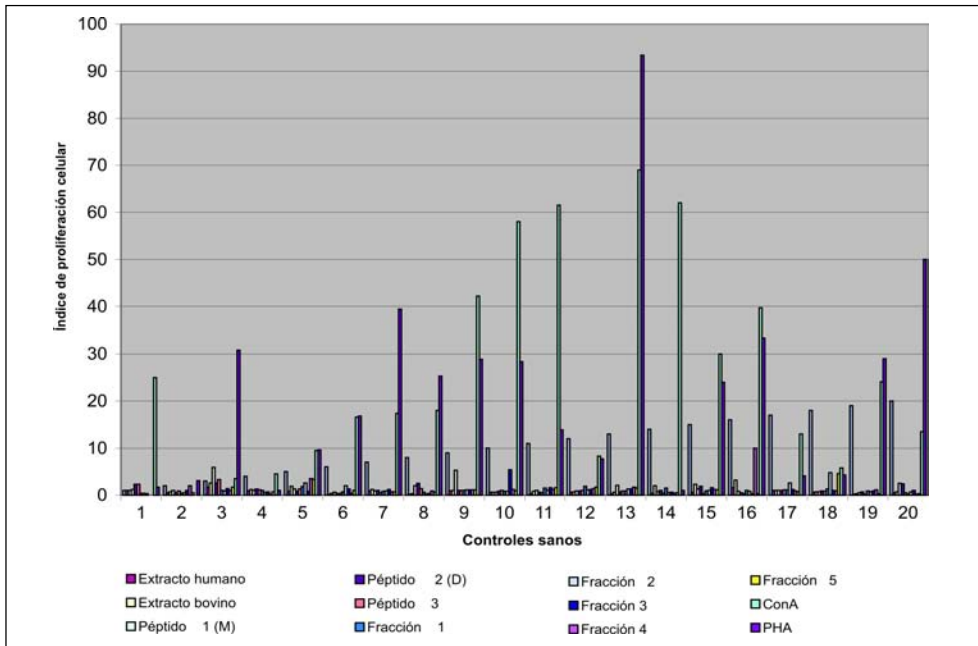


**Figura 2b.** Reactividad inmune celular frente a antígenos retinianos y mitógenos en pacientes con síndrome de Usher, expresada en índices de estimulación. ConA: concanavalina; PHA: fitohemaglutinina.

**Tabla 3**

Índices de proliferación linfocitaria en controles sanos. Los controles fueron clasificados en dos categorías: 1- respondedores (negro) y 2- no respondedores (blanco).  
ConA: concanavalina); PHA: fitohemaglutinina.

Control	Extracto humano	Extracto bovino	Péptido 1 (M)	Péptido 2 (D)	Péptido 3	Fracción 1	Fracción 2	Fracción 3	Fracción 4	Fracción 5	ConA	PHA
1	1	1	1,2	2,3	2,3	0,4	0,4	0,3	0	0	25	1,7
2	0,5	0,7	1	0,5	0,9	0,4	0,5	1	2	0,5	ND	3,1
3	1,7	2,6	5,9	2,6	3,3	1	0,9	1,4	1	1,7	3,5	30,8
4	0,9	1,2	1	1,3	1,1	1	0,5	0,7	0,2	0,7	4,5	1
5	0,8	1,9	1,3	0,8	1,3	1,8	2,6	0,8	3,5	3,3	9,5	9,6
6	0,2	0,4	0,6	0,3	0,4	0,7	2	1,3	0,4	1	16,6	16,8
7	0,9	1,2	0,9	1	0,5	0,8	0,9	1,2	0,7	0,7	17,4	39,4
8	0,2	0,3	2	2,5	1,4	0,6	0,2	0,4	0,9	0,6	18	25,3
9	0,9	1	5,3	1	1	1	1,1	1,1	1,1	1,1	42,2	28,9
10	0,6	0,6	0,6	0,8	1	0,8	0,8	5,4	1,2	0,9	58	28,4
11	0,3	0,8	1	0,6	0,5	1,5	1	1,6	1,2	1,6	61,5	13,9
12	0,6	0,7	0,9	0,9	1	1,9	1,1	1,2	1,4	1,7	8,3	7,7
13	0,3	0,6	2,1	0,7	0,9	0,9	1,3	1,3	1,7	1,5	69	93,4
14	0,4	2	0,7	1	0,4	1,5	0,5	0,6	0,4	0,5	62	1
15	0,6	2,3	1,3	1,9	0,3	0,9	1	1,6	1,2	1,1	30	24
16	1,6	3,2	0,8	0,5	0,3	1	0,8	0,3	10	0,3	39,7	33,4
17	1	1	1	1	1,1	1,1	2,6	1,2	0,9	0,7	13	4,1
18	0,6	0,7	0,7	0,9	0,8	1,3	4,8	1	0,9	4,6	5,8	4,3
19	0,2	0,3	0,5	0,7	0,2	0,9	0,7	0,9	1,1	0,3	24,1	29
20	0,5	0,7	2,5	2,4	0,5	0,2	0,7	1	0,2	0,3	13,5	50
Promedios	0,7	1,2	1,6	1,2	1,0	1,0	1,2	1,2	1,5	1,2	27,5	22,3



**Figura 2c.** Reactividad inmune celular frente a antígenos retinianos y mitógenos en controles sanos, expresada en índices de estimulación. ConA: concanavalina); PHA: fitohemaglutinina.

inmunógeno, muestran una reactividad preferencial de los linfocitos a los extractos totales, frente a las fracciones F1 y F5, y frente al péptido D. También encontramos una clara deficiencia en la respuesta a mitógenos en ambos grupos de pacientes (retinitis pigmentosa y síndrome de Usher), al compararlos con los controles sanos ( $p=0,05$  y  $p=0,12$ , respectivamente) (tabla 4).

Para evaluar la reproducibilidad de los triplicados de cada una de las variables, se aplicó un análisis de varianza ANOVA con un nivel de significancia de alfa de 0,05, utilizando la prueba exacta de Fisher por el pequeño tamaño de los datos analizados y, en caso de no encontrar homocedasticidad, se reemplazó el ANOVA por la prueba de

Kruskal-Wallis, obteniéndose una  $p>0,05$ , lo cual validó nuestros análisis triplicados de cada sistema de respuesta antigénica *in vitro* (tabla 5). Las respuestas significativas frente a diferentes estímulos se compararon en ambos grupos de pacientes frente a los controles sanos, y se encontraron claras diferencias en la especificidad de la respuesta inmune. La tabla 4 muestra una síntesis de las reactividades celulares frente al extracto total de retina en los 3 grupos experimentales, y la tabla 6 muestra los resultados de la comparación de las medianas de la respuesta diferencial de proliferación en los tres grupos experimentales frente a cada fracción disuelta a partir de la separación electroforética del extracto total, lo cual confirma la asociación de la inmunogenicidad de los pépti-

**Tabla 4**

Reacción media de cada grupo experimental frente a cada tipo de estímulo antigénico. El promedio de los índices de estimulación de las respuestas frente a los antígenos más inmunogénicos, se incluye entre paréntesis

<b>Antígeno</b>	<b>RP</b>	<b>(ie)</b>	<b>SU</b>	<b>(ie)</b>	<b>Control</b>	<b>(ie)</b>
Extracto humano	2.919	(2,2)	4.056	(2,5)	506	(0,7)
Extracto bovino	2.777		2.104		806	
Péptido 1 (M)	3.430	(2,7)	4.256	(2,9)	927	(1,6)
Péptido 2 (D)	2.858	(2,0)	3.926	(2,6)	884	(1,2)
Péptido 3	2.158		2.152		702	
Fracción 1	2.033	(1,8)	3.206	(1,0)	641	(1,0)
Fracción 2	2.423		2.643		710	
Fracción 3	1.753		1.944		849	
Fracción 4	1.853		1.856		1154	
Fracción 5	2.794	(1,9)	1.219	(0,9)	665	(1,2)
ConA	8.258	(6,4)	15.29	(3,9)	14.01	(26,1)
PHA	10.71	(8,1)	19.73	(8,0)	18.93	(22,3)

**Tabla 5**

Análisis de validez de los triplicados frente a cada estimulación antigénica en uno de los individuos incluidos en la investigación

KW: Kruskal-Wallis; F: prueba exacta de Fisher.

Estímulo	Test	gP
Medio de cultivo (a)	KW= 0,46	0,8
Extracto humano	KW= 1,15	0,56
Extracto bovino	F= 0,33	0,72
Péptido 1 (M)	F= 0,12	0,89
Péptido 2 (D)	F= 0,39	0,67
Péptido 3	KW= 0,4	0,82
Medio de cultivo (b)	F= 0,27	0,77
Fracción 1	KW= 0,33	0,85
Fracción 2	KW= 0,04	0,98
Fracción 3	F= 0,16	0,85
Fracción 4	KW= 0,09	0,96
Fracción 5	KW= 0,35	0,84
ConA	F= 0,29	0,75
PHA	KW= 0,14	0,93

dos y de las fracciones disueltas con los diferentes tipos de cada enfermedad analizada.

Se analizaron, además, controles de reacción autoinmune, utilizando sangre de donantes cadavéricos en fase temprana *post mortem*, con el fin de excluir la posibilidad de una reacción fisiológica de base en cualquier tipo de individuo contra antígenos retinianos en un sistema autólogo, y también, con el fin de excluir la posibilidad de una reacción heteróloga contra componentes del medio de cultivo. Ninguno de los sistemas de reacción autóloga o heteróloga mostró niveles significativos de respuesta de proliferación. Los ín-

lices de estimulación en los diferentes subtipos clínicos de la retinitis pigmentosa difieren y parecen ser mayores en los tipos síndrome, esporádico y recesivo, que en los tipos ligados a X y autosómico dominante (tabla 7a). Los índices de estimulación en los diferentes tipos de síndrome de Usher no pudieron asociarse a sus diferentes subtipos clínicos (tabla 7b).

## Discusión

La heterogeneidad clínica en las enfermedades retinianas no ha sido bien sustentada, hasta el momento, en mecanismos moleculares definitivos. Sin embargo, ésta implica que tanto el am-

**Tabla 6**  
Significancia de las reactividades celulares frente a algunos de los antígenos estimulantes en los diferentes grupos experimentales

<b>Antígeno</b>	<b>RP vs. Control</b>	<b>SU vs. Control</b>	<b>RP vs. SU</b>
Extracto humano	<b>P= 0,0025</b>	<b>P= 0,015</b>	P> 0,016
Péptido 1 (M)	P> 0,016	P> 0,016	P> 0,016
Péptido 2 (D)	P> 0,016	<b>P= 0,011</b>	P> 0,016
Fracción 1	<b>P= 0,0041</b>	P> 0,016	P> 0,016
Fracción 5	<b>P= 0,012</b>	P> 0,016	P> 0,016
ConA	<b>P= 0,0004</b>	<b>P= 0,008</b>	P> 0,016
PHA	<b>P= 0,005</b>	P> 0,016	P> 0,016

**Tabla 7a**  
Índices de estimulación en diferentes subtipos clínicos de retinitis pigmentosa.  
ConA: concanavalina; PHA: fitohemaglutinina; AR: autosómica recesiva;  
S: síndrome; E: esporádica; LX: ligada al sexo)

<b>Subtipo RP</b>	<b>Extracto humano</b>	<b>Péptido 2</b>	<b>Fracción 1</b>	<b>ConA</b>	<b>PHA</b>
Síndrome	1/2	1/2	2/2	2/2	1/2
Esporádica	1/4	2/4	2/4	3/4	2/4
Autosómica dominante	/4	0/4	0/4	4/4	4/4
Ligada a X	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2
Autosómica recesiva	/9	4/9	3/9	6/9	3/9

**Tabla 7b**  
Índices de estimulación en diferentes subtipos clínicos de síndrome de Usher.

<b>Síndrome de Usher</b>	<b>Extracto humano</b>	<b>Péptido 2</b>	<b>Fracción 1</b>	<b>ConA</b>	<b>PHA</b>
Tipo I	1/2	1/2	1/2	2/2	2/2
Tipo II	3/6	3/6	0/5	3/6	3/6
Tipo III	1/2	1/2	0/2	1/2	2/2

biente como un probable trasfondo genético pueden jugar un papel decisivo en su expresión fenotípica. Una de las razones para la complejidad de estas asociaciones es la amplitud implícita en la definición de las “degeneraciones retinianas”. Este término incluye enfermedades periféricas de la retina, como la retinitis pigmentosa y la ceguera nocturna, enfermedades de la retina central, como la degeneración macular, y varias otras en las que el patrón degenerativo es muy variable.

La retinitis pigmentosa, por su parte, es también genéticamente heterogénea e incluye patrones de herencia autosómico dominante (20% a 25%), generalmente asociada con mutaciones en los genes de rodopsina o periferina, autosómico recesivo (20%) y recesivo ligado a X (5% a 10%), o bien puede encontrarse aislada en pacientes sin familiares afectados (45% a 50%)[5]. En la población general, la retinitis pigmentosa presenta una frecuencia combinada de 1 en 5.000 en la población mundial[5]. La retinitis pigmentosa puede presentar alteraciones específicas o no hacerlo, lo que permite hablar de dos grandes grupos: la retinitis pigmentosa como hallazgo único o sindrómico (aislada, esporádica) o la asociada a otras manifestaciones conformando algún síndrome como, por ejemplo, el síndrome de Usher, caracterizado por sordera bilateral congénita no progresiva[37,38]. La clasificación genética es dispendiosa y difícil, debido a la

existencia de numerosos casos aislados, a su “penetrancia” reducida y a una considerable variabilidad en la expresividad de la enfermedad, y al hecho de que se han reportado ya más de 100 genes que pueden estar asociados a la enfermedad[5].

En la población colombiana, de la cual provienen los casos incluidos en el presente estudio (21 pacientes con retinitis pigmentosa y 10 pacientes con síndrome de Usher), se han reportado las siguientes frecuencias de acuerdo con su patrón de herencia: autosómica dominante (19%), autosómica recesiva (43%), recesiva ligada a X (9,5%) y, también, grupos de herencia de tipo esporádico (19%) y tipo síndrome (9,5%)[38,39]. La heterogeneidad clínica fue también evidente en la respuesta inmune cuando se evaluaron los pacientes con retinitis pigmentosa y síndrome de Usher. Aunque no se encontró un patrón único de reactividad de anticuerpos en estos pacientes, fue evidente que los sueros de cada uno de ellos reaccionaban contra antígenos diferentes en los experimentos de inmunoelectrotransferencia. Los antígenos seleccionados en anteriores estudios para definir la participación del sistema inmune en la patología, son analizados en función de su inmunogenicidad serológica, pero es claro que las proteínas que son inmunodominantes para células B no necesariamente presentan el mismo comportamiento para células T.

La activación y el número elevado de linfocitos T, un incremento en la expresión del receptor de la IL-2 y un potencial papel de los linfocitos T CD8 en reacciones de autoinmunidad a retina, sugieren mecanismos inmunes celulares que pueden contribuir a la patogénesis de alteraciones degenerativas de retina[4,42]. Es así como buscamos evaluar en este estudio el estado inmunológico celular de cada paciente, y logramos determinar reacciones proliferativas asociadas a ambos tipos de la enfermedad y a sus respectivos subtipos, tal y como se ha demostrado en modelos animales equivalentes[40]. Las reactividades más fuertes y específicas *in vitro* se dirigían contra el extracto retiniano humano y se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con retinitis pigmentosa o con síndrome de Usher y el grupo control, en el cual ningún individuo respondió *in vitro* a este estímulo antigénico, mientras que la mayoría de los controles respondieron de manera clara al estímulo con mitógenos.

Otros investigadores han encontrado resultados similares en humanos[25,28]. En éstos se había reportado una respuesta celular específica aumentada en la retinitis pigmentosa al compararla con otro tipo de entidades oculares y con controles normales, concluyendo que el sistema inmune puede contribuir a estos procesos degenerativos y, posiblemente, participar en

mecanismos de autoinmunidad, ya sea como iniciadores o como potenciadores de la patología, a partir de una posible ruptura del equilibrio anatómico en donde normalmente son liberados los antígenos secuestrados[24,25].

Los péptidos 1 y 2 también indujeron una respuesta mayor de proliferación en los pacientes que en los controles. Estas secuencias corresponden a los sitios inmunodominantes del antígeno S bovino, proteína retiniana involucrada en procesos visuales con una homología a la humana del 80%. Dentro de esta proteína se han descrito tres sitios inmunopatogénicos denominados péptidos M, N y K, los cuales han demostrado la inducción de uveítis alérgica experimental en ratas Lewis, cobayos y micos.

Una de las secuencias utilizadas en nuestro estudio correspondió al sitio denominado M, el cual presenta una secuencia idéntica en los antígenos S tanto de humano como de bovino[19]. La evaluación de la respuesta frente a fracciones proteicas demostró una mayor respuesta a la fracción F1, que contiene proteínas en un rango de 0 a 36 kDa. Este hallazgo parece contradecir los informes clásicos en los que se reporta al antígeno-S de 45 kDa como el principal inmunógeno, pero corresponden bien a la propuesta de Gery y Streinlein[9], quienes reportaron un antígeno inmunodominante de 23 kDa en casos de uveítis.

El hecho de encontrar en nuestro estudio reactividades específicas mayores frente a algunas fracciones que frente al extracto global, se puede explicar por la exposición de epítomos que pueden encontrarse enmascarados en las preparaciones iniciales y que se revelan en las preparaciones derivadas. También en el caso de los péptidos se considera que en la proteína de origen pueden existir efectos alostéricos que impidan el reconocimiento de éstos en su estado natural. En este último caso, la degradación *in vivo* de la proteína por parte de células del tejido correspondiente, sería la fuente del péptido inmunogénico. Otro hallazgo de interés en nuestro modelo es la presentación de una clara respuesta inmune frente a estímulos mitogénicos, tales como la ConA y la PHA en los controles, pero ésta es comparativamente deficiente en pacientes con retinitis pigmentosa y síndrome de Usher. En efecto, solamente 20% a 40% de los pacientes mostraban una respuesta importante ( $IE > 7,0$ ) frente a estos estímulos policlonales, con una media de 1,9 y 6,4 ó 3,9 y 8, respectivamente, mientras que 70% a 80% de los controles mostraron gran proliferación frente a los mismos estímulos, con medias de 27,5 y 22,3 para la ConA y la PHA, respectivamente. En consecuencia, las respuestas específicas de las células mononucleares de los pacientes resultan muy significativas y debe considerarse el compromiso global de la respuesta inmune a mitóge-

nos en estas enfermedades, tal como se ha reportado en trabajos previos, como una característica de la retinitis pigmentosa[28]. Uno de los principales aportes de la presente investigación fue el reporte de la asociación entre respuesta inmune celular disminuida en dos de los subtipos clínicos de la retinitis pigmentosa, la forma autonómica dominante y la ligada a X. Este hecho tiene, al menos, un antecedente en el reporte de Chant y colaboradores, por cuanto en éste ningún paciente con la forma dominante respondió *in vitro* al extracto retiniano, y sólo 1 de 6 con la forma ligada a X presentó una actividad blastogénica débilmente positiva[25]. Una respuesta inmune positiva contra la retina en los otros subtipos podría explicar la gravedad de la degeneración retiniana en estos pacientes y, en contraste, una reacción inmune negativa podría ser el fundamento de la característica progresión lenta en los subtipos ligados a X.

El estado inmunológico de los pacientes con retinitis pigmentosa o síndrome de Usher podría, en consecuencia, ser evaluado en experimentos complementarios en otras poblaciones para definir su utilidad en la clasificación clínica de este tipo de enfermedades y, eventualmente, para introducir nuevas aproximaciones terapéuticas, como la utilización de agentes inmunosupresores cuyos beneficios se han demostrado ya en el modelo de ratón[41,42], que podrían controlar el

desbordamiento inmunitario y su correspondiente efecto deletéreo en la cámara ocular.

## Conclusiones

Se encontraron reacciones significativas frente a antígenos retinianos, incluyendo péptidos y fracciones derivadas de éstos, y se determinaron diferencias en la especificidad de la respuesta celular en función del tipo de la enfermedad clínica de cada paciente. Nuestros hallazgos indican que los pacientes con retinitis pigmentosa, según su clasificación genética, presentan inmunidad activa frente a los extractos retinianos totales o no lo hacen, así como frente a la fracción diluida F1, la cual comprende antígenos de bajo peso molecular (<36 kDa), y también, frente a los péptidos M y D. Los pacientes con algunos subtipos genéticos de retinitis pigmentosa presentaron una correlación entre el tipo de la enfermedad y el grado de inmunorreactividad frente a los antígenos utilizados en estos experimentos.

## Agradecimientos

Los autores agradecen especialmente a los pacientes que participaron en el estudio, así como a los miembros de Cobancol y del Instituto de Genética Humana que colaboraron amablemente en el proyecto. También expresan su gratitud a sus instituciones de origen: la Pontificia Universidad Javeriana y el Hospital Militar Central.

## Conflicto de intereses

Los autores manifiestan expresamente que durante la realización del presente trabajo no existió conflicto de interés alguno que pudiera afectar los resultados obtenidos.

## Financiación

El presente proyecto fue financiado por Colciencias No. 1203-05-003-92.

## Bibliografía

1. Newsome DA, Fishman GA. *Research update: Report on retinitis pigmentosa and the immune system*. Exp Eye Res. 1986;43:1-5.
2. Newsome DA, Nussenblat RB. Retinal S-antigen reactivity in patients with retinitis pigmentosa and Usher's syndrome. *Retina*. 1984;4:195-9.
3. Newsome DA, Quinn TC, Hess AD, Pitharowe PM. *Cellular immune status in retinitis pigmentosa*. Ophtalmol. 1988;95:1696-703.
4. Williams LL, Lew HM, Shannon BT, Singly CT, Chambers RB, Davidorf FH. *Activated retinitis pigmentosa peripheral lymphocytes adhere to and alter cultured human retinal pigment epithelial cells*. Invest Ophtalmol Vis Sci. 1992;33:2848-60.
5. Telander DG. *Retinitis pigmentosa*. Fecha de consulta: 14 de noviembre de 2008. Disponible en: <http://www.emedicine.com/oph/topic704.htm>.
6. Yamamoto JH, Okajima O, Mochizuki M, Shinohara T, Wiggert B, Chader GJ, et al. *Cellular immune responses to reti-*

- nal antigens in retinitis pigmentosa.* Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol. 1992;230:119-23.
7. Hendricks RL, Fishman GA. *Cellular immune function of patients with retinitis pigmentosa.* Invest Ophthalmol Vis Sci. 1986;27:356-63.
  8. Williams L, Wolinsky JS, Cao SN, Shannon BT, Leguire LE. *Antibody response to rubella virus antigens and structural proteins in retinitis pigmentosa.* J Infect Dis. 1992;166:525-30.
  9. Geri I, Streinlein JW. *Autoimmunity in the eye and its regulations.* Curr Op Imm. 1994;6:938-45.
  10. Connor JM, Fergusson-Smith MA. *Essential medical genetics.* 4<sup>th</sup> edition. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1993.
  11. Heckenlively JR. *Retinitis pigmentosa.* Philadelphia: J.B. Lippincott Company; 1988.
  12. Hammerstein W. *Distrofias retinianas.* Atlas diagnóstico diferencial. Madrid, España: Editorial Marnan; 1993.
  13. Haim M. *Retinitis pigmentosa: problems associated with genetic classification.* Clin Gen. 1993;44:62-70.
  14. Jacobiec FA, Lamkin JC. *Advances in ophthalmic genetics and heritable eye disease.* Intern Ophthalmol Clin. 1993;23:2.
  15. MacDonald IM, Sasi R. *Molecular genetics of inherited eye disorders.* Clin Invest Med. 1994;17:474-98.
  16. Rosenfeld PJ, McKusick VA, Amberger JS, Dryja TP. *Recent advances in the map of inherited eye disorders.* J Med Gen. 1994;31:903-15.
  17. Wiggs JL. *Molecular genetics of ocular disease.* New York: Wiley-Liss; 1995.
  18. Dua H, Sewell H, Forrester JV. *The effect of retinal S-antigen specific monoclonal antibody therapy on experimental autoimmune uveoretinitis and experimental autoimmune pinealitis.* Clin Exp Immunol. 1989;75:100-05.
  19. Gregerson DS, Merryman CF, Obritsch WF, Donoso LA. *Identification of a potent new pathogenic site in human retinal S-antigen which induces experimental autoimmune uveoretinitis in Lewis rats.* Cell Immunol. 1990;128: 209-19.
  20. Merryman CF, Donoso LA, Zhang XM, Heber-Katz E, Gregerson DS. *Characterization of a new, potent immunopathogenic epitope in S-antigen that elicits T cells expressing VB8 and VA2 like genes.* J Immunol. 1991;146:75-8.
  21. Wacker WB, Donoso LA, Kalsow CM, Yankeelov JA Jr, Organisciak DT. *Experimental allergic uveitis. Isolation, characterization and localization of soluble uveitopathogenic antigen from bovine retina.* J Immunol. 1977;119: 1949-58.
  22. Edwards R, Szamier RB. *Defective phagocytosis of isolated rod outer segments by RCS rat retinal pigment epithelium in culture.* Science. 1977; 197:1000-3.
  23. Abe T, Yamaki K, Tsuda M, Singh VK, Suzuki S, McKinnon R, et al. *Rat pineal S-antigen: Sequence analysis reveals presence of alfa transducin homologous sequence.* FEBS Lett. 1989;247:307-11.

24. Chant SM, Meyers-Elliott RH. *Autoimmunity: a possible factor in the development of retinal degeneration in the RCS*. Clin Immunol Immunopathol. 1982;22:419-27.
25. Chant SM, Heckenlively J, Meyers-Elliott RH. *Autoimmunity in the hereditary retinal degeneration. I. Basic studies*. Br J Ophthalmol. 1985; 69: 19-24.
26. Thirkill CE, Roth AM, Takemoto DJ, Tyler NK, Keltner JL. *Antibody indications of secondary and superimposed retinal hypersensitivity in retinitis pigmentosa*. Am J Ophthalmol. 1991; 112:132-7.
27. Hendricks RL, Fishman GA. *Lymphocyte subpopulations and S-antigen reactivity in retinitis pigmentosa*. Arch Ophthalmol. 1985;103:61-65.
28. Heredia CD, Vich JM. *Altered cellular immunity and suppressor cell activity in patients with primary retinitis pigmentosa*. Br J Ophthalmol. 1981; 65:850-4.
29. Nussenblatt RB, Gery I, Ballantine EJ, Wacker WB. *Cellular immune responsiveness of uveitis patients to retinal S-antigen*. Am J Ophthalmol. 1980; 89:173-9.
30. Brinkman CJ, Pinckers AJ, Broekhuysse RM. *Immune reactivity to different retinal antigens in patients suffering from retinitis pigmentosa*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1980;19:743-50.
31. Broekhuysse RM, van Herck M, Pinckers AJ, Winkens HJ, van Vugt AH, Ryckaert S, et al. *Immune responsiveness to retinal S-antigen and opsin in serpiginous choroiditis and other retinal diseases*. Doc Ophthalmol. 1988;69:83-93.
32. Brinkman CJ, Broekhuysse RM. *Cell mediated immunity after retinal detachment as determined by lymphocyte stimulation*. Am J Ophthalmol. 1978;86:261-5.
33. Heckenlively JR, Solish AM, Chant SM, Meyers-Elliott RH. *Autoimmunity in hereditary retinal degeneration. II. Clinical studies, anti-retinal antibodies and fluorescein angiogram findings*. Br J Ophthalmol. 1985;69:758-64.
34. Yamaki K, Tsuda M, Ishinohara T. *The sequence of human retinal S antigen reveals similarities with alfa transducin*. FEB Letters. 1988;234:39-43.
35. Abou-Zeid C, Filley E, Steele J, Rook GA. *A simple method for using antigens separated by polyacrylamide gel electrophoresis to stimulate lymphocytes in vitro after converting bands cut from Western blots into antigen bearing particles*. J Immunol Methods. 1987;98:5-10.
36. Lamb JR, O'hehir RE, Young DB. *The use of nitrocellulose immunoblots for the analysis of antigen recognition by T lymphocytes*. J Immunol Methods. 1988;110:1-10.
37. Wright AF, Barrie J. *Molecular genetics of inherited eye disorders*. Great Britain: Harwood Academic Publishers; 1994.
38. Tamayo ML, Bernal JE, Tamayo GE, Frias JL, Alvira G, Vergara E, et al. *Usher syndrome results of a screening program in Colombia*. Clin Gen. 1991;40:304-422.
39. Tamayo ML, Maldonado C, Plazas SL, Alvira GM, Tamayo GE, Zambrano M, et al. *Neuroradiology and clinical aspects of Usher syndrome*. Clin Gen. 1996 50:126-32.

40. Takeuchi M, Keino H, Kezuka T, Usui M, Taguchi O. *Immune response to retinal self-antigens in CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cell-depleted mice*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2004;45:1879-86.
41. Smith JR, Verwaerde C, Rolling F, Naud MC, Delanove A, Thillaye-Goldenberg B, et al. *Tetracycline inducible viral interleukin 10 intraocular gene transfer, using adeno-associated virus in experimental autoimmune uveoretinitis*. Hum Gene Ther. 2005;16:1037-46.
42. Forrester JV, Cornall RJ. Tolerance and autoimmunity in the eye: a role for CD8 T cells in organ specific autoimmunity in the retina. *Immunology*. 2003;110:293-5.