

PROTOCOLLO

STUDIO SULLA SICUREZZA NEI TRAPIANTI DI RETINA PER RETINITE PIGMENTOSA

Ricercatori: Prof. Norman D. Radtke, M.D. Dipartimento di Oculistica e
Scienza Visuali, Scuola di Medicina dell'Università di
Louisville; "Retina Vitreous Resource Center", Ospedale
Audubon, Louisville

Co-Ricercatori: Prof. Robert B. Aramant, Ph.D.,
Magdalene J. Seiler, Ph.D., Assistente
Prof. Heywood Petry, Ph.D.,
Dipartimento d'Oculistica e Scienza Visuali
Dipartimento di scienze anatomiche e neurobiologia
Scuola di Medicina Università di Louisville

Diane J. Pidwell, Immunologia dei trapianti
Direttore Tissue Typing Laboratory
Ospedale Jewish

I. SCOPO

Scopo di questa sperimentazione è verificare la sicurezza del trapianto su pazienti affetti da retinite pigmentosa di tessuto retinico neurale fetale e di epitelio pigmentato. La capacità visiva nell'occhio operato dovrà essere di 20/400 o minore e con acutezza funzionale nell'occhio opposto. Il tessuto retinico, uno strato posto nella parte posteriore dell'occhio, consiste di retina neurale e di epitelio pigmentato. La retina neurale consiste nello strato di cellule nervose che processano la luce in visione. Le cellule fotoricettrici nella retina neurale catturano la luce e la trasformano in segnali elettrici che sono trasmessi all'occhio mediante altre cellule retiniche. L'epitelio pigmentato retinico (RPE) è uno strato situato nella parte posteriore della retina che aiuta a sostenere le cellule della retina stessa ed è inoltre responsabile dell'eliminazione dei prodotti di scarto. Il tessuto fetale utilizzato in questo studio è ricavato da feti abortiti nelle prime 8-18 settimane di gravidanza ottenuti tramite specifica autorizzazione (vedere paragrafo XVI: tessuto retinico fetale). Il trapianto di tessuto fetale è una procedura molto sperimentale. La ricerca sarà svolta nel rispetto delle proibizioni circa l'utilizzo di tessuto fetale umano descritte nella legge 103-43, sezione 498B (Stati Uniti N.d.T.). Non è prevista nessuna ricompensa per il donatore. La ricerca sarà svolta in ottemperanza d'ogni possibile legge federale, statale e locale.

Inizialmente l'applicazione tecnica dello strumento utilizzato per il trapianto e la sua sicurezza sarà dimostrata su di un occhio di pazienti con visione di 20/400 o minore e con un'acutezza funzionale nell'occhio opposto. Il tessuto retinico fetale sarà posizionato nell'area della retina dove il paziente è affetto da distrofia dell'epitelio pigmentato e da una bassa funzione retinica. Gli scopi principali di questo studio sono dimostrare i seguenti fatti:

- 1 La sicurezza della procedura mediante verifiche della visione nelle fasi pre e post operatorie eseguite attraverso ETDRS (Early Treatment Diabetic Retinopathy Study), elettroretinogramma

multifocale, e "multifocal visual evoked potential" (mfVEP) su pazienti affetti da retinite pigmentosa con una visione di 20/400 o minore nell'occhio operato. Una stima del miglioramento nella visione non è possibile. Nessuno dei pazienti trattati fino ad ora ha perduto capacità visiva (valutata nei limiti della procedura di verifica) nell'occhio operato.

- 2 Per determinare che il tessuto del donatore trapiantato nello spazio sottoretinico non danneggi l'occhio ospite. La retina sarà studiata attraverso esami clinici e fluoroangiografia, inoltre l'occhio opposto a quello del trapianto sarà esaminato per evidenziare eventuali sintomi simpatici. Immediatamente prima del trapianto il liquido che circonda il tessuto donato sarà campionato ed in seguito controllato per verificarne la sterilità, la presenza di microrganismi ed endotossine.
- 3 Confermare che il tessuto donatore non provochi una reazione di rigetto nell'occhio ospite. Una reazione di rigetto sarà identificata attraverso una perdita retinica dell'area intorno all'elemento trapiantato con cambiamento di colore e presenza d'infiammazione. Il rigetto cronico sarà riconosciuto nell'esame clinico con la formazione di una ferita nel tessuto trapiantato.

II. DESCRIZIONE DELLO STRUMENTO UTILIZZATO

Attraverso lo strumento utilizzato per l'impianto strati di retina fetale umana con il relativo epitelio pigmentato saranno posizionati sotto la retina. Ovviamente per "dispositivo" s'intende lo strumento utilizzato per l'impianto considerando che il tessuto fetale del donatore è un tessuto biologico e non un dispositivo. Essendo il trapianto di tessuto fetale sotto la supervisione della FDA, il dispositivo ed il tessuto fetale saranno considerati con lo stesso numero IND, sebbene il tessuto non sarebbe di per se un dispositivo.

III. INTRODUZIONE

L'obiettivo a lungo termine di questa proposta è dimostrare che il trapianto di retina è in grado di contrastare il progredire della retinite pigmentosa in cecità tramite recupero della visione. Il "*trapianto di cellule neurali fetali*" coinvolge la retina neurale fetale (che svilupperà fotorecettori) e/o cellule retiniche dell'epitelio pigmentato (RPE). Il "*trapianto di cellule retiniche pigmentate*" implica solamente il trapianto di cellule RPE. Le cellule RPE possono essere "co-trapiantate" insieme alla retina neurale. Questo implica che le cellule RPE del donatore e la retina non sono separate. La retinite pigmentosa (RP) rappresenta un gruppo di malattie ereditarie con mutazione dei fotorecettori o di geni che coinvolgono le cellule RPE. In questa malattia la cecità è dovuta ad una specifica degenerazione dei fotorecettori e/o delle cellule RPE anche se la retina neurale che si connette al cervello può rimanere relativamente intatta (Humayun et al., 1999; Milam et al., 1998; Papermaster e Windle, 1995; Santos et al., 1997). Se i fotorecettori danneggiati e/o le cellule RPE possono essere sostituiti e le nuove cellule sono in grado di connettersi alla parte funzionale della retina ospite una retina degenerata potrebbe essere riparata con recupero della visione. Ad oggi, non c'è stata nessuna chiara evidenza sperimentale accettata dalla comunità scientifica circa il fatto che la retina neurosensoriale fetale trapiantata sia in grado di ristabilire le connessioni con la rete neurale residua. Sebbene le connessioni neurali non sono state ancora accertate, il tessuto trapiantato potrebbe comunque esercitare un effetto positivo di recupero sulla retina essendo questo

dimostrato in esperimenti su animali in vitro ed in vivo (Mohand-Said et al., 1998; Mohand-Said et al., 1997).

I vantaggi nell'utilizzo di tessuto fetale

Ci sono molti motivi circa la scelta dell'utilizzo nel trapianto di cellule fetali e non di cellule adulte. Le cellule fetali hanno un'alta capacità di generare processi e di produrre sostanze che aiutano le cellule ospiti e trapiantate nello stabilire connessioni. Le cellule fetali sono in grado di moltiplicarsi in modo tale che l'area trapiantata possa crescere e ricoprire uno spazio maggiore. Il trapianto di aggregati retinici fetali su topi è in grado di svilupparsi tanto più l'età del donatore è bassa (Aramant and Seiler, 1994b). Le cellule fetali sono in grado di sopportare il trauma del trapianto in modo molto migliore rispetto alle cellule adulte dato che non dipendono così pesantemente dall'ossigeno (Wasselius e Ghosh, 2001). Il tessuto retinico fetale è potenzialmente meno immunogenico rispetto al tessuto adulto in quanto contiene meno "microglia" rispetto ad un tessuto più anziano (Ashwell et al., 1989; Provis et al., 1997).

Riassunto degli Studi Precedenti

La ricerca sul trapianto di retina ha coinvolto sia le cellule RPE (Jiang e Hamasaki, 1994; Li e Turner, 1988; Lopez et al., 1989; Sheedlo et al., 1992; Sheng et al., 1995) che le cellule di retina neurale (Aramant et al., 1988; Del Cerro et al., 1991; Del Cerro et al., 1988; Gouras et al., 1992; 1994; Gouras et al., 1991; Silverman e Hughes, 1989; Silverman et al., 1992; Silverman et al., 1991) (Silverman et al., 1994). Vi sono diverse tecniche utilizzate per il trapianto del tessuto: come *cellule dissociate* (Li e Turner 1988; Lopez et al., 1989; Sheedlo et al., 1992), come *cellule aggregate* (Aramant et al., 1988; Gouras et al., 1994; Seiler e Aramant, 1994; Turner & Blair 1986) oppure *a strati* (Seiler e Aramant, 1998; Sheng et al., 1995; Silverman e Hughes, 1989). Lo scopo del trapianto di cellule RPE è quello di ritardare la degenerazione retinica. Diversi studi hanno dimostrato, utilizzando modelli di distrofie su animali, che mediante il trapianto di cellule RPE sane si può ottenere il recupero di fotorecettori che altrimenti degenererebbero (Jiang e Hamasaki, 1994; Li e Turner, 1988; Lopez et al., 1989). L'effetto di recupero è associato all'età delle cellule del donatore: solo le cellule RPE giovani sono in grado di sopravvivere a lungo termine (Sheedlo et al., 1992; Sheedlo et al., 1993). Il trapianto di cellule RPE non ha nessun effetto nella degenerazione retinica nei topi rds, un modello della degenerazione dei fotorecettori (Li et al., 1993). Il trapianto di cellule RPE è in grado temporaneamente di recuperare cellule fotorecettive esistenti. Comunque qualora i fotorecettori fossero irreversibilmente persi il trapianto di cellule RPE non sarebbe di alcuna utilità e i fotorecettori andrebbero sostituiti. Oltre al trapianto di cellule RPE, relativamente pochi gruppi di ricerca hanno studiato il trapianto di cellule di retina neurale (inclusendo i fotorecettori) (Aramant et al., 1988; Aramant e Seiler, 1995b; Aramant et al., 1999; Del Cerro et al., 1991; Gouras et al., 1994; Gouras et al., 1991; Kwan et al., 1999; Seiler e Aramant, 1988; 1990, 1992; Seiler et al. 1991a; Silverman et al., 1992; Silverman et al., 1994) (revisione: Aramant & Seiler 2000). Il nostro gruppo di ricerca si è focalizzato sul trapianto di cellule di retina fetale. Abbiamo dimostrato che il trapianto di retina fetale umana nei topi è in grado di sviluppare tutti i tipi di cellule in accordo con i tempi tabellati per lo sviluppo negli esseri umani e che il trapianto di fotorecettori è in grado di sviluppare alcune proteine che sono importanti nel processo di trasduzione della luce (Aramant et al., 1990b, Aramant & Seiler 1994a, Seiler e Aramant 1994; Seiler et al., 1996b). Abbiamo inoltre una prima evidenza del processo di crescita della epiretina

fetale umana e dei topi e della costruzione delle sinapsi nella retina ospite (Aramant & Seiler 1995a). Questo non dimostra che il trapianto sottoretinico è in grado di raggiungere gli stessi risultati ed inoltre non dimostra che le sinapsi ricostruite siano funzionanti. Il nostro attuale approccio è quello di trapiantare strati intatti di retina fetale in grado di svilupparsi in modo da costruire morfologicamente una retina normale (Seiler e Aramant, 1998; Seiler et al., 1999b). Abbiamo sviluppato inoltre una tecnica per trapiantare la retina insieme alle sue cellule RPE. Gli strati immaturi intatti di cellule RPE e di retina fetale trapiantati insieme nello spazio sottoretinico di topi rcs sono in grado di sviluppare una morfologia normale (Aramant et al., 1999). Questi trapianti possono potenzialmente contrastare gli effetti sulla retina causati da disfunzioni delle cellule RPE e dei fotorecettori.

Trapianti di tessuto fetale negli esseri umani

A) Tessuto neurale fetale trapiantato nel cervello

Questo settore di ricerca si è evoluto così rapidamente negli ultimi anni che non è neppure possibile stabilire un numero approssimativo dei soggetti coinvolti. Il trapianto di tessuto fetale è stato associato ad un'ampia gamma di malattie, come ad esempio il diabete (trapianti di pancreas fetale), problemi ematici (trapianti di tessuto fetale - "thymus") e problemi di tipo neurologico (in particolar modo il Parkinson). Nei test clinici con pazienti affetti da Parkinson, trapianti di dopaminergici fetali sono stati in grado di ridurre i sintomi di questa malattia incurabile (revisione: Borlongan, 2000; Clarkson e Freed, 1999; Wenning et al., 1997). In uno studio recentemente pubblicato eseguito su 40 soggetti, il trapianto di cellule dopaminergiche dissociate di cultura ha ottenuto dei benefici per i pazienti più giovani e non per quelli più anziani. Dopo miglioramenti nel primo anno, sintomi severi di distonia e diskinesia (dyskinesias) si sono evidenziati nel 15 per cento dei pazienti che hanno ricevuto il trapianto anche dopo una riduzione o la cessazione nella somministrazione di dosi di levodopa (Freed et al., 2001). Altri studi, con differenti sistemi di trapianto, hanno dimostrato benefici nell'utilizzo di dopaminergico fetale (es., Brundin et al., 2000; Hagell et al., 2000; Lindvall, 2000).

B) Tessuto fetale trapiantato nell'occhio

Lo spazio sottoretinico è riconosciuto essere un sito immunologicamente privilegiato (Streilein et al., 2000) data la ridotta probabilità di rigetto del tessuto fetale trapiantato. La retina neurale non è immunogenica ma le cellule RPE e le microgliari presenti nella retina del donatore lo sono (Ma e Streilein, 1999; Wenkel e Streilein, 2000). A fronte della possibilità di rigetto, basata sulle cellule microgliari in quelle donatrici, la nostra ipotesi è che il rigetto non si manifesti proprio per il privilegio immunologico dello spazio sotto-retinico. La maggior parte delle cellule microgliari sono associate ai vasi sanguigni e migrano nella retina post-natale nei topi (Ashwell et al., 1989) e dopo le 16 settimane di gestazione negli esseri umani (Provis et al., 1997). Il numero di cellule microgliari nella retina fetale dei topi è molto più basso che quello nella retina post-natale (Ashwell et al., 1989) perciò è probabile che la retina fetale sia meno immunogenica della retina post-natale in quanto alla retina fetale mancano ancora i vasi retinici interni. Fino ad oggi questo non è stato dimostrato da nessuno. Nel nostro modello abbiamo ottenuto trapianti stabili nei topi da sei a dieci mesi dall'operazione. Questo è indice del fatto che lo strato di retina allogena trapiantato può essere tollerato nello spazio sottoretinico dei topi affetti da degenerazione retinica. Molti autori hanno pubblicato risultati circa i trapianti di cellule RPE negli esseri umani con vari gradi di rigetto (vedere di seguito) ma, fino ad oggi, la questione non è ancora del tutto risolta. E' molto probabile che il donatore ed il ricevente non siano confrontabili nelle classi I e II dei più importanti antigeni istologicamente complessi (MHC). Nei test clinici pianificati il tessuto donatore e il ricevitore

saranno classificati per la classe I e II dei MHC. Il sangue del ricevitore sarà analizzato alla ricerca di anticorpi per gli antigeni MHC in modo da verificare un'eventuale risposta. Il successo dei trapianti di cellule RPE in topi rcs è alla base dei test clinici nei pazienti con AMD eseguiti da un team in Svezia in collaborazione con la Columbia University, New York (Algvere et al., 1994; Algvere et al., 1997; Algvere et al., 1999). I primi trapianti sono stati eseguiti su cinque pazienti nella fase terminale della degenerazione maculare (forma "umida") (Algvere et al., 1994). I trapianti hanno evidenziato sintomi di rigetto nei primi tre mesi. Gli autori hanno riportato una migliore sopravvivenza del tessuto trapiantato su nove pazienti che avevano una forma meno severa del problema (forma "secca"): quattro trapianti di porzioni e cinque trapianti di cellule dissociate (Algvere et al., 1997; Algvere et al., 1999). Su cinque dei nove occhi si sono osservati sintomi di rigetto dopo 6/20 mesi. Tre dei quattro trapianti di una porzione di cellule RPE nei pazienti con AMD secca non hanno evidenziato sintomi di rigetto. Per superare i problemi di rigetto causati dalle cellule RPE allogene, diversi gruppi di ricerca hanno eseguito trapianti autologhi di cellule di RPE adulte (Binder et al., 2001) e di cellule d'epitelio pigmentato dell'iride (IRE) (Abe et al., 2000; Thumann et al., 2000). Questa sperimentazione è stata condotta prevalentemente nei pazienti con AMD umida. Sono stati riportati miglioramenti nella visione (soggettivi). Aggregati di cellule fetali retiniche sono stati trapiantati a pazienti affetti da retinite pigmentosa in India (Das et al., 1999) e ad un paziente affetto da AMD alla John-Hopkins University (Del Cerro et al., 2000; Humayun et al., 2000). Il gruppo di ricerca Indiano ha riportato alcuni miglioramenti soggettivi i quali però non potrebbero essere confermati indipendentemente. Nessun miglioramento è stato rilevato dal gruppo alla John Hopkins. Nessun effetto di rigetto è stato riportato. In modo simile strati di fotorecettori prelevati da esseri umani deceduti sono stati trapiantati a due pazienti con retinite pigmentosa con nessun effetto negativo (Kaplan et al., 1997). Non è stato rilevato nessun miglioramento ma anche nessun caso di rigetto.

IV. DATI SPERIMENTALI

La caratteristica che rende unico il nostro approccio è di trapiantare strati di tessuto fetale umano. In precedenti test clinici eseguiti dal nostro gruppo di ricerca su quattro pazienti affetti da retinite pigmentosa sono stati osservati miglioramenti funzionali transitori (misurati attraverso il mfERG) su di un paziente che ha ricevuto uno strato intatto di retina fetale trapiantato nello spazio sottoretinico (Radtke et al., 1999). In seguito all'approvazione da parte della FDA (BB-IND numero #8354 circa trapianti di retina, ricercatore principale Norman D. Radtke), abbiamo trapiantato strati di retina fetale insieme con le cellule RPE in cinque pazienti affetti da retinite pigmentosa con o senza percezione alla luce (Radtke et al., 2001). Nessun effetto collaterale si è verificato ma nemmeno nessun miglioramento della visione è stato rilevato. Dopo i primi cinque pazienti la FDA ha considerato soddisfacente la sicurezza della procedura e ha ci ha permesso di eseguire trapianti su di un occhio di un paziente con visione di 20/800 o minore. Ad oggi un paziente con la AMD e una visione di 20/800 ha ricevuto un tessuto trapiantato di retina fetale insieme alle cellule RPE. Nel nostro precedente modello di trapianto di aggregati retinici avevamo documentato che nei trapianti fetali la maggior parte delle tipologie delle cellule retiniche si differenziano (Aramant et al., 1990a; Seiler e Turner, 1988; Seiler e Aramant, 1994) e l'organizzazione istologica di questi tessuti può essere migliorata attraverso il co-trapianto di cellule dell'epitelio retinico pigmentato (RPE) fetale (Seiler et al., 1995).

Abbiamo inoltre introdotto i topi immunodeficienti per trapianti retinici interspecie nei quali i trapianti retinici sugli esseri umani non presentano rigetto (Aramant e Seiler, 1994b). Siamo il solo gruppo di ricerca che ha sistematicamente studiato i trapianti a lungo termine derivati da retine

umane fetali come un modello di sviluppo retinico (Aramant et al., 1990b; Aramant e Seiler, 1994b; Seiler e Aramant, 2000b; Seiler e Aramant, 1994). I tessuti retinici degli embrioni umani a 8-18 settimane di gestazione sono stati sezionati e utilizzati per il trapianto in topi semplici (Aramant et al., 1990b; Aramant e Seiler, 1994b; Seiler e Aramant, 2000a; b; Seiler e Aramant, 1994) e su pazienti (Radtke et al., 1999; Radtke et al., 2001). Abbiamo dimostrato che utilizzando come ricevitori animali adulti da sperimentazione con degenerazione retinica, un'area di retina danneggiata può essere morfologicamente riparata attraverso uno strato di retina fetale (Aramant e Seiler, 2000; Seiler e Aramant, 1998). I trapianti sono in grado di sviluppare strati e segmenti di fotorecettori esterni in contatto con l'epitelio pigmentato ospite come in una retina normale (Seiler e Aramant, 1998). Lo spostamento del segnale di trasduzione proteico correlato con le condizioni di luce indica che i processi normali di fototrasduzione si sono stabiliti negli strati di retina trapiantata (Seiler et al., 1999b). In topi rcs e transgenici con degenerazione retinica questo tipo di trapianti è in grado di ripristinare una risposta visiva nell'area del colliculo (colliculus) superiore che topograficamente corrisponde al piazzamento del trapianto nella retina (Sagdullaev et al., 2000; Woch et al., 2001). I processi neurali delle cellule trapiantate e residenti sembrano attraversare l'interfaccia tra il trapianto e le cellule che hanno ospitato il trapianto (Seiler et al., 2001; Seiler et al., 1999a). Trapianti epiretinici sono in grado di instaurare processi nella retina e formare sinapsi con le cellule riceventi (Aramant and Seiler, 1995a). Risultati preliminari suggeriscono l'esistenza di connessioni sinaptiche tra il tessuto trapiantato e la retina ricevente (Aramant et al., 2000), ma questi sono sviluppi che si stanno ancora analizzando.

V. PATOGENESI DELLA RETINITE PIGMENTOSA

La retinite pigmentosa (RP) è una malattia d'origine ereditaria che frequentemente evolve verso la cecità totale. I bastoncelli fotorecettori degenerano nelle fasi iniziali della malattia mentre la degenerazione dei coni avviene come complicazione successiva. Studi genetici hanno dimostrato che diverse mutazioni genetiche sono associate alla retinite pigmentosa (Inglehearn, 1998; van Soest et al., 1999) ed ai problemi associati alla degenerazione dei fotorecettori (Moore e Evans, 1996). Alcuni di questi geni codificano delle proteine nella catena di fototrasduzione dei bastoncelli, altri codificano delle proteine nella struttura del segmento esterno dei fotorecettori e uno codifica la miosina VIIa (sindrome di Usher di tipo I) (Hasson, 1999; Liu et al., 1997). Ci sono anche casi di retinite pigmentosa con mutazioni nei geni delle cellule RPE (esempio., RPE65) (Hamel et al., 2001).

VI. APPROCCI TERAPEUTICI ALLA RETINITE PIGMENTOSA

Tra il 1984 e il 1991 uno studio randomizzato fu condotto da Berson (Berson et al., 1993) per determinare gli effetti della vitamina A (palmitato retinilico) e della vitamina E (dc-oc-tocopherol) assunte per via orale nello sviluppo della retinite pigmentosa. L'autore scoprì che i pazienti che ricevevano 15000IU/giorno di vitamina A avevano un tasso di riduzione delle ampiezze ERG dei coni leggermente minore. Non si ebbe nessun cambiamento nella nitidezza visiva. Molte questioni sono state poste circa i pazienti che hanno comunque percepito un miglioramento della visione senza trascurare i potenziali effetti collaterali dell'uso a lungo termine delle vitamine (aumento della pressione intracraniale, problemi del fegato, problemi alle ossa nei giovani ed elevati tassi di lipidi nel sangue, anomalie teratogeniche al cuore ed al palato). La sicurezza a lungo termine nella somministrazione di dosi elevate di vitamina A è incerta. La maggioranza degli oculisti nel mondo

concorda che la vitamina A potrebbe avere al meglio un effetto marginale ed il suo utilizzo andrebbe valutato tenendo conto dei relativi rischi associati. La terapia genica, i fattori di crescita e i trapianti di retina hanno recentemente avuto degli avanzamenti nella ricerca convenzionale. Sebbene nessun risultato sia arrivato al punto di essere utilizzato clinicamente la ricerca in questo settore è in grado di dare una reale speranza per il futuro.

VII. IPOTESI DA VERIFICARE

- 1 Accertare la sicurezza del trapianto di strati di retina neurale e di cellule RPE e che non vi siano effetti collaterali nell'occhio ricevente quando il trapianto avviene nello spazio sottoretinico.
- 2 Che l'intero strato di retina fetale umana trapiantato insieme alle cellule RPE non provochi una risposta di rigetto nel ricevente.

VIII. PROGETTO DELLO STUDIO

Il medico chirurgo coinvolto è il Dott. Norman D. Radtke. Le persone coinvolte che riceveranno i tessuti di retina fetale e le cellule RPE saranno il Dott. Robert B. Aramant, Dott. Magdalene J. Seiler, Diane J. Pidwell. Il Dott. Woody Petry parteciperà come consulente durante questo progetto per quanto riguarda l'immunologia, l'elettroretinogramma multifocale (mfERG) e il potenziale visuale multifocale evocato (mfVEP). Prima dell'intervento i pazienti devono firmare un documento per confermare di essere a conoscenza della provenienza del tessuto del donatore (appendice 1) e un modulo di consenso (appendice 2) nel quale la ricerca è illustrata.

Saranno selezionati cinque pazienti affetti da retinite pigmentosa e con una visione di 20/400 o minore in un occhio e saranno sottoposti ad un'operazione d'impianto di retina neurale e cellule RPE fetali sotto la retina. Due esami completi saranno eseguiti almeno a 30 giorni dall'operazione per evidenziare miglioramenti nella visione. Il tessuto utilizzato nel trapianto è prelevato tramite uno strumento appositamente realizzato dotato di un ago piatto e incurvato in modo che il tessuto si possa mantenere nella corretta orientazione e polarità nello spazio sottoretinico dell'occhio dei pazienti. (Brevetto U.S. # 5,941,25: Metodo per il trapianto di tessuto retinico; #6.159.218: Attrezzo per il trapianto di tessuto retinico; #6.156.042: Strumento per il trapianto di tessuto retinico). Prima di inserire lo strumento nell'occhio e nello spazio sottoretinico una vitrectomia standard a tre accessi è utilizzata. Lo strumento per l'impianto con il doppio strato di retina fetale e di epitelio pigmentato retinico è inserito nell'occhio e piazzato dietro la retina. Il tessuto viene rilasciato dallo strumento nello spazio sottoretinico ed infine lo strumento stesso è tolto dall'occhio. In fase post-operatoria il paziente è tenuto in osservazione per una settimana, un mese, tre mesi, sei mesi, nove mesi, venti mesi e ventiquattro mesi per osservarne gli sviluppi (F/U).

1-settimana F/U	1-mese F/U	3-mesi F/U	6-mesi F/U	9-mesi F/U	1-anno F/U	2-anni F/U
2-15 giorni	16-60 giorni	61-120 giorni	121-200 giorni	201-300 giorni	301-455 giorni	700-760 giorni

Saranno eseguiti i seguenti esami:

1. La visione verrà misurata utilizzando l'ETDRS (Early Treatment Diabetic Retinopathy Study). Una misurazione standard e due esami completi saranno eseguiti ad almeno 30 giorni di distanza per confermare i valori visivi.
2. I parametri della funzione visiva saranno studiati attraverso la determinazione della sensibilità al contrasto e del campo visivo (Goldmann).
3. Misurazione della pressione intra-oculare.
4. Biomicroscopia "Slit lamp" per determinare (a) una reazione congiuntivale, (b) chiarezza della cornea, (c) profondità della camera anteriore e nitidezza, (d) stato dell'iride e delle pupille e valutazione delle lenti, (e) oftalmoscopia indiretta nell'esame del "fundus" retinico.
5. Fotografie del "fundus" e studi di angiografia fluorescente saranno eseguiti in fase pre-operatoria e ad ogni visita di controllo successiva.
6. Elettroretinogramma multifocale (mfERG) e il potenziale multifocale visuale evocato (mfVEP): 3 misure indipendenti saranno eseguite prima dell'operazione e ad ogni visita di controllo successiva.

Il tempo richiesto per le visite di controllo sarà approssimativamente tre ore per ogni visita post-operatoria. Sono previste sei visite post-operatorie in un anno. I criteri per valutare il successo dell'intervento saranno:

1. Il tessuto del donatore non deve provocare una reazione di rigetto nell'occhio ricevente o causare un'infezione. Una reazione di rigetto sarà identificata attraverso una perdita nell'area dell'intervento con relativo scolorimento e tramite la presenza di infiammazione nell'area del trapianto. Il rigetto cronico sarà riconosciuto nell'esame clinico attraverso la formazione di ferite nella zona del trapianto ("parenchyma").
2. Determinare che lo strumento utilizzato nel trapianto non abbia nessun effetto collaterale nell'occhio ricevente (attraverso la valutazione della salute della retina nell'esame clinico, fluoroangiografia) e per escludere effetti simpatetici nell'occhio opposto. Immediatamente prima dell'impiantazione campioni del fluido intorno al tessuto del donatore saranno prelevati e verificati per verificarne la sterilità, microplasma ed endotossine.

IX. METODI UTILIZZATI PER IDENTIFICARE, RECLUTARE E SELEZIONARE I SOGGETTI

Il campione sarà formato da cinque pazienti affetti da retinite pigmentosa. L'idoneità dei soggetti da selezionare per il trapianto sarà a carico dall'esperienza clinica vitreoretinica del Dott. N. D. Radtke. La randomizzazione non rappresenta un problema in questo studio essendo che saranno utilizzati solo pazienti che raggiungono i criteri di perdita della visione causata da retinite pigmentosa.

Criteria per la selezione dei pazienti

Criteria d'inclusione:

- Il soggetto deve avere una visione centrale di 20/400 o minore in un occhio misurata tramite l'esame ETDRS per una durata di almeno un anno e avere la diagnosi di retinite pigmentosa; i gradi della visione nell'occhio non operato non sono considerati
- I soggetti devono avere almeno 21 anni
- Il paziente dichiara di poter ritornare per le visite di controllo
- Il paziente ha firmato il modulo di consenso informato circa il trapianto retinico
- Il paziente è stato sottoposto all'esame del campo visivo secondo Goldmann e all'esame mfERG

Criteria d'esclusione:

- Pazienti con una visione centrale migliore di 20/400 in un occhio misurata tramite l'esame ETDRS o con una visione minore di 20/400 in un occhio misurata tramite ETDRS ma per una durata inferiore ad un anno
- Il paziente non è disponibile a firmare il modulo di consenso informato
- Pazienti sotto i 21 anni d'età
- Pazienti con problemi medici dati come controindicazioni per l'anestesia a breve termine
- Pazienti che non sono disponibili a ritornare per le visite di controllo
- Pazienti in stato di gravidanza
- La presenza di una ferita nell'epitelio pigmentato retinico
- Qualsiasi malattia oculare che ha compromesso o potrebbe compromettere la visione nell'occhio studiato e falsare l'analisi o i risultati principali
- Incapacità di ottenere fotografie per documentare le condizioni del "fundus", includendo difficoltà nell'accesso venoso
- Partecipare ad un altro test clinico oculistico o utilizzare qualsiasi altra medicina sperimentale nelle 12 settimane precedenti la partenza della sperimentazione
- Essere stati sottoposti a chirurgia intraoculare negli ultimi due mesi o "capsulotomy" nell'ultimo mese nello studio dell'occhio
- Pazienti che hanno trascorsi di uveiti, malattie della membrana, retinopatie diabetiche, glaucoma, o cataratta che prevengono la visualizzazione del polo posteriore

X. RISCHI POTENZIALI

La procedura eseguita in questa ricerca potrebbe avere effetti collaterali non desiderati per diversi motivi. I rischi conosciuti e potenziali per questa procedura coinvolgono i problemi delle anestesi locali o totali. L'operazione è eseguita nell'area retrobulbare e/o in anestesia totale. Complicazioni chirurgiche potrebbero svilupparsi nella cecità totale e/o nella perdita dell'occhio. Effetti collaterali associati alla "sperimentazione pilota" sono:

- (1) distacco della retina
- (2) emorragia vitrea
- (3) emorragia subretinica e/o proliferazione di tessuto subretinico
- (4) endofalmita

- (5) glaucoma neovascolare
- (6) Difetti dell'epitelio corneale
- (7) Cataratta
- (8) Diplopia
- (9) Ptosis
- (10) prephthisis or phthisis
- (11) possibili complicazioni derivanti dall'anestesia, reazioni allergiche o effetti collaterali dovuti a farmaci specifici.

Altri potenziali effetti collaterali associati al trapianto includono:

- (1) La conoscenza del fatto che il tessuto è stato ottenuto da aborto indotto potrebbe causare stress psicologico
- (2) Il rischio potenziale della trasmissione d'infezioni virali tipo AIDS o epatiti causate dal tessuto trapiantato. Il sangue della donna che abortisce e dona il tessuto fetale sarà esaminato per verificare la presenza di anticorpi contro i virus per l'immunodeficienza umana (HIV, il virus che causa l'AIDS) e epatiti (l'antigene di superficie dell'epatite B, Anticorpo del virus dell'epatite C). Per ridurre il rischio di trasmissione virale, i tessuti abortiti di donne positive ai virus sopra menzionati sono esclusi.
- (3) C'è una bassa probabilità di una reazione immunologica al tessuto del donatore. La reazione immunologica causata dal tessuto del donatore può essere studiata. Pensiamo ci sia una bassa probabilità di una risposta immunologica al tessuto del donatore così l'immunosoppressione (sia sistemica o locale) non sarà utilizzata. C'è comunque il rischio potenziale di una reazione immunologica causata dal tessuto trapiantato. **Ai donatori non sarà richiesto un altro prelievo di sangue essendo un campione del donatore disponibile tramite la stessa procedura di campionamento del sangue che il centro chirurgico per le donne (Women's Surgical Center) esegue per la caratterizzazione del sangue, l'esame degli anticorpi e il conteggio completo delle cellule. La quantità aggiuntiva richiesta per la sperimentazione è di 10cc. Questo implica che non ci sono rischi aggiuntivi per il donatore in quanto il prelievo di sangue è effettuato solo una volta (corrispondentemente al prelievo che comunque sarebbe eseguito prima dell'aborto).** Le donne in gravidanza e in fase d'allattamento sono escluse come potenziali partecipanti allo studio. Il test di gravidanza sarà eseguito sulle donne potenzialmente in grado di procreare.

E' necessario richiamare l'attenzione sul fatto che nella procedura ci sono ulteriori rischi attualmente non prevedibili.

XI. POTENZIALI BENEFICI PER I PARTECIPANTI ALLA SPERIMENTAZIONE

I potenziali benefici dei pazienti affetti da retinite pigmentosa sono che la visione potrebbe essere preservata o migliorata. I soggetti saranno informati su ogni sviluppo che potrà influenzare la loro volontà a continuare lo studio. Questo si applicherà a tutti i soggetti che sono disponibili dopo aver firmato il modulo di consenso ma prima del trapianto.

XII. MONITORARE GLI EFFETTI COLLATERALI IMPREVISTI

Il ricercatore principale monitorerà i progressi dei pazienti. Tutti gli effetti collaterali come un aumento cronico della pressione, infezioni intraoculari e/o una ritardata guarigione della ferita con o senza perdite saranno riportati entro 10 giorni all'IRB locale

XIII. RICOMPENSE

I soggetti non sono ricompensati per aver partecipato a questa sperimentazione. I costi del personale, dell'operazione ed ospedalieri saranno coperti da un benefattore anonimo. I viaggi per le visite di controllo saranno a carico dei pazienti.

XIV. FINANZIAMENTO

I fondi necessari per questa sperimentazione provengono da un benefattore anonimo. Gli altri sponsor sono il dipartimento di oculistica dell'Università di Louisville e la fondazione per le scienze visuali e la ricerca vitreoretinica. La seconda organizzazione è una no-profit 501-C3. Il suo scopo è di supportare la ricerca retinica aiutando i progetti all'Università di Louisville nel dipartimento di anatomia e oculistica fin dal 1983.

XV. CONFIDENZIALITA'

Tutti i dati relativi ai pazienti coinvolti saranno custoditi in un armadio chiuso a chiave all'interno dell'ufficio del Dr. Norman D. Radtke, 240 Audubon Medical Plaza, Louisville, Kentucky. La confidenzialità medica di routine sarà applicata a tutti i dati della sperimentazione. L'utilizzo e/o la pubblicazione dei risultati della sperimentazione non implica l'utilizzo e/o la rivelazione dell'identità dei pazienti. La FDA e la Human Studies Committee all'ospedale Norton Audubon potrebbero voler ispezionare i dati.

XVI. TESSUTO RETINICO FETALE

La ricerca è condotta in accordo con le leggi circa l'utilizzo di tessuto fetale umano descritte nelle "Public Law" 103-43, sezione 498B. Non è previsto alcuna ricompensa per il donatore. La ricerca sarà inoltre condotta in accordo con ogni possibile legge statale o locale. I pazienti selezionati per la sperimentazione non saranno coinvolti in:

- (i) Decisioni riguardanti le tempistiche, i metodi e le procedure utilizzate per determinare lo stato di gravidanza
- (ii) La determinazione della possibilità di utilizzo del feto alla terminazione della gravidanza.

La ricerca proposta non introduce nessuna modifica nelle procedure tali da causare maggiori rischi al feto o alla donna durante la terminazione della gravidanza. Il tessuto fetale utilizzato in questo studio è derivato da feti deceduti nelle prime 8-16 settimane di gravidanza ottenuti tramite aborti elettivi. Il tessuto sarà trattato al centro clinico EMW di Louisville. Dopo che la donna ha firmato i documenti formali per la procedura di aborto alla presenza di un consulente legale, le sarà chiesto di donare il tessuto abortito e di firmare il relativo modulo di consenso (appendice 3, modulo di

consenso per la donazione del tessuto per la ricerca scientifica). Le decisioni circa l'aborto e la firma del modulo di consenso sono completamente indipendenti tra loro. Il modulo di consenso è firmato alla presenza di un consulente legale e non del medico coinvolto il quale è solo presente durante la procedura di aborto. Prima della firma è inoltre discussa la necessità di dare un campione di sangue. Il costo per le analisi del sangue è a carico dell'investigatore. La cartella clinica e il modulo circa i possibili rischi ambientali è compilato per escludere diverse malattie (vedi appendice 6). Dopo aver firmato il modulo di consenso il donatore può cambiare in ogni momento la sua decisione di donare il tessuto. Non ci sarà nessuna ricompensa per il donatore: monetaria o di alcun tipo. Il donatore rimarrà anonimo all'investigatore. Non ci sarà assolutamente nessun cambiamento nella procedura chirurgica come risultato nella partecipazione al progetto. Il medico esecutore dell'aborto firmerà il modulo di consenso e determinerà che il feto sia deceduto. Una procedura abortiva di aspiramento che macera il tessuto fetale sarà utilizzata. Il rappresentante legale e il medico coinvolto non avranno nessun coinvolgimento nella sperimentazione proposta (vedi appendice 4). Al donatore è inoltre chiesto nel modulo di consenso di dare un campione di sangue per determinare che il tessuto è sicuro per essere trapiantato. La necessità di dare un campione di sangue sarà spiegata al donatore dal rappresentante legale al momento in cui verrà chiesto di donare il tessuto. Solo tessuti liberi da contaminazione saranno considerati. Un campione di sangue del donatore sarà esaminato per verificare la presenza di anticorpi contro virus da immunodeficienza (HIV) ed epatiti (HAV, HBV, HCV), tutte le varianti della HLA, RPR e l'esame ABO. Per ridurre i rischi di trasmissione di virus i tessuti abortiti da donne risultate positive ai menzionati virus saranno esclusi. Al donatore non sarà richiesto un ulteriore prelievo essendo il sangue del donatore disponibile tramite la procedura di campionamento che il centro chirurgico per la donna effettua per la caratterizzazione, gli esami degli anticorpi e il conteggio completo delle cellule. La quantità aggiuntiva richiesta per la sperimentazione è di 10cc. Questo implica che non ci sono rischi aggiuntivi per il donatore essendo la procedura di prelievo del sangue effettuata solo una volta e comunque eseguita per ottenere l'autorizzazione all'aborto. Inoltre, una caratterizzazione del sangue e del tessuto sarà effettuata con un campione fetale ed il sangue del ricevente per verificare se il donatore ed il ricevente sono compatibili negli antigeni MHC. Questa è stata la procedura seguita per gli ultimi quattro pazienti e donatori. Nessuna coincidenza negli antigeni MHC è stata fino ad ora osservata. Sebbene non è disponibile nessun campione di sangue prelevato dal feto, il tessuto trapiantato proveniva da un'ampia sezione, una sezione utilizzata per la caratterizzazione del tessuto del donatore. La caratterizzazione del tessuto del donatore è eseguita attraverso l'estrazione del DNA utilizzando un kit QIAGEN (Pel Freeze, Brown Deer, Wisconsin) specifico per tessuti ed è diverso da quello utilizzato per la caratterizzazione del sangue. Il kit consente di identificare sequenze specifiche nel DNA MHC e questo permette l'identificazione delle sequenze MHC nel tessuto del donatore. Tutti i tecnici e le persone coinvolte saranno istruite nel seguire un protocollo severo circa l'utilizzo di guanti sterili, maschere, camici e strumenti sterili. Il tessuto verrà trasportato dal EMW nel ghiaccio in un contenitore sterile e in seguito in un contenitore bioprotettivo in KLEC 2201 dove gli occhi verranno trattati e immagazzinati in un contenitore per ibernazioni E. In seguito verrà trasportato in una stanza speciale nell'ospedale dove il tessuto sarà sezionato all'interno di un contenitore protettivo. Il trattamento finale sarà fatto in sala operatoria. I fluidi che circondano il tessuto sono raccolti per l'esecuzione degli esami microbiologici; gli esami del microplasma e delle endotossine saranno eseguiti nei laboratori di specialità a Los Angeles, California. Saranno utilizzate procedure sterili ed è sottointeso l'utilizzo di guanti chirurgici sterili, contenitori sterili soluzioni sterili filtrate e strumenti sterilizzati. Quando possibile tutti gli strumenti per il trasferimento, ecc..., sono inseriti in un'autoclave prima dell'utilizzo. Gli strumenti che non possono essere inseriti nell'autoclave (come lo strumento per gestire il trasferimento) sono sterilizzati attraverso una procedura Sterrad (la procedura Sterrad utilizza un gas di sterilizzazione

per evitare di avere lo strumento umido e per evitare danni causati dal calore). I guanti sono cambiati regolarmente. Il tessuto avanzato è trattato con le stesse procedure utilizzate per tutti gli scarti biologici. Segue la procedura per gestire il tessuto fetale del donatore:

Il tessuto, ottenuto da una procedura di aborto, è inserito in un contenitore sterile e refrigerato. Il tessuto potrebbe rimanere nel refrigeratore (4C) anche per un'ora a seconda del tempo impiegato dal nostro personale per prelevare.

1. Il tessuto è trasportato all'interno di un contenitore con ghiaccio all'istituto Lions Eye nel Kentucky
2. In un contenitore sterile contro i rischi biologici (classe II) il tessuto viene lavato alcune volte utilizzando strumenti e contenitori per la dissezione (autoclavati) con ghiaccio sterile salino per rimuovere il sangue. Il tessuto che circonda l'occhio è rimosso. Il tempo impiegato per il lavaggio del tessuto con una soluzione salina è tra i 2 e i 10 minuti.
3. Gli occhi sono posizionati in un piatto di plastica sterile di 35mm o in un piatto profondo 6mm contenenti un media freddo sterile (cat. #10741-023) con supplementi B-27 (cat. #17504-044) (Gibco BRL, Baltimore, MD). Tutte le procedure ulteriori di dissezione avverranno in questo ambiente. Nei precedenti test clinici il tempo trascorso dal passo 1 (aborto) al passo 4 (posizionamento all'interno del contenitore per l'ibernazione) è stato tra i 30 e i 90 minuti.
4. Trascorse 1.5/2.5 ore dopo l'aborto gli occhi sono trasportati nel ghiaccio verso un laboratorio dedicato nell'ospedale che è a 15 minuti di distanza.
5. Nel laboratorio, all'interno di un contenitore con flusso laminare, il tessuto è sezionato asetticamente in un piatto sterile largo 35mm su un piatto metallico freddo (contenente un piccolo vassoio di ghiaccio) sotto un microscopio per sezioni a fibre ottiche. Il getto del flusso laminare è lasciato costantemente acceso e decontaminato con luce UV quando non in uso.
6. La dissezione parte tra le 2 e le 4 ore dall'aborto. Durante la dissezione il tessuto è trasferito alcune volte in un piatto rinfrescato contenente un media di ibernazione E. Due procedure alternative sono utilizzate:

a) Dissezione della sola retina: la retina è sezionata liberandola dal tessuto circostante (sclera, coroide, RPE, cornea, lenti e lo strato dei vasi sanguigni nel vitreo). Per sezionare la retina il tempo impiegato è di circa 15-25 minuti.

b) Dissezione della retina con le cellule RPE: all'inizio la parte posteriore dell'occhio è sezionata liberandola dai muscoli extraoculari e il tessuto connettivo. In seguito l'occhio è messo in un'incubatrice umidificata per 30 minuti in un "dispase" sterile (prodotto biomedicale cat. # 354235) a 37C. Dopo tre lavaggi in un media per l'ibernazione E la sclera è rimossa. Il tempo impiegato per la sezione della retina con le cellule RPE in laboratorio è di circa 45-70 minuti includendo il tempo di incubazione.

7. Il tessuto è trasportato nella camera operatoria e mantenuto in ghiaccio nel media di ibernazione E
8. All'interno della sala operatoria, in ambiente sterile, è effettuata una seconda dissezione utilizzando il microscopio con le relative fibre ottiche precedentemente decontaminate e ricoperte con una plastica sterile secondo le procedure operatorie standard.
9. La dissezione finale delle cellule RPE (rimozione del coroide) avviene nella camera operatoria. Il tempo impiegato per questa sezione è di circa 20/45 minuti a seconda della dimensione dell'occhio. Segmenti rettangolari di retina con o senza le cellule RPE (1.5/2 mm larghi, 2/3.5

mm lunghi) sono tagliati con un microscissore sterile. Si registrano i dati circa l'orientazione ed il quadrante retinico da cui i segmenti sono tagliati.

10. Il segmento è caricato nello strumento utilizzato per l'impianto insieme ad un piccolo spaziatore (stessa larghezza ma con solo 0.2/0.4mm di lunghezza) vicino al mandrino impugnato dal chirurgo. Nei precedenti test clinici il tempo dall'aborto all'impianto è stato di 4.5/8 ore.

REFERENZE/ PUBBLICAZIONI

Abe, T., Yoshida, M., Tomita, H., Kano, T., Sato, M., Wada, Y., Fuse, N., Yamada, T. and Tamai, M. (2000) Auto iris pigment epithelial cell transplantation in patients with age-related macular degeneration: short-term results. *Tohoku J Exp Med* 191, 7-20.

Algvere, P., Berglin, L., Gouras, P. and Sheng, Y. (1994) Transplantation of fetal retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration with subfoveal neovascularization [see comments]. Comment in: *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1994 Dec;232(12):706. *Graefes Archive for Clinical & Experimental Ophthalmology* 232, 707-16.

Algvere, P. V., Berglin, L., Gouras, P., Sheng, Y. and Kopp, E. D. (1997) Transplantation of RPE in age-related macular degeneration: observations in disciform lesions and dry RPE atrophy. *Graefes Archive for Clinical & Experimental Ophthalmology* 235, 149-58.

Algvere, P. V., Gouras, P. and Dafgard Kopp, E. (1999) Long-term outcome of RPE allografts in non-immunosuppressed patients with AMD. *Eur J Ophthalmol* 9, 217-30.

Aramant, R. and Seiler, M. (2000) Retinal Transplantation. *Science & Medicine* 7, 20-29.

Aramant, R., Seiler, M., Ehinger, B., Bergstrm, A., Adolph, A. R. and Turner, J. E. (1990a) Neuronal markers in rat retinal grafts. *Dev. Brain Res.* 53, 47-61.

Aramant, R., Seiler, M., Ehinger, B., Bergstrm, A., Gustavii, B., Brundin, P. and Adolph, A. R. (1990b) Transplantation of human embryonic retina to adult rat retina. *Restor. Neurol. Neurosci.* 2, 9-22.

Aramant, R., Seiler, M. and Turner, J. E. (1988) Donor age influences on the success of retinal transplants to adult rat retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 29, 498-503.

Aramant, R. B. and Seiler, M. J. (1994a) Embryonic retinal cell transplantation to adult retina. In: *Retina, Aging and Transplantation. Proceedings of "Seminaires Ophthalmologiques IPSEN"*, pp. 31-42.

Eds. Y. Christen, M. Doly and M. T. Droy-Lefaix. Elsevier: Paris. Aramant, R. B. and Seiler, M. J. (1994b) Human embryonic retinal cell transplants in athymic immunodeficient rat hosts. *Cell Transplantation* 3, 461-74.

Aramant, R. B. and Seiler, M. J. (1995a) Fiber and synaptic connections between embryonic retinal transplants and host retina. *Experimental Neurology* 133, 244-55.

- Aramant, R. B. and Seiler, M. J. (1995b) Organized embryonic retinal transplants to normal or light-damaged rats. *Soc. Neurosci. Abstr.* 21, 1308.
- Aramant, R. B., Seiler, M. J. and Ball, S. L. (1999) Successful cotransplantation of intact sheets of fetal retinal pigment epithelium with retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 1557-1564.
- Aramant, R. B., Seiler, M. J. and Woch, G. (2000) Retinal transplants form synaptic connections with host retinas with photoreceptor degeneration - demonstrated by transsynaptic tracing from host brain [ARVO abstract]. *Invest. Ophthalmol. Vis Sci.* 41 (Suppl.), S101; program # 528.
- Ashwell, K. W., Hollander, H., Streit, W. and Stone, J. (1989) The appearance and distribution of microglia in the developing retina of the rat. *Vis Neurosci* 2, 437-48.
- Berson, E. L., Rosner, B., Sandberg, M. A., Hayes, K. C., Nicholson, B. W., Weigel-DiFrano, C. and Willett, W. (1993) Vitamin A supplementation for retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol* 111, 1456-9.
- Binder, S., Krebs, I., Stolbe, U., Feichtinger, H., Jahn, C., Krugluger, K., Frohner, U., Abri, A. and Kojuncu, A. (2001) Transplantation of autologous RPE in eyes with foveal neovascularization [ARVO abstract]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, S932.
- Borlongan, C. V. (2000) Transplantation therapy for Parkinson's disease. *Expert Opin Investig Drugs* 9, 2319-30.
- Brundin, P., Karlsson, J., Emgard, M., Schierle, G. S., Hansson, O., Petersen, A. and Castilho, R. F. (2000) Improving the survival of grafted dopaminergic neurons: a review over current approaches. *Cell Transplant* 9, 179-95.
- Card, J. P. (1998) Practical considerations for the use of pseudorabies virus in transneuronal studies of neural circuitry. *Neurosci Biobehav Rev* 22, 685-94.
- Clarkson, E. D. and Freed, C. R. (1999) Development of fetal neural transplantation as a treatment for Parkinson's disease. *Life Sci* 65, 2427-37.
- Das, T., del Cerro, M., Jalali, S., Rao, V. S., Gullapalli, V. K., Little, C., Loreto, D. A., Sharma, S., Sreedharan, A., del Cerro, C. and Rao, G. N. (1999) The transplantation of human fetal neuroretinal cells in advanced retinitis pigmentosa patients: results of a long-term safety study. *Exp Neurol* 157, 58-68.
- Del Cerro, M., Humayun, M. S., Sadda, S. R., Cao, J., Hayashi, N., Green, W. R., Del Cerro, C. and de Juan, E. (2000) Histologic correlation of human neural retinal transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 3142-8.
- Del Cerro, M., Ison, J. R., Bowen, G. P., Lazar, E. and Del Cerro, C. (1991) Intraretinal grafting restores function in light-blinded rats. *NeuroReport* 2, 529-532.
- Del Cerro, M., Notter, M. F., Wiegand, S. J., Jiang, L. Q. and Del Cerro, C. (1988) Intraretinal transplantation of fluorescently labeled retinal cell suspensions. *Neurosci. Lett.* 92, 21-26.

- Freed, C. R., Greene, P. E., Breeze, R. E., Tsai, W. Y., DuMouchel, W., Kao, R., Dillon, S., Winfield, H., Culver, S., Trojanowski, J. Q., Eidelberg, D. and Fahn, S. (2001) Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 344, 710-9.
- Gouras, P., Du, J., Kjeldbye, H., Yamamoto, S. and Zack, D. J. (1992) Reconstruction of degenerate rd mouse retina by transplantation of transgenic mouse photoreceptors. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 33, 2579-2586.
- Gouras, P., Du, J., Kjeldbye, H., Yamamoto, S. and Zack, D. J. (1994) Long-term photoreceptor transplants in dystrophic and normal mouse retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 35, 3145-53.
- Gouras, P., Du, J., Kwun, R., Kjeldbye, H. and Lopez, R. (1991) Transplantation of photoreceptors labeled with tritiated thymidine into RCS rats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 32, 1704-1707.
- Hagell, P., Crabb, L., Pogarell, O., Schrag, A., Widner, H., Brooks, D. J., Oertel, W. H., Quinn, N. P. and Lindvall, O. (2000) Health-related quality of life following bilateral intrastriatal transplantation in Parkinson's disease. *Mov Disord* 15, 224-9.
- Hamel, C. P., Griffoin, J. M., Lasquelléc, L., Bazalgette, C. and Arnaud, B. (2001) Retinal dystrophies caused by mutations in RPE65: assessment of visual functions. *Br J Ophthalmol* 85, 424-7.
- Hasson, T. (1999) Molecular motors: sensing a function for myosin-VIIa. *Curr Biol* 9, R838-41.
- Humayun, M. S., de Juan, E., del Cerro, M., Dagnelie, G., Radner, W., Sadda, S. R. and del Cerro, C. (2000) Human neural retinal transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 3100-6.
- Humayun, M. S., Prince, M., de Juan, E., Jr., Barron, Y., Moskowitz, M., Klock, I. B. and Milam, A. H. (1999) Morphometric analysis of the extramacular retina from postmortem eyes with retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 143-8.
- Inglehearn, C. F. (1998) Molecular genetics of human retinal dystrophies. *Eye* 12, 571-9.
- Jiang, L. Q. and Hamasaki, D. (1994) Corneal electroretinographic function rescued by normal retinal pigment epithelial grafts in retinal degenerative Royal College of Surgeons rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35, 4300-9.
- Kaplan, H. J., Tezel, T. H., Berger, A. S., Wolf, M. L. and Del Priore, L. V. (1997) Human photoreceptor transplantation in retinitis pigmentosa. A safety study. *Archives of Ophthalmology* 115, 1168-72.
- Kwan, A. S., Wang, S. and Lund, R. D. (1999) Photoreceptor layer reconstruction in a rodent model of retinal degeneration. *Exp Neurol* 159, 21-33.

- Li, L., Sheedlo, H. J. and Turner, J. E. (1993) Retinal pigment epithelial cell transplants in retinal degeneration slow mice do not rescue photoreceptor cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34, 2141-5.
- Li, L. and Turner, J. E. (1988) Inherited retinal dystrophy in the RCS rat: prevention of photoreceptor degeneration by pigment epithelial cell transplantation. *Exp. Eye Res.* 47, 911-917.
- Lindvall, O. (2000) Neural transplantation in Parkinson's disease. *Novartis Found Symp* 231, 110-23.
- Liu, X. Z., Newton, V. E., Steel, K. P. and Brown, S. D. (1997) Identification of a new mutation of the myosin VII head region in Usher syndrome type 1. *Hum Mutat* 10, 168-70.
- Lopez, R., Gouras, P., Kjeldbye, H., Sullivan, B., Reppucci, V., Brittis, M., Wapner, F. and Goluboff, E. (1989) Transplanted retinal pigment epithelium modifies the retinal degeneration in the RCS rat. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 30, 586-588.
- Ma, N. and Streilein, J. W. (1999) T cell immunity induced by allogeneic microglia in relation to neuronal retina transplantation. *J Immunol* 162, 4482-9.
- Milam, A. H., Li, Z. Y. and Fariss, R. N. (1998) Histopathology of the human retina in retinitis pigmentosa. *Prog Retin Eye Res* 17, 175-205.
- Mohand-Said, S., Deudon-Combe, A., Hicks, D., Simonutti, M., Forster, V., Fintz, A. C., Leveillard, T., Dreyfus, H. and Sahel, J. A. (1998) Normal retina releases a diffusible factor stimulating cone survival in the retinal degeneration mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8357-62.
- Mohand-Said, S., Hicks, D., Simonutti, M., Tran-Minh, D., Deudon-Combe, A., Dreyfus, H., Silverman, M. S., Ogilvie, J. M., Tenkova, T. and Sahel, J. (1997) Photoreceptor transplants increase host cone survival in the retinal degeneration (rd) mouse. *Ophthalmic Res* 29, 290-7.
- Moore, A. and Evans, K. (1996) Molecular genetics of central retinal dystrophies. [Review] [77 refs]. *Australian & New Zealand Journal of Ophthalmology* 24, 189-98.
- Papermaster, D. and Windle, J. (1995) Death at an early age. Apoptosis in inherited retinal degenerations. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 36, 977-83.
- Provis, J. M., Leech, J., Diaz, C. M., Penfold, P. L., Stone, J. and Keshet, E. (1997) Development of the human retinal vasculature: cellular relations and VEGF expression. *Exp Eye Res* 65, 555- 68.
- Radtke, N. D., Aramant, R. B., Seiler, M. J. and Petry, H. M. (1999) Preliminary report: indications of improved visual function following retina sheet transplantation to retinitis pigmentosa patients. *Am. J. Ophthalmol.* 128, 384-387.
- Radtke, N. D., Seiler, M. J., Aramant, R. B., Pidwell, D. J., and Petry, H. M. (2001) Transplantation of intact sheets of fetal neural retina and RPE in retinitis pigmentosa patients [ARVO abstract]. *Invest Ophthalmol Vis. Sci* 42, S931.
- Sagdullaev, B. T., Aramant, R. B., Seiler, M. J., Woch, G. and McCall, M. A. (2000) Retinal transplantation restores visual responses in a transgenic rat model of retinal degeneration [Abstract]. *Soc Neurosci Abstr.* 26, 1099; program #415.4.

- Santos, A., Humayun, M. S., de Juan, E., Jr., Greenburg, R. J., Marsh, M. J., Klock, I. B. and Milam, A. H. (1997) Preservation of the inner retina in retinitis pigmentosa. A morphometric analysis. *Arch Ophthalmol* 115, 511-5.
- Seiler, M. and Aramant, R. (2000a) Intact-sheet transplants of human fetal retina with pigment epithelium develop normal lamination and survive long-term in nude rats. *Exp. Eye Res.* 71 (Suppl. 1-ICER Abstracts), S60.
- Seiler, M. and Aramant, R. (2000b) Long-term transplants of human fetal RPE sheets together with neural retina develop normally in nude rats [ARVO abstract]. *Invest. Ophthalmol. Vis Sci.* 41, S856.
- Seiler, M., Boggess, B. and Aramant, R. (2001) Connectivity of retinal transplants - a hope for the treatment of retinal degeneration? [ARVO abstract]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, program #4169.
- Seiler, M. and Turner, J. E. (1988) The activities of host and graft glial cells following retinal transplantation into the lesioned adult rat eye: developmental expression of glial markers. *Dev. Brain Res.* 43, 111-122.
- Seiler, M. J. and Aramant, R. B. (1994) Photoreceptor and glial markers in human embryonic retina and in human embryonic retinal transplants to rat retina. *Brain Research. Developmental Brain Research* 80, 81-95.
- Seiler, M. J. and Aramant, R. B. (1998) Intact sheets of fetal retina transplanted to restore damaged rat retinas. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2121-31.
- Seiler, M. J., Aramant, R. B. and Ball, S. L. (1999a) Bipolar and ganglion cells in intact-sheet retinal transplants - potential transplant/host interactions. [ARVO abstract]. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, S730.
- Seiler, M. J., Aramant, R. B. and Ball, S. L. (1999b) Photoreceptor function of retinal transplants implicated by light-dark shift of S-antigen and rod transducin. *Vision Res* 39, 2589-2596.
- Seiler, M. J., Aramant, R. B. and Bergstrm, A. (1995) Co-transplantation of embryonic retina and retinal pigment epithelial cells to rabbit retina. *Current Eye Research* 14, 199-207.
- Sheedlo, H. J., Li, L., Gaur, V. P., Young, R. W., Seaton, A. D., Stovall, S. V., Jaynes, C. D. and Turner, J. E. (1992) Photoreceptor rescue in the dystrophic retina by transplantation of retinal pigment epithelium. *Int. Rev. Cytol.* 138, 1-49.
- Sheedlo, H. J., Li, L. and Turner, J. E. (1993) Effects of RPE age and culture conditions on support of photoreceptor cell survival in transplanted RCS dystrophic rats. *Exp Eye Res* 57, 753-61.
- Sheng, Y., Gouras, P., Cao, H., Berglin, L., Kjeldbye, H., Lopez, R. and Rosskothén, H. (1995) Patch transplants of human fetal retinal pigment epithelium in rabbit and monkey retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 36, 381-90.

- Silverman, M. S. and Hughes, S. E. (1989) Transplantation of photoreceptors to light-damaged retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 30, 1684-1690.
- Silverman, M. S., Hughes, S. E., Valentino, T. and Liu, Y. (1992) Photoreceptor transplantation: Anatomic, electrophysiologic, and behavioral evidence for the functional reconstruction of retinas lacking photoreceptors. *Exp. Neurol.* 115, 87-94.
- Silverman, M. S., Hughes, S. E., Valentino, T. L. and Liu, Y. (1991) Photoreceptor transplantation to dystrophic retina. In: *Retinal Degenerations*, pp. 321-335.
- Eds. R. E. Anderson, J. G. Hollyfield and M. M. LaVail. CRC Press: Boca Raton, Fl. Silverman, M. S., Ogilvie, J. M., Lett, J., Fang, H. J., Wu, M., Wang, X. and Landgraf, M. (1994) Photoreceptor transplantation: potential for recovery of visual function. In: *Retina, Aging and Transplantation. Proceedings of "Seminaires Ophthalmologiques IPSEN"*, pp. 43-59.
- Eds. Y. Christen, M. Doly and M. T. Droy-Lefaix. Elsevier: Paris. Streilein, J. W., Okamoto, S., Sano, Y. and Taylor, A. W. (2000) Neural control of ocular immune privilege. *Ann N Y Acad Sci* 917, 297-306.
- Thumann, G., Aisenbrey, S., Schraermeyer, U., Lafaut, B., Esser, P., Walter, P. and Bartz-Schmidt, K. U. (2000) Transplantation of autologous iris pigment epithelium after removal of choroidal neovascular membranes. *Arch Ophthalmol* 118, 1350-5.
- Turner, J. E. and Blair, J. R. (1986) Newborn rat retinal cells transplanted into a retinal lesion site in adult host eyes. *Dev. Brain. Res.* 26, 91-104.
- van Soest, S., Westerveld, A., de Jong, P. T., Bleeker-Wagemakers, E. M. and Bergen, A. A. (1999) Retinitis pigmentosa: defined from a molecular point of view. *Surv Ophthalmol* 43, 321-34.
- Wenkel, H. and Streilein, J. W. (2000) Evidence that retinal pigment epithelium functions as an immune-privileged tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 3467-73.
- Wenning, G. K., Odin, P., Morrish, P., Rehncrona, S., Widner, H., Brundin, P., Rothwell, J. C., Brown, R., Gustavii, B., Hagell, P., Jahanshahi, M., Sawle, G., Bjorklund, A., Brooks, D. J., Marsden, C. D., Quinn, N. P. and Lindvall, O. (1997) Short- and long-term survival and function of unilateral intrastriatal dopaminergic grafts in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 42, 95-107.
- Woch, G., Aramant, R., Seiler, M., Sagdullaev, B. and McCall, M. (2001) Retinal transplants restore visually evoked responses in rats with photoreceptor degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 1669-76.