(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 732 561**

(51) Int. CI.:

A61K 35/39 (2015.01)
A61K 49/00 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2008 E 12000170 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 2441462**

(54) Título: **Procedimientos de tratamiento de la diabetes tipo I**

(30) Prioridad:

31.08.2007 US 969437 P
19.11.2007 US 989038 P
04.04.2008 US 42482 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.11.2019

(73) Titular/es:

BIOCRINE AB (100.0%)
John Erikssonsgatan 9
Stockholm 112 22, SE

(72) Inventor/es:

BERGGREN, PER OLOF y
CAICEDO, ALEJANDRO

(74) Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimientos de tratamiento de la diabetes tipo I.

Antecedentes de la invención

El conocimiento fundamental de los procesos celulares en la salud y la enfermedad se ha obtenido estudiando las células de varios tejidos *in vitro*. Sin embargo, los resultados obtenidos a partir de los experimentos *in vitro* no son suficientes, a menudo, para explicar el funcionamiento de las células en más configuraciones fisiológicas como los órganos enteros o los organismos vivientes. Para situar las observaciones llevadas a cabo en un sistema *in vitro*, en un contacto fisiológico los estudios tienen que llevarse a cabo bajo condiciones *in vivo*. Recientemente, se han realizado un número creciente de aproximaciones para investigar la función celular *in situ*, empleando técnicas de imagen. Desafortunadamente, a las técnicas no invasivas de imagen, como la tomografía computacional (CT), la imagen mediante resonancia magnética (MRI), la tomografía de emisión de positrones (PET) o la imagen bioluminiscente (BLI), les falta resolución celular. Por otra parte, la microscopía confocal y la de cribado láser bifotónico mediante láser (LSM), proporcionan una resolución subcelular pero muestran una distancia de actuación y una profundidad de imagen bastante limitada. El acceso de las células diana para la aplicación de LSM es más invasivo y a menudo excluye la posibilidad de exámenes repetidos.

Se divulga el trasplante de un páncreas embrionario dentro de la cámara anterior del ojo con el fin de tratar la diabetes tipo I en ratas en Arbuzova *et al*. (1991) Problemy Endocrinology, 37:1, pp. 42-44; en Kulikov *et al*. (1998) Membrane Cell Biology 11:6, pp. 737-742; y en Trubetskaia *et al*. (1994) IZV Akad Nauk Ser Biol, 1, pp. 152-155. El trasplante de la parte de cola del páncreas embrionario dentro de la cámara anterior del ojo con el fin de tratar la diabetes tipo I en ratas es divulgado por Thomson Scientific en septiembre de 1998 (ISSN 0375-9660).

Sumario de la invención

La presente solicitud prevé un islote pancreático aislado o unas células de los islotes pancreáticos aislados para su utilización en el tratamiento de un individuo con un tipo de diabetes por trasplante en la cámara anterior del ojo.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Islotes pancreáticos trasplantados a la cámara anterior ocular.

(a) Trasplantar islotes a la cámara anterior ocular.

(b) Establecer la formación de imágenes no invasivas *in vivo*.

(c) Fotografía digital de los islotes injertados en el iris en la cámara ocular anterior

(d-g) Cortes oculares que contienen injertos de islotes que muestran células β inmunorreactivas a la insulina (en rojo) y células β glucagoinmunorreactivas (en verde) en puntos temporales distintos después del trasplante.

(h) Proporción de insulina a las células inmunorreactivas al glucagón en los islotes pancreáticos y en la cámara anterior ocular, en los tiempos indicados después del trasplante. (i) Niveles plasmáticos de glucosa durante un ensayo intraperitoneal de tolerancia a la glucosa en ratones tratados con estreptozotocina trasplantados con islotes en los ojos (n = 8, negro) y por debajo de la cápsula renal (n = 2, rojo).

Figura 2: Imagen no invasiva del injerto de los islotes y vascularización. Imágenes de un injerto individual de islotes RIP-GFP 4 meses después del trasplante de un corte óptico capturado a una profundidad de 51 µm. (a) Fluorescencia de células β GFP (verde), (b) fluorescencia Rojo Texas, inyectada intravenosamente (rojo) y (c-d) proyección 2D de un montón de imágenes correspondientes a un grosor de 100 µm. Proyecciones (e-p) de las imágenes (grosor de 110 µm) de un injerto individual de los islotes RIP-GFP en los días 3, 7, 14 y 28 después del trasplante. La fluorescencia GFP de las células β (e, h, k, n) y la fluorescencia Rojo Texas en los vasos sanguíneos (f, i, l, o) se muestran separadamente y como una capa (g, j, m, p). Barras escalares, 100 µm. (q-r) Cuantificación de los resultados mostrados en (e-p). El número de injertos de los islotes analizados se indica entre paréntesis en los tiempos respectivos.

Figura 3: Imágenes *in vivo* de la función de las células β (a-e). Imágenes de la fluorescencia de Fluo-4 y Fura-Red en los tiempos indicados después de la aplicación sistémica de glibenclamida (1 mg/kg) a los 3 minutos. (f) Cambio proporcional del marco total Fluo 4/Fura-Red en respuesta a un estímulo dado de glibenclamida, indicándose el principio de la estimulación por la flecha (g). Cambio proporcional en las células individuales a través del islote, tal como se indica en el cuadro (a). (h-i) proyecciones máximas de las fluorescencias Fluo-4 (verde) y Fura-Red (rojo) de un islote entero, antes (h) y después de la estimulación con glibenclamida (I). (j-k)

Exhibición proporciométrica de Fluo-4/Fura-Red del islote en el cuadro (h) e (i). Barras escalares, 50 µm.

Figura 4: Imágenes no invasivas *in vivo* de la muerte de las células β. (a-h) Proyecciones de las imágenes de un islote individual RIP-GFP en la cámara anterior ocular. Bajo condiciones normales, (a) fluorescencia de células β GFP, (b) reflejo de las células endocrinas y (c) Marcado de la anexina V-APC indetectable del injerto. (d) Imagen en capa de (a-c) con la imagen de reflejo en azul. Veinticuatro horas después de la inducción de la muerte de las células β, (e) Fluorescencia de las células β (f), reflejo y (G) fluorescencia intensa de la anexina V-APC del injerto de los islotes. (h) Imagen en capa de (e-g) con la imagen del reflejo en azul. (i-j) Imágenes de alta amplificación de un área de injerto de los islotes marcada intensamente con la anexina V-APC después de la inducción de la muerte de las células β (i) fluorescencia de las células β GFP, (j) fluorescencia de la anexina V-APC y (k) capa de (i-j), (l) capa de (k) con la imagen de reflejo (azul). Barras de escalares, 100 µm.

Figura 5: Imagen no invasiva del injerto de los islotes y vascularización. Se muestran proyecciones (a-f) de la imagen (110 µm de grosor) del mismo injerto de los islotes RIP-GFP, tal como se exponen en la figura 2, se muestran a los 2 y 4 meses después del trasplante. La fluorescencia GFP de las células β (a, d) y la fluorescencia Rojo Texas en los vasos sanguíneos (b, e) se muestran separadamente y como una capa (c, f). Barras escalares de, 100 µm.

Descripción detallada de la invención

La cámara anterior del ojo comprende la parte frontal ocular, incluyendo la estructura enfrente del humor vítreo, así como la córnea, iris, cuerpo ciliar y lentes. El trasplante de las células diana a la cámara anterior puede incluir la localización de las células en cualquiera o varios de estos compartimentos anteriores oculares, siempre que las células diana puedan observarse, y las señales fluorescentes de las células puedan visualizarse de forma no invasiva. En un ejemplo no limitativo, las células diana se trasplantan mediante la vía inyectable a través de la córnea, permitiendo el injerto de las células diana trasplantadas al iris, lo que permite la observación y formación de imágenes a través de la córnea.

Uno o más componentes celulares de interés en las células de prueba trasplantadas, están marcados de modo fluorescente. El marcado puede ser directo (es decir, de interacción covalente) o indirecto (interacción no covalente), pudiéndose marcar las células antes o después del trasplante. El marcaje pre-trasplante puede realizarse mediante cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo pero no limitándose a las técnicas del ADN recombinante, tal como la transfección de las células con un constructo de expresión que expresará un componente celular proteína-marcado. Cualquier proteína fluorescente puede utilizarse, incluyendo pero no limitándose a la proteína verde fluorescente y a todas sus variantes. El marcaje después de trasplante puede ser también por cualquier medio conocido para los expertos en la técnica, incluyendo pero no limitándose a la inyección de manchas fluorescentes de interés y del contacto con os anticuerpos marcados.

La imagen de fluorescencia en la cámara anterior ocular, puede conseguirse mediante cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica, incluyéndose pero no limitándose a la microscopía de cribado láser. En una forma de realización, los procedimientos implican la fluorescencia estimulante de los componentes celulares marcados de interés, mediante la estimulación láser de una longitud (o longitudes) de onda apropiada, para obtener imágenes de fluorescencia de forma no invasiva de los componentes celulares en las células trasplantadas.

En los ejemplos a continuación, se trasplantaron islotes de Langerhans pancreáticos aislados en la cámara anterior ocular. Los islotes de Langerhans están compuestos de varios tipos celulares diferentes, que incluyen células alfa, beta, y delta. Estos conjuntos de células representan el páncreas endocrino y son de la mayor importancia para la homeóstasis de la glucosa. La liberación insuficiente de la insulina a partir de las células β en respuesta a elevados niveles de glucosa sanguínea, conduce a la diabetes. La regulación de la secreción insulínica inducida por la glucosa, a partir de las células beta, es un complejo proceso, modulado por factores autocrinos, paracrinos, hormonales y neuronales. Por tanto, son necesarios estudios en islotes de Langerhans vascularizados e inervados, para entender los mecanismos que llevan a la secreción hormonal en estado saludable y en la enfermedad. Sin embargo, debido a la distribución dispersa de los islotes de Langerhans a través del páncreas exocrino y a la anatomía del páncreas del roedor en particular, no son habitualmente viables los estudios *in vivo* longitudinales invasivos de los islotes de Langerhans con una resolución unicelular.

A continuación, se muestra que después del trasplante en la cámara anterior del ojo, los islotes aislados se injertaron disponiblemente. Los ratones diabéticos pudieron transformarse en normoglicémicos trasplantando islotes de Langerhans a la cámara anterior del ojo, mostrando estos ratones respuestas idénticas a las pruebas de tolerancia a la glucosa, comparados con los ratones de control. Fue posible monitorizar longitudinalmente la morfología de los islotes y seguir los procesos de revascularización. Asimismo, se pudo medir de modo repetitivo los cambios inducidos sistémicamente en la concentración de Ca^{2+} citoplásmico libre en las células beta del mismo islote.

Cuando se utiliza la cámara anterior ocular como un sitio de trasplante, las características locales especiales expresadas para optimizar la visualización y hacer que la cámara anterior se convierta en un sitio inmune

privilegiado, se toman en consideración. Las diferencias en la composición del humor acuoso en el interior de la cámara anterior y el plasma sanguíneo, se tienen en cuenta cuando se interpretan observaciones realizadas en la cámara anterior. Sin embargo, nuestros estudios no han mostrado efectos obvios sobre la función del injerto mermal por el entorno normal. Una posible explicación podría ser que la neovascularización inducida conduce a un ajuste del humor acuoso y a la composición plasmática sanguínea. Así, se ha demostrado que la cámara anterior ocular permite estudios de interacciones biológicas complejas en un sistema *in vivo* en la resolución de células individuales. Su forma habitual es extensible posteriormente, y la implementación de proteínas fluorescentes nuevamente desarrolladas, biosensores y animales transgénicos, ayudarán a investigar numerosos parámetros importantes para el desarrollo, función y supervivencia bajo condiciones tanto fisiológicas como patofisiológicas. La presente invención proporciona unos islotes pancreáticos aislados o unas células de los islotes pancreáticos aislados para su utilización en el tratamiento de un individuo con diabetes tipo I mediante el trasplante dentro de la cámara anterior del ojo.

Los inventores han determinado que el trasplante del islote pancreático o de las células de los islotes pancreáticos al ojo no condujo a ninguna complicación importante tal como la pérdida de la visión o una excesiva irritación. De este modo, dado que el ojo proporciona un compartimiento algo inmunoprivilegiado. Se cree que el trasplante de las células que producen insulina al ojo de los pacientes con diabetes tipo I, puede proporcionar la producción necesaria de insulina, mientras permite una dosis disminuida de fármacos inmunosupresores que deban utilizarse, reduciendo los efectos secundarios potencialmente graves de la inmunosupresión. También se cree que el trasplante en el ojo reducirá cualquier período de anoxia durante el trasplante, lo que lleva a un incremento en la supervivencia de las células trasplantadas.

El trasplante en el ojo implica el trasplante en la cámara anterior ocular. La cámara anterior del ojo comprende la porción frontal ocular, e incluye la estructura enfrente del humor vítreo, así como la córnea, iris, cuerpo ciliar y lentes. El trasplante de las células que producen insulina a la cámara anterior ocular puede incluir el emplazamiento de las células en cualquiera o en varios compartimentos de la cámara anterior ocular. En un ejemplo no limitativo, las células se trasplantan a través de inyección en la córnea, lo que permite el injerto de las células en el iris, permitiendo la observación y formación de imágenes a través de la córnea. La insulina que produce islotes beta pancreáticos trasplantados a la cámara anterior ocular e injertadas en el iris, alcanzaron la vascularización, conservaron su composición celular y respondieron a la estimulación. Además, pueden monitorizarse mediante microscopía de cribado láser no invasivo, (LSM), que permitió las imágenes *in vivo* de la vascularización de los islotes, así como de la función de las células beta y de la liberación de insulina. En estas formas de realización, las células que producen insulina o sus componentes, pueden marcarse fluorescentemente, pudiéndose utilizar la imagen de fluorescencia para monitorizar la actividad celular.

La imagen de fluorescencia en la cámara anterior ocular, puede obtenerse mediante cualquier técnica conocida por los expertos en dicha técnica, incluyendo pero no limitándose a la microscopía de cribado láser. En una forma de realización, los procedimientos implican la fluorescencia estimulante de los componentes celulares de interés marcados, mediante estimulación por láser a una o varias longitudes de onda, para obtener no invasivamente las imágenes de fluorescencia de los componentes celulares en las células trasplantadas.

Ejemplo 1

La liberación defectuosa de insulina y por tanto, la homeostasis defectuosa de la glucosa en el organismo, es un distintivo de la diabetes (1). Bajo condiciones fisiológicas, la liberación de insulina a partir de las células β pancreáticas es regulada por las acciones complejas y concertadas de la actividad metabólica celular, la señalización autocrina/paracrina y la entrada continua de hormonas y neurotransmisores (2). Las células β, junto con otros tipos celulares endocrinos, se sitúan en el interior del páncreas endocrino, y los islotes de Langerhans, están densamente vascularizados (3) e inervados abundantemente (4). Por tanto, para entender completamente la complejidad de la transducción señalética de las células β, y de los mecanismos que controlan la liberación de insulina en la salud y en la enfermedad, los estudios necesitan llevarse a cabo en los islotes vascularizados e inervados *in vivo*. Aquí, se introduce una nueva plataforma técnica no invasiva para obtener la imagen fluorescente de los islotes pancreáticos trasplantados a la cámara anterior del ojo murino. Los islotes trasplantados a la cámara anterior ocular, se injertaron en el iris, devinieron vascularizados, conservaron la composición celular y respondieron a la estimulación. La microscopia no invasiva de cribado de láser (LSM) mostró imágenes *in vivo* de la vascularización de los islotes, así como también de la función y muerte de las células β. Los resultados establecieron de este modo la base para las investigaciones *in vivo*, repetitivas y no invasivas de la transducción señalética de las células β, que puede realizarse longitudinalmente bajo condiciones normales y de diabetes.

Materiales y procedimientos

Modelos murinos.

Ratones C57BL6 y Tie2-GFP (de las existentes Tg(TIE2GFP)287Sato/J) se obtuvieron de los Laboratorios Jackson (Bar Harbor, ME). Los ratones RIP-GFP se generaron en unas instalaciones centrales en el Instituto Karolinska y se caracterizaron por una tolerancia mermal a la glucosa y la expresión restringida de GFP de las células β. (Véase

procedimientos) Todos los experimentos fueron aprobados por los comités éticos locales de animales en el Instituto Karolinska y la Universidad de Miami.

Trasplante de los islotes pancreáticos a la cámara anterior del ojo.

Se aislaron los islotes pancreáticos y se cultivaron tal como se describe (25). Se transfirieron de treinta a 300 islotes desde el medio de cultivo a PBS estéril, y se aspiraron en una cánula ocular de 27G conectada a una jeringuilla Hamilton de 1 ml (Hamilton, Reno, NV) a través de un tubo de politeno de 0,4 mm (Portex Limited, Kent, England). Los ratones se anestesiaron utilizando isoflurano (Isoflurano, Abott Scandinavia AB, Solna, Sweden) y 0,1 ml/kg de Temgesic (Schering-Plough, NJ) se inyectó subcutáneamente para aliviar el dolor postoperatorio. Bajo un estereomicroscopio, la córnea se pinchó cerca de la esclerótica en la parte del fondo de ojo con una aguja 27G. Se tuvo mucho cuidado en no dañar al iris y en evitar el sangrado. A continuación, la cánula ocular redondeada se insertó suavemente y los islotes se inyectaron lentamente en la cámara anterior donde se retuvieron en el iris. Después de la inyección, la cánula se retiró cuidadosamente, dejando que el animal reposara lateralmente antes de despertarle. Los ratones se recuperaron rápidamente y no mostraron síntomas de estrés o de irritación del ojo trasplantado.

Imagen intravital de los islotes trasplantados a la cámara anterior del ojo.

Los ratones previamente trasplantados se anestesiaron con una mezcla de oxígeno al 40% y ~2% de isoflurano, colocándose en un lecho de calentamiento. La cabeza del animal se retuvo con un mantenedor cefálico estereotáxico (SG-4N, Narishige, Tokyo, Japan), que se posicionó con el ojo que contenía los islotes cara arriba. El párpado se tiró hacia atrás cuidadosamente, manteniéndolo cuidadosamente en la unión corneoescleral con un par de pinzas unidas a un ensamblaje UST-2 Solid Universal (Narishige). Los extremos de las pinzas, se cubrieron con una pieza única de tubo de politeno que creaba un lazo entre los dos extremos. Esta disposición permitió una fijación flexible pero estable de la cabeza y del ojo sin provocar daño, o que se interrumpiera la circulación de la sangre ocular. Un microscopio Leica DMLFSA vertical, equipado con un escáner conforal TCS-SP2-AOBS, y láseres para una excitación 25, bifotónica, se utilizó para obtener la imagen junto con lentes de inmersión acuosa de larga distancia (Leica HXC APO 10x 0,3W, 20x 0,5 W, 40x 0,8 W), utilizando una solución salina filtrada cómo líquido de inmersión. Para la visualización de los vasos sanguíneos, se inyectó intravenosamente a través de la vena de la cola Rojo Texas (100 µl de 10 mg/ml; Molecular Probes, Eugene, OR). GFP y Rojo Texas se excitaron a 890 nm y la luz emitida se recuperó y separó en dos detectores no descaneados utilizando un espejo dicrónico (RSP560) y los filtros de emisión (BP 525/50 y BP 640/20). Las imágenes capturadas con TPLSM redujo el nivel de ruido utilizando un filtro de ondas, tal como se ha descrito previamente (27). Para la visualización de la muerte celular, 100 µl de anexina V-APC (Molecular Probes) se inyectaron intravenosamente mediante la vena de la cola. GFP se excitó a 488 nm (35% AOTF) y se recogió la luz emitida entre 495-530 nm. La luz reflejada se convirtió en imágenes mediante iluminación a 546 nm (35% AOTF) y la recogida de la luz se realizó entre 539-547 nm. APC se excitó a 633 nm (75% AOTF), con recogida de la luz emitida entre 644-680 nm. Los estudios iniciales mostraron un débil marcado de la anexina V-APC de los injertos RIPGFP de los islotes ~40 minutos después de la administración con un incremento gradual. Las imágenes de los injertos de los islotes se obtuvieron 4-6 horas después de la administración de anexina V-APC. Los montones de las imágenes capturadas con CLSM se redujo el nivel del ruido utilizando filtros medianos. Todas las imágenes de fluorescencia mostradas se sometieron a cambios en el brillo y contraste para una visualización óptima.

Generación de los ratones RIP-GFP.

Los ratones RIP-GFP se generaron mediante inyecciones del casete de expresión RIP1.EGFP (promotor de la insulina-1 de la rata –410/+1bp-EGFPSV40polyA) en un estadio unicelular embrional a partir de donadores B6CBAF1/Crl. La generación F0 obtenida se evaluó en cuanto a la integración genómica de RIP1-EGFP mediante análisis PCR. El transgen RIP1-EGFP se observó en siete fundadores transgénicos potenciales (17,5%), que se cruzaron con ratones innatos C57Bl/6NCrl para generar animales F1. Las progenies fundadoras se analizaron con respecto a 1) la expresión de GFP en las células β determinada por inmunotinción, y 2) fisiología animal y celular. La progenie fundadora RIP1-EGFP #29 se encontró que tenía una tolerancia normal a la glucosa, cuando se comparó con los animales control y la expresión restringida de GFP de las células β, seleccionándose para el cultivo homocigótico.

Inmunohistoquímica.

Se sacrificaron ratones exponiéndolos a una concentración creciente de CO_2, seguido por dislocación cervical, después de 3, 7, 14 y 28 días subsiguientes al trasplante intraocular de los islotes (n = 12). Los ojos que transportaban los injertos se extrajeron y se fijaron posteriormente durante 1 hora en paraformaldehído al 4%. Después de crioprotección mediante sustitución por sacarosa (10%, 20% y 30% en PBS), se realizaron cortes verticales oculares en un criostato (14 µm). Se lavaron los cortes en PBS (3 x 10 min), y se incubaron en PBS que contenía albúmina sérica bovina al 5% y triton al 0,1% (1 hora). Entonces, los cortes se incubaron por la noche en PBS con anti-insulina (1:500, Accurate Chemical & Scientific Corp., NY) y anti-glucagón (1:5.000; Sigma, St. Louis MO). El inmunoteñido se visualizó utilizando los anticuerpos secundarios conjugados Alexa 488 o Alexa 568 (1:500;

Molecular Probes). Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI (Molecular Probes). Los cortes histológicos se montaron con Vectamount y cubreobjetos. Cortes seriados cruzados de los ojos que contenían islotes se examinaron en cuanto a la presencia de insulina y glucagón con un microscopio Axiophot de fluorescencia (Zeiss, Oberkochen; Germany) y un microscopio conforal de cribado por láser, de dos canales (Olympus Fluoview, Olympus America Inc., Melville, NY). Todas las imágenes de inmunoteñido se adquirieron digitalmente, volviéndose a compilar (Photoshop 5.0; Adobe, San Jose, CA). Los cortes se visualizaron con un aumento del 10x y 40x. Los análisis se realizaron sobre imágenes microscópicas digitalizadas de fluorescencia utilizando un programa Zeiss Axiovision. Los parámetros medidos (por ejemplo, la proporción células inmunorreactivas a la insulina/células inmunorreactivas al glucagón), se calcularon como el promedio de, por lo menos, tres cortes adyacentes de por lo menos dos islotes separados por ojo. Los resultados de los tres ojos, se promediaron. Sólo las células que mostraban un núcleo claramente marcado (tinción DAPI), se incluyeron en los análisis. Los datos se presentan como promedio ± SEM.

Cuantificación de la vasculatura del injerto vascular.

La densidad de los vasos se determinó como el número de segmentos vasculares por área del injerto. Un segmento vascular se definió como un vaso único o una ramificación de un vaso. La fluorescencia de las células β GFP se utilizó para definir el área del injerto. Se cuantificaron dos cortes ópticos a partir de cada injerto de los islotes. Se seleccionaron los cortes ópticos a partir de las series de imágenes de los z-montones. El primer corte se seleccionó en el nivel más profundo en el injerto, sin pérdida de señal. El segundo cortes se seleccionó en el medio del injerto, entre la superficie y el corte más profundo. Las imágenes para la cuantificación se capturaron utilizando lentes 10x o 20x y un factor de acercamiento de 2,0 o superior. Los datos se presentan como promedio ± SEM. La cuantificación de la vasculatura se llevó a cabo con el programa Leica Confocal (versión 2.61).

Grabación *in vivo* de cambios de $[Ca^{2+}]i$.

Para evaluar la función de las células β *in vivo*, los islotes trasplantados a la cámara anterior del ojo, se cargaron con una mezcla de los indicadores Fluo-4 y Fura-Red de Ca^{2+}. La aplicación de estos dos colorantes simultáneamente permite mediciones ratiométricas $[Ca^{2+}]i$ con espectros de excitación en las longitudes de onda visibles (29). Para conseguir la carga, la cámara anterior se perfundió con una solución extracelular formada por (en mM) 140 NaCl, 5 KCl, 2 NaHCO3, 1 NaH2PO4, 1,2 MgCl2, 2,5 CaCl2, 10 HEPES, 3 glucosa (pH 7,4 con KOH), que contenía 500 µM de cada éster AM de Fluo-4 y Fura-Red. Para la fusión, los ratones se anestesiaron con 10 ml/kg de una mezcla de 1 parte de Hypnorm (0,315 mg/ml de fentanil y 10 mg/ml de fluanisona VetaPharma, Leeds, UK), 1 parte de Dormicum (5 mg/ml, Roche, Basel Suiza) y 2 partes de agua estéril. Para prolongar la anestesia, se administraron inyecciones subsiguientes de la mezcla (4 ml/kg) cada 30-40 minutos. Los ratones se dispusieron en la configuración del microscopio tal como se ha descrito anteriormente, controlándose la temperatura corporal mediante una sonda rectal conectada a la unidad de control del lecho de calentamiento. Se apartaron las micropipetas de los capilares cristalinos de borosilicato en una herramienta programable horizontal (DMZ Universal Puller, Zeitz-Instrumente, Augsburg, Alemania), rompiéndose hasta un diámetro exterior de la punta de 60-100 µm. Las puntas adyacentes de la micropipeta se biselaron con un ángulo de 30º, utilizando un esmeril de rueda rotatoria (modelo BV10, Sutter Instruments Co., Novato CA, USA). Se introdujeron las micropipetas en la cámara anterior penetrando la córnea en ángulos superficiales en los lados opuestos del ojo, utilizando dos unidades micromanipuladoras (Eppendorf, Hamburg, Alemania). Se tuvo cuidado en no dañar el iris o los injertos de los islotes. Una micropipeta se unió a un reservorio relleno con solución extracelular mediante un tubo de polietileno. La altura del reservorio se ajustó para asegurar una presión intracameral constante de alrededor de 15 mmHg. La segunda micropipeta se conectó a una jeringuilla de 1 ml. Se controló la velocidad y volumen del flujo entrante mediante una bomba de jeringuilla (Univector). Las células de los islotes se cargaron con indicadores de Ca^{2+} perfundiendo la cámara anterior con una solución extracelular que contenía ésteres de Fluo-4 y Fura-Red durante 40 minutos a razón de 3 µl/min. Subsecuentemente, la solución que contenía colorante se lavó mediante perfusión con una solución extracelular durante 10 minutos entre 5-6 µl/min. La obtención de las imágenes se llevó a cabo tal como se describió anteriormente, excitando Fluo-4 y Fura-Red con 488 nm (25% AOTF) y recogiendo la luz emitida para Fluo-4 entre 495-535 nm y para Fura-Red entre 600-700 nm. La estimulación sistémica de la liberación de insulina se alcanzó mediante inyección intravenosa de glibenclamida (1 mg/kg) mediante la vena de la cola. Después de terminar la formación de imágenes, los ratones se inyectaron subcutáneamente con 0,1 ml/kg de Temgesic (Schering-Plough, NJ), para aliviar el dolor postoperatorio.

Resultados

Los islotes pancreáticos son difícilmente accesibles para la monitorización *in vivo*, debido a que están profundamente embebidos y dispersos en el tejido exocrino del páncreas, constituyendo el 1-2% del volumen 5 pancreático. Como consecuencia, la mayoría de los estudios funcionales actuales de las células β se llevan a cabo *in vitro* en islotes/células aislados. Los islotes aislados (6) y especialmente las rodajas pancreáticas (7) permiten estudios funcionales de células β en un entorno multicelular. Sin embargo, estas preparaciones se restringen a terminales definidos y les falta parcialmente la entrada de las conexiones nerviosas y vasculares. Existe la necesidad inmediata de monitorizar la función de las células β *in vivo* para entender las complejas redes de señalización implicadas en la regulación de la liberación de insulina bajo condiciones normales, y porque éstas no

funcionan apropiadamente en la diabetes tipo 2. Este es también el caso en el contexto del trasplante clínico de los islotes, que está emergiendo como una terapia para la diabetes tipo 1 (8). Hasta la fecha, no ha sido posible la monitorización de la transducción señalética de las células β, después del trasplante experimental y clínico de los islotes, que ha sido gravemente dificultado tanto por la caracterización de la función del injerto como de la evaluación de nuevas intervenciones (9). LSM se ha aplicado satisfactoriamente para la formación de imágenes de múltiples vías señaléticas en las células β, utilizando islotes aislados y preparaciones celulares (6, 10). Sin embargo, no se han notificado aplicaciones intravitales de LSM para estudios de la fisiología de las células β.

Después del trasplante de los islotes, éstos reclutan una nueva vasculatura (11), así como conexiones nerviosas (12), y pueden mantener la homeostasis de la glucosa mediante la liberación pulsátil de la insulina (12, 13). Se decidió trasplantar los islotes pancreáticos a la cámara anterior ocular, a causa de que la córnea actúa como una ventana natural del organismo que permite la imagen no invasiva del tejido injertado. La cámara anterior del ojo se ha utilizado preferentemente como un sitio de trasplante para estudiar diversos tejidos que incluyen al páncreas, porque es inmunoprivilegiada (14-17). Los islotes murinos se trasplantaron a la cámara anterior del ojo mediante inyección a través de la córnea (figura 1a). Después del trasplante, los islotes se injertaron en el iris y se observaron de forma disponible y se formó su imagen a través de la córnea (figura 1b-c). Los islotes trasplantados se injertaron como islotes únicos o en grupos, como grupos de islotes. La tinción inmunohistoquímica de los islotes injertados mostró que la proporción de las células β que contenían insulina y de las que contenían glucagón no cambió después del trasplante, y que esta proporción era similar a la de los islotes en el páncreas (figura 1d-h), que está de acuerdo con estudios anteriores (14, 16, 17).

En ratones que se volvieron diabéticos con estreptozotocina, los islotes que se trasplantaron a la cámara anterior invirtieron la hiperglicemia. Estos ratones mostraron además respuestas fisiológicas a la sobrecarga de la glucosa (figura 1i), demostrando que los islotes injertados en la cámara anterior del ojo, son funcionales. Para permitir la identificación de las células β, los islotes aislados de los ratones transgénicos que expresan la proteína verde fluorescente potenciada (GFP) bajo el control del promotor de la insulina 1 de rata (RIP-GFP), se trasplantaron a la cámara anterior del ojo.

Utilizando LSM bifotónico (TPLSM), se obtuvo simultáneamente las imágenes de las células β mediante GFP y las de la vasculatura, después de la inyección intravenosa de 100 µl de dextrano Texas Red de 70 kDa (Texas Red, 10 mg/ml), y se determinó que los islotes trasplantados reclutaron vasos sanguíneos a partir del iris. Los TPLSM no invasivos, permitieron la captura de los cortes ópticos de distintas profundidades en los islotes injertados (figura 2a, b) y, por tanto, la reconstrucción 3D (en 3 dimensiones) de tanto la morfología de las células β como la vascular en el interior de los injertos de los islotes (figura 2c-d). Para monitorizar la dinámica del injerto de los islotes y de la vascularización, se obtuvieron repetidamente en los días 3, 7, 14 y 28 después del trasplante (figura 2e-p), los mismos islotes RIP-GFP. En el día 3, los islotes trasplantados se unieron al iris, observándose reajustes estructurales de los vasos del iris en la vecindad de los islotes. Sin embargo se encontró que sólo pocos vasos crecieron en las regiones periféricas de los islotes (figura 2e-g). En el día 7, los injertos de los islotes aparecieron más delgados pero más anchos comparándolos con el día 3, indicando que los islotes se habían unido más y se habían extendido al iris. Se encontró un aumento en el número de vasos sanguíneos en los islotes, encontrándose lazos capilares que empezaban a penetrar en las regiones de los islotes centrales (figura 2h-j). Mientras que, después del día 7, sólo tuvieron lugar cambios adicionales menores en la estructura de los islotes, los vasos sanguíneos continuaron creciendo, y, en el día 14, formaron una red microvascular a través de los injertos de los islotes (figura 2k-m). Entre los días 14 y 28, la red vascular se volvió más densa, y en el día 28 se caracterizó por capilares muy tortuosos y de tamaño uniforme (figura 2n-p). La densidad vascular de los islotes trasplantados aumentó continuamente durante la revascularización (figura 2q). El diámetro de los vasos del islote injertado fue de 8,11 ± 0,53 µm en el día 28 (n=5, figura 2r), que es similar a la vasculatura intra islote en el páncreas (18) y en otros sitios de trasplante (19). La obtención de los injertos de los islotes a los dos y cuatro meses después del trasplante, mostró que la morfología de la masa de las células β y la vasculatura del injerto fueron similares comparadas en el día 28 (figura 5). En conclusión, la TPLSM no invasiva permitió a obtención *in vivo* longitudinal de imágenes de células β y de la vasculatura en los islotes injertados en la cámara anterior ocular.

La evaluación de la trasducción de señales *in vivo* a nivel celular permitirá la investigación de células de los islotes desde condiciones tanto fisiológicas como patofisiológicas, que incluyen influencias reguladoras y moduladoras de señales paracrinas, hormonales y neuronales. Para monitorizar la función celular *in vivo*, se estudiaron cambios en la concentración de calcio libre citoplásmico ($[Ca^{2+}]i$) en los islotes a nivel de la célula única en la cámara anterior del ojo. Los cambios en $[Ca^{2+}]i$ constituyen señales clave intracelulares en las células de los islotes y sirven como un informador de la función 2 de las células β. Se cargaron islotes con los indicadores Fluo-4 y Fura-Red de Ca^{2+}, a través de la perfusión de la cámara anterior del ojo, con micropipetas. Aplicando estos dos colorantes simultáneamente se permitieron las mediciones ratiométricas de los cambios de $[Ca^{2+}]i$ con LSM y la corrección para los movimientos de los islotes durante la obtención de las imágenes. Fluo-4 y Fura-Red marcaron la capa más externa de los islotes de forma homogénica (figura 3h-i). Para estimular las células, se aplicó intravenosamente el compuesto sulfonilurea de glibenclamida. Éste disminuyó los niveles de glucosa sanguínea, indicando que la administración era efectiva (datos que no se muestran). Los aumentos en el $[Ca^{2+}]i$. en las células de los islotes, tal como se demuestra por aumentos prominentes en la relación Fluo-4/Fura-Red de fluorescencia empezaron dentro de los 30 a 40 segundos después de la inyección de glibenclamida en la vena de la cola de los

ratones, y permanecieron altos durante la grabación (figura 3f). [Ca^{2+}]i aumentó simultáneamente en distintas regiones de los islotes, reflejando una respuesta sincronizada de las células β en el interior de un islote después de estimulación 20 (figura 3g). Estos resultados demuestran que es viable obtener imágenes de la función celular *in vivo* utilizando islotes injertados en la cámara anterior ocular.

La muerte de las células β es una característica del tipo 1 de diabetes (21) y está implicado en la patología de la diabetes tipo 2 (22). Hasta la fecha, no existen procedimientos para la monitorización continua de la muerte de las células β *in vivo*. La anexina V se ha utilizado como un informador de la muerte celular, tanto en condiciones experimentales como clínicas (23), y se ha validado como un marcador para la apoptosis de las células β después de la administración sistémica (24). Para investigar la viabilidad de la formación de imágenes no invasiva de la muerte de las células β, se trasplantaron islotes RIP-GFP a la cámara anterior ocular y, después de un completo injerto y revascularización, se monitorizó la muerte celular después de la administración intravenosa de la anexina V conjugada a la aloficocianina (APC). Utilizando LSM confocal, las fluorescencias GFP y la anexina V-APC se capturaron simultáneamente con luz reflejada, por lo que esta última proporciona información estructural detallada de las células endocrinas (25). Los islotes RIP-GFP trasplantados cuyas imágenes se obtuvieron en ratones con niveles regulares de glucosa sanguínea, mostraron morfología normal (figura 4a-b) y ausencia del marcado de anexina V-APC (figura 4c-d). Se encontró que la anexina VAPC marcaba sólo unas escasas células en 1, fuera de 10 injertos de los islotes RIP-GFP (datos no mostrados), indicando una baja incidencia de la muerte celular en los islotes injertados en la cámara anterior ocular. Se indujo la muerte de las células β en ratones trasplantados con islotes RIP-GFP mediante la administración intravenosa de aloxan (75 mg/kg) un compuesto diabetogénico bien caracterizado que es absorbido por las células β mediante el transportador 2 de la glucosa sanguínea (26). Este tratamiento volvió hiperglicémicos a los ratones con una concentración de glucosa sanguínea de 25,0 ± 1,3 mmol/l (n=6) después de 24 h. En este momento, se observaron una pérdida sustancial de fluorescencia GFP y cambios estructurales en el reflejo de los injertos de los islotes (figura 4e-f), indicando pérdida de las células β. La administración de anexina V-APC (n=4) 24 horas después de la inducción de la muerte celular dio lugar a una marcación intensa de los injertos de los islotes (figura 4gh). La formación de imágenes de alta amplificación reveló que el marcaje más importante de la anexina V-APC se encontró en las regiones injertadas desprovistas de fluorescencia GFP. Se encontró alguna fluorescencia de la anexina V-APC en la superficie de las células β GFP-fluorescentes, indicando el marcaje de las células que experimentaban apoptosis (figura 4i-l). Se concluyó que la imagen de la muerte de las células β puede obtenerse no invasivamente y longitudinalmente bajo condiciones *in vivo* en los islotes injertados en la cámara anterior ocular.

Sumario

Se ha presentado ahora una nueva plataforma para estudios no invasivos de células de los islotes, tanto fisiológica como patofisiológicamente *in vivo*. Utilizando la cámara anterior del ojo como un modelo *in vivo* para la investigación de las células de los islotes, se permite la monitorización continua de la morfología, vascularización, inervación, muerte celular y señalización celular. La utilización de esta plataforma para estudiar la transducción señalética de las células de los islotes, *in vivo*, ayudará a dilucidar los efectos de impulsos modulatorios de entrada a partir del sistema hormonal y neuronal, así como de señales autocrinas/paracrinas de las células endocrinas o vasculares. Además, servirá como un nuevo enfoque para los estudios *in vivo* no invasivos de la función de las células β y de la supervivencia en sanos y diabéticos.

Referencias para el Ejemplo 1

1. Wajchenberg, B. L. Beta-Cell Failure in Diabetes and Preservation by Clinical Treatment. Endocr Rev (2007).

2. Berggren, P. O. & Leibiger, I. B. Novel aspects on signal-transduction in the pancreatic beta-cell. Nutr Metab Cardiovasc Dis 16 Suppl 1, S7-10 (2006).

3. Vetterlein, F., Petho, A. & Schmidt, G. Morphometric investigation of the microvascular system of pancreatic exocrine and endocrine tissue in the rat. Microvasc Res 34, 231-8 (1987).

4. Woods, S. C. & Porte, D., Jr. Neural control of the endocrine pancreas. Physiol Rev 54, 596-619 (1974).

5. Rahier, J., Goebbels, R. M. & Henquin, J. C. Cellular composition of the human diabetic pancreas. Diabetologia 24, 366-71 (1983).

6. Köhler, M. *et al*. Imaging of Pancreatic Beta-Cell Signal-Transduction. Curr.Med.Chem.-Immun., Endoc.& Metab. Agents 4, 281-299 (2004).

7. Speier, S. & Rupnik, M. A novel approach to in situ characterization of pancreatic beta-cells. Pflugers Arch 446, 553-8 (2003).

8. Shapiro, A. M. *et al*. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. N Engl J Med 343. 230-8 (2000).

9. Paty, B. W., Bonner-Weir, S., Laughlin, M. R., McEwan, A. J. & Shapiro, A. M. Toward development of imaging modalities for islets after transplantation: insights from the National Institutes of Health Workshop on Beta Cell Imaging. Transplantation 77, 1133-7 (2004).

10. Philipson, L. H. & Roe, M. W. Imaging. Curr. Med Chem. -Immun., Endoc.& Metab. Agents 4, 333-337 (2004).

11. Menger, M. D., Yamauchi, J. & Vollmar, B. Revascularization and microcirculation of freely grafted islets of Langerhans. World J Surg 25, 509-15 (2001).

12. Porksen, N. *et al*. Coordinate pulsatile insulin secretion by chronic intraportally transplanted islets in the isolated perfused rat liver. J Clin Invest 94, 219-27 (1994).

13. Meier, J. J. *et al*. Intrahepatic transplanted islets in humans secrete insulin in a coordinate pulsatile manner directly into the liver. Diabetes 55, 2324-32 (2006).

14. Hultquist, G. T. The ultrastructure of pancreatic tissue from duct-ligated rats implanted into anterior chamber of rat eyes. Ups J Med Sci 77, 8-18 (1972).

15. Niederkorn, J. Y. Immune privilege in the anterior chamber of the eye. Crit Rev Immunol 22, 13-46 (2002).

16. Adeghate, E. & Donath, T. Morphological findings in long-term pancreatic tissue transplants in the anterior eye chamber of rats. Pancreas 5, 298-305 (1990).

17. Adeghate, E., Ponery, A. S., Ahmed, I. & Donath, T. Comparative morphology and biochemistry of pancreatic tissue fragments transplanted into the anterior eye chamber and subcutaneous regions of the rat. Eur J Morphol 39, 257-68 (2001).

18. Vetterlein, F., Petho, A. & Schmidt, G. Distribution of capillary blood flow in rat kidney during postischemic renal failure. Am J Physiol 251, H510-9 (1986).

19. Menger, M. D., Vajkoczy, P., Leiderer, R., Jager, S. & Messmer, K. Influence of experimental hyperglycemia on microvascular blood perfusion of pancreatic islet isografts. J Clin Invest 90, 1361-9 (1992).

20. Valdeolmillos, M., Santos, R. M., Contreras. D., Soria, B. & Rosario, L. M. Glucose-induced oscillations of intracellular Ca^{2+} concentration resembling bursting electrical activity in single mouse islets of Langerhans. FEBS Lett 259, 19-23 (1989).

21. Mathis, D., Vence, L. & Benoist. C. beta-Cell death during progression to diabetes. Nature 414, 792-8 (2001).

22. Butler, A. E. *et al*. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. Diabetes 52, 102-10 (2003).

23. Boersma, H. H. *et al*. Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. J Nucl Med 46, 2035-50 (2005).

24. Medarova, Z., Bonner-Weir, S., Lipes, M. & Moore, A. Imaging beta-cell death with a near-infrared probe. Diabetes 54, 1780-8 (2005).

25. Nyqvist, D., Köhler, M., Wahlstedt, H. & Berggren, P. O. Donor islet endothelial cells participate in formation of functional vessels within pancreatic islet grafts. Diabetes 54, 2287-93 (2005).

26. Szkudelski, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. Physiol Res 50, 537-46 (2001).

27. Köhler, M. *et al*. On-line monitoring of apoptosis in insulin-secreting cells. Diabetes 52, 2943-50 (2003).

28. Lipp, P. & Niggli, E. Ratiometric confocal Ca(2+)-measurements with visible wavelength indicators in isolated cardiac myocytes. Cell Calcium 14, 359-72 (1993).

Ejemplo 2

En este ejemplo, se proporciona un protocolo paso a paso para llevar a cabo estudios *in vivo* longitudinales no invasivos de la biología celular con resolución celular única, tomando ventajosamente a la córnea como una ventana corporal natural. Con este propósito el tejido de interés se trasplanta a la cámara anterior ocular,

evaluándose los parámetros biológicos celulares mediante LSM, a través de la córnea. La cámara anterior ocular se ha utilizado frecuentemente como lugar de trasplante para estudiar diversos tejidos[3-7]. Mientras que, originariamente la cámara anterior ocular se seleccionó como un sitio de trasplante debido a sus propiedades como lugar[8] privilegiado inmune, la mayoría de los estudios utilizaban la cámara anterior en una fijación singeneica del trasplante, a causa de su fácil accesibilidad y de que la córnea permite la observación macroscópica del tejido injertado. Además, el iris, que forma la base de la cámara anterior, posee una de las concentraciones más altas de vasos sanguíneos y de nervios autonómicos del organismo, permitiendo por tanto la rápida inervación[9] y vascularización[10] del injerto. Hasta la fecha, los estudios que utilizaban la cámara anterior como un sitio para trasplante utilizaban principalmente observaciones macroscópicas[5] para investigar la fisiología del injerto. Esto restringe los estudios longitudinales a parámetros observables a baja resolución. La electrofisiología[7] *in vivo*, así como la histología[3] y diversas otras técnicas *in vitro* después de la eliminación del injerto, permiten la evaluación de la morfología y función celular, fijando, sin embargo, un extremo al estudio y por tanto impidiendo la monitorización longitudinal.

MATERIALES

Animales

- Ratones NMRI (Laboratorios Charles River, USA) o (Scanbur, Suecia)
- Ratones Tie2-GFP [existencias Tg(TIE2GFP)287Sato/J] (Laboratorio Jackson, USA).
- Ratones transgénicos con informadores fluorescentes que se expresan en células beta pancreáticas bajo el promotor de la insulina (RIP-GFP)[11].

Reactivos

- Solución salina estéril tamponada de fosfato (PBS).
- Usoflurano (Isoflurane, Abott/Baxter, USA).
- 40% O_2 en 60% N_2 (AGA, Suecia).
- Butrenorfina (Temgesic, Schering-Plough, USA).
- Viscotears® (Novartis, Suiza).
- Alloxan (Sigma, USA).
- Dextrano Texas Red de 70 kDa (Invitrogen, USA).
- Anexina V APC (Invitrogen, USA).
- Hypnorm® (VetaPharm, UK).
- Dormicum® (Roche, Suiza).
- Agua estéril inyección (Braun, Alemania).
- Fluo-4 AM Empaquetamiento especial (Invitrogen, USA).
- Fura-Red AM Empaquetamiento especial (Invitrogen, USA).
- Pluronic® F-127 (Invitrogen, USA).
- Glibenclamida (Sigma, USA).
- Solución extracelular.

Disposición de los reactivos

Solución extracelular (en mM): 140 NaCl, 5 KCl, 2 $NaHCO_3$, 1 NaH_3PO_4, 1,2 $MgCl_2$, 2,5 $CaCl_2$, 10 HEPES, 3 glucosa (pH 7,4 con NaOH).

Equipamiento

- Aguja 27 G x ¾" (BD, USA).
- Cánula redondeada 27 G, hecha de una aguja 27G.
- Jeringa #1750 (Hamilton, USA) hermética a los gases, de 0,5 ml, de émbolo roscado.
- Tubo politeno con un diámetro interior de 0,4 mm (i.d.), diámetro externo de 0,8 mm (o.d.) (Smiths Medical, UK).
- Tubo politeno (0,2 mm i.d., 0,8 mm o.d.).
- Tubo politeno (0,9 mm i.d., 1,2 mm o.d.).

- Tubo Tygon 0,76 mm i.d., 0,86 mm grosor pared (Ismatec, Suiza).
- Jeringas de plástico 1,5 y 10 ml (BD, USA).
- Tubos reactivos de 50 ml (Eppendorf, Alemania).
- 400 unidad anestesia (Univentor, Malta).
- Microjeringa MS-GLLX00 10 ml (Hamilton, USA).
- Estereomicroscopio (MZ FLII (Leica, Alemania).
- Adaptador para sujetar la cabeza (SG-4N, Narishige, Japón).
- Pieza de ensamblaje universal sólida UST-2 (Narishige, Japón).
- Fórceps Dumont # 5 (Fine Science Tools, USA).
- Lecho de calentamiento fabricado a medida.
- Microscopio vertical DMLFSA, equipado con un escáner confocal TCS-SP2-AOBS (Leica, Alemania).
- Láser Ti:sapphire Tsunami (Spectra-Physics, USA).
- Objetivos 2,5x y 5x (Leica, Alemania).
- Lentes de inmersión acuosa de larga distancia (Leica HXC APO 10x 0,3W, 20x 0,5 W, 40x 0,8W.
- Micromanipulador 5171 (2) (Eppendorf, Alemania).
- Sostenedor capilar universal (2) (Eppendorf, Alemania).
- Cabeza de agarre capilar (Eppendorf, Alemania).
- Capilares de vidrio borosilicato de pared delgada, sin filamento TW120-4 (WPI, USA).
- Tirador universal DMZ (Zeitz Instrumente, Alemania).
- Bomba de jeringa 802 (Univentor, Malta).
- Programa conforal Leica (versión 2,61) (Leica, Alemania).
- Volocity (Improvision, UK).
- Matlab (The MathWorks, USA).Algoritmo de filtración de onda[14] (Stockholm, Suecia).

INSTALACIÓN DEL EQUIPO

Instalación Bifotónica y confocal

Para LSM, se utilizó un escáner de láser confocal Leica TCS-SP2-AOBS, equipado con argón y láseres HeNe conectados a un microscopio Leica DMLFSA. Se alcanzó una excitación bifotónica utilizando un láser Ti:Sapphire (Tsunami; Spectra-Physics, USA) para una excitación de ~100 fs, a ~82 MHz. El microscopio se está diseñando para la utilización de un adaptador que mantenga la cabeza y al ratón.

Adaptador cefálico de mantenimiento

Para fijar la cabeza del ratón con objeto de llevar a cabo cirugía y obtener imágenes, se utilizó un adaptador cefálico de mantenimiento SG-4N-S, fabricado por Narishige, Japón. Dependiendo del tipo utilizado de anestesia, el mantenedor cefálico está equipado con una máscara de gas (GM-4-S) o un aditamento para el horno. El mantenedor cefálico se une a una placa metálica que encaja con el diseño del microscopio. La placa metálica está cubierta por un lecho de calentamiento. La temperatura corporal se controla mediante una sonda rectal que regula la temperatura del lecho de calentamiento.

Estabilizador ocular

Para la retracción de los párpados oculares y la estabilización adicional ocular, se utilizó un dispositivo de soporte hecho a medida. Hay que unir un fórceps Dumont # 5 a una pequeña barra metálica y grapar ésta en una pieza de ensamblaje universal sólida UST-2. Hay que fijar esta pieza de ensamblaje a la misma placa metálica que el sostenedor cefálico a nivel con el ojo, de modo que se pueda alcanzar los ojos con los extremos de los fórceps. Se deben cubrir éstos con una pieza de tubo de polietileno, creando un bucle entre los extremos. En la parte frontal de los fórceps, se une un tornillo para permitir el ajuste de la distancia entre las puntas de los fórceps.

Perfusión de la cámara anterior

Flujo externo: Conectar una pieza de ~35 cm aproximadamente de tubo de politeno, 0,9 mm i.d. y 1,2 mm o.d. con un extremo en un mantenedor capilar, y conéctese el otro extremo del tubo a una jeringa de 10 ml sin un tapón (reservorio abierto).

Flujo interno: Conectar una pieza de ~35 cm aproximadamente de tubo Tygon, de 0,76 mm i.d. y 0,86 mm de grosor de pared, con un extremo en un mantenedor capilar y conectar el otro extremo del tubo a una jeringa de 1 ml.

Procesamiento de la imagen

Para disminuir el sonido las imágenes capturadas con LSM confocal y TPLSM, utilícese un filtro[15] de onda. Para el análisis y exhibición de la imagen obtenida. Utilícese un programa de procesamiento, por ejemplo, el confocal de Volocity and Leica.

Procedimiento ejemplificativo no limitativo

Trasplante de islotes pancreáticos a la cámara anterior ocular

1. Procedimiento para tratar un individuo con diabetes tipo I, que comprende trasplantar en el ojo de un individuo con diabetes tipo I una cantidad eficaz de célula productora de insulina para favorecer la producción de insulina en el individuo.

   Cultivar opcionalmente los islotes, dependiendo de los parámetros del estudio.

2. Conectar aproximadamente 10 cm de un tubo de politeno 0,4 mm i.d., con una aguja 27 G a la jeringa Hamilton de 0,5 ml e insertar la cánula 27 G redondeada en el otro extremo del tubo.

3. Transferir 30-40 islotes del medio de cultivo a un disco con PBS estéril y céntrense los islotes, tan compacto como posible en el medio del disco.

4. Aspirar los islotes en la cánula 27 G de extremo redondeado y en el tubo de politeno conectado. Los islotes se aspiran preferentemente en un volumen mínimo (por ejemplo, 20 µl o menos), para facilitar la inyección en la cámara anterior.

   La aspiración de los islotes en un volumen demasiado grande, puede llevar a dificultades durante el proceso de inyección, exponiendo el ojo a una presión intraocular innecesariamente alta, pudiendo provocar un reflujo de los islotes fuera de la cámara anterior, después de la remoción de la cánula.

5. Llevar a cabo el trasplante de los islotes a la cámara anterior del ojo según la opción (A) o (B).

   (A) Trasplante de los islotes utilizando un sostenedor de la cabeza

   i. Colocar una pieza de lana de algodón en un tubo de reacción de 50 ml, y vertir sobre la lana aproximadamente 1 ml de isoflurano aproximadamente. Aturdir el ratón manteniéndolo durante algunos segundos en el tubo de reacción.

   ii. Disponer el ratón en el mantenedor cefálico bajo un extereomicroscopio y fijar la cabeza con el ojo seleccionado para el trasplante, mirando hacia arriba.

   iii. Anestesiar el ratón utilizando isoflurano, 2-2,5%, en O_2 al 40% y N_2 al 60%. Los niveles de isoflurano se controlan cuidadosamente para asegurar un apropiado estado anestésico. Se aplica el vacío en el área de anestesia para proteger al operador.

   iv. Inyectar butremorfina (0,05 mg/kg) subcutáneamente para aliviar el dolor postoperatorio.

v. Tirar cuidadosamente hacia atrás los párpados y situar cuidadosamente el tubo de polietileno del estabilizador ocular por debajo de la unión corneo-escleral.

Se debe tener cuidado cuando se sitúan los fórceps de estabilización para evitar la interrupción de la circulación sanguínea en el ojo.

vi. Conectar una aguja 27 G a una jeringa de 1 ml para manejar fácilmente. Utilizar la aguja de 27 G para pinchar la córnea cerca de la esclerótica, al tiempo que se tiene cuidado de no dañar el iris y evitar que sangre.

vii. Insertar con cuidado la cánula de extremo redondeado en la cámara anterior del ojo, a través del orificio hecho con la aguja. Inyectar lentamente los islotes en la cámara anterior. Después de la inyección, retirar cuidadosamente la cánula.

viii. Dejar al ratón en el sostenedor de la cabeza antes de despertarle, durante otros 10-15 minutos. Liberar al animal de dicho sostenedor, retirar el isoflurano y observar al ratón durante el despertar.

ix. Dispensar una gota de Viscotears en el ojo para evitar la desecación.

Se lleva a cabo una pausa hasta que se realiza la obtención *in vivo* de las imágenes. La duración depende de los parámetros de estudio.

(B) Trasplante de islotes sin utilizar el mantenedor de cabeza

i. Preparar una pequeña máscara de gas a partir de una jeringa de plástico de 5 ml, eliminando el pistón y cortando la jeringa ~1 cm por encima del fondo. Conectar el tubo de la bomba anestésica a la fijación de la aguja,

ii. Aturdir al ratón manteniéndolo durante algunos segundos en el tubo de reacción de 50 ml con algodón y 1 ml aproximadamente de isoflurano.

iii. Colocar el ratón bajo un estereomicroscopio en un lecho de calentamiento con el ojo seleccionado para el trasplante mirando hacia arriba. Colocar el hocico del animal en la máscara de gas preparada.

iv. Anestesiar el ratón, utilizando isoflurano, 2-2,5%, en O_2 al 40% y N_2 al 60%. Los niveles de isoflurano se controlan cuidadosamente para asegurar un estado anestésico apropiado. Se aplica el vacío en el área de anestesia para proteger al operador.

v. Inyectar futranorfina (0,05 mg/kg) subcutáneamente para aliviar el dolor postoperatorio.

vi. Retraer la piel alrededor del ojo para visualizar la unión córneo escleral ocular y fijar suavemente la posición de la cabeza, sin interrumpir la respiración o la circulación sanguínea del animal.

vii. Continuar tal como se describe anteriormente bajo (A), desde los puntos VI a IX.

Formación de imágenes de los islotes injertados en la cámara anterior ocular

6. Trasplantar los islotes según los pasos 1-5. Elegir un ratón donador y receptor dependiendo del objeto del estudio.

7. Aturdir al ratón receptor mediante una corta exposición al isoflurano.

8. Colocar el ratón en el sostenedor cefálico y fijar la cabeza con el ojo que contiene los islotes trasplantados dispuestos hacia arriba.

9. Anestesiar al animal utilizando isoflurano, 2-2,5% en O_2 al 40% y N_2 al 60%. Los niveles de isoflurano se controlan cuidadosamente para asegurar un apropiado estado anestésico. Se aplica el vacío en el área de anestesia para proteger al operador.

10. Tirar cuidadosamente hacia atrás los párpados y colocar suavemente el tubo de polietileno del estabilizador ocular por debajo de la unión córneo-escleral.

Se debe tener cuidado al colocar los fórceps de estabilización para no interrumpir la circulación sanguínea en el ojo.

11. Colocar el sostenedor cefálico junto con el ratón, bajo un microscopio vertical equipado para LSM conforal

y bifotónica.

12. Para obtener una vista completa, utilícense objetivos de bajo aumento (2,5 y 5x). Para LSM de alta resolución, utilícense objetivos de inmersión acuosa (10, 20 y 40x) con una distancia larga de actuación, utilizando solución salina fisiológica filtrada o Viscotears como líquidos de inmersión entre las lentes y la córnea.

    Aplicar la potencia de láser mínima requerida y el tiempo de cribado necesario para la visualización con objeto de evitar daño luminoso y blanqueamiento por ejemplo, por debajo de 75 mW, y desde 800 Hz y por encima.

13. Formación de imágenes de parámetros biológicos de interés.

(A) Formación de imágenes de la morfología de los injertos

i. Para visualizar morfología celular específica, pueden utilizarse para trasplante islotes de ratones transgénicos que expresan una proteína fluorescente en las células beta (por ejemplo, RIP-GFP). Excitar la fluorescencia GFP con un láser de 488 nm y detéctese la emisión entre 495 y 530 nm. La morfología de los islotes puede también plasmarse en imagen mediante detección de una imagen de reflexión. Elegir un láser (por ejemplo 633 nm) y establecer el control AOBS para optimizar la detección de reflexión. Recuperar la emisión entre ± 4 nm de la longitud de onda del láser.

(B) Obtención de la imagen de vascularizacion en el iris y en los islotes injertados

Visualizar la vascularización mediante la obtención de las imágenes de las células endoteliales o de la luz de los vasos sanguíneos.

i. Para obtener imágenes de las células endoteliales utilícense ratones Tie2-GFP para trasplante.

ii. Excitar la fluorescencia GFP con un láser 488 nm y detectar la emisión entre 495 y 530 nm.

iii. Para obtener la imagen de la luz de los vasos sanguíneos, inyectar 0,1 ml de 10 mg/ml de dextrano (70 kDa) marcado fluorescentemente en la vena de la cola.

iv. Después de la inyección de un dextrano marcado fluorescentemente, obtener la imagen de los islotes injertados utilizando fijaciones apropiadas para el dextrano seleccionado.

Para la formación de imágenes simultáneas de células β y vasos, trasplantar islotes de ratones RIP-GFP, e inyectar dextrano (70 kDa) conjugado a Texas-Red. Excítese Texas-Red y GFP con láser bifotónico a 890 nm y recuperar la luz emitida en detectores no-escaneados utilizando un espejo dicroico (RSP 560) y filtros de emisión (BP 525/50 y BP 640/20).

(C) Obtención de la imagen de la muerte de las células beta

i. Inducir la muerte de las células beta en los islotes injertados mediante la inyección intravenosa de aloxano (75 mg/kg peso corporal). Esperar 24 horas para que el aloxan induzca la muerte de las células beta.

ii. Medir los niveles de glucosa sanguínea 24 horas después de la administración del aloxan, para confirmar que el ratón se ha transformado en hiperglicémico.

iii. Inyectar intravenosamente 0,1 ml de anexina V-APC mediante la vena de la cola.

Esperar 4-6 horas para que la anexina V-APC marque las células muertas y apoptósicas.

iv. Obtener la imagen de la muerte de las células beta en los islotes injertados entre 4-6 horas después de la administración de anexina V-APC, utilizando fijaciones apropiadas para la fluorescencia APC. Excitar APC a 633 nm con una recuperación de la luz emitida entre 645-680 nm.

(D) Obtención de la imagen de la concentración citoplásmica de Ca^{2+} libre después de la carga de los injertos con indicadores de Ca^{2+}, vía perfusión de la cámara anterior ocular

La perfusión de la cámara anterior se modifica a partir de la ref.[18].

i. A partir de capilares de vidrio, y utilizando un programa regular de tracción para pipetas de corrección, se obtuvieron pipetas de tracción para la cámara anterior de perfusión ocular. Romper la pipeta hasta obtener un diámetro del extremo de 30-40 µm. Biselar los extremos con un ángulo de 35 grados, hasta un diámetro

final de 70-90 µm. Las pipetas para el flujo extremo deben ser ligeramente mayores (~90 µm) que las pipetas para el flujo interno (~70 µm).

ii. Llenar las jeringas, tubos y mantenedores capilares con la solución extracelular filtrada, y situar las pipetas en la cabeza del agarre capilar del mantenedor capilar.

iii. Anestesiar el ratón mediante una inyección intraperitoneal de 100 µl/10 g de peso corporal de una mezcla Hypnorm/agua estéril/Dormicum (1:2:1). La anestesia ocurrirá en 1-2 minutos. Puede prolongarse la anestesia con inyecciones de 50 µl/10 g peso corporal de una mezcla de Hypnorm/agua estéril (1:3) después de 30 y 60 minutos. Si es necesario prolongar más la anestesia, puede hacerse, después de 90 minutos, mediante una inyección de 50 µl/10 g peso corporal de la mezcla inicial Hypnorm/agua estéril/Dormicum (1:2:1).

Se debe tener cuidado de escoger un anestésico para estudios funcionales e células de los islotes, ya que se ha informado que varios compuestos ejercen un efecto en los niveles de glucosa sanguínea y secreción de insulina[19, 20]. El isoflurano se ha mostrado que inhibe la liberación de insulina estimulada por la glucosa mediante un mecanismo directo sobre las células de los islotes y, por tanto, no es apropiado para estudios funcionales[21]. Una mezcla de Hupnorm/Dormicum no parece interferir con las mediciones de cambios en la concentración del Ca^{2+} citoplásmico libre.

iv. Colocar el ratón en el mantenedor de cabeza y fijar la cabeza con el ojo que contiene los islotes trasplantados mirando hacia arriba.

v. Tirar hacia atrás los párpados, cuidadosamente y situar suavemente el lazo del tubo de polietileno del estabilizador ocular, por debajo de la unión córneoescleral, y situar el mantenedor y el ratón bajo el microscopio vertical.

Se debe tener cuidado al colocar el fórceps de estabilización para no interrumpir la circulación sanguínea en el ojo.

vi. Colgar el depósito abierto del flujo externo a una altura de ~21 cm por encima del ojo, para asegurar una presión intraocular constante de ~15 mm Hg. Situar el mantenedor capilar del flujo externo en el micromanipulador.

vii. Utilizar un objetivo de 2,5 x mientras se inserta la pipeta del flujo externo en la cámara anterior con el micromanipulador para observar el ojo entero.

Penetrar en la cámara anterior moviendo la pipeta rápido a través de la córnea en un ángulo superficial. Se debe tener cuidado de no rayar innecesariamente la córnea o dañar el iris.

viii. Aspirar ~ 130 µl y de Fluo-4/Fura-Red de la mezcla (1:1, 500 µM cada uno) en los capilares de flujo interno y fijar el mantenedor capilar sobre el micromanipulador. Asegurar que existe suficiente solución extracelular libre de colorante en la jeringa, para efectuar el lavado.

ix. Insertar la pipeta del flujo interno en la cámara anterior opuesta a la pipeta de flujo externo. Penetrar en la córnea de la misma forma que en el paso vii.

x. Inicialmente, intercambiar el humor acuoso con el prefundido rápido (~ 10 µ en 30 s.). Obsérvese la funcionalidad de la perfusión.

xi. Perfundir continuamente la cámara anterior ocular, a una velocidad de ~ 3 µl/min durante ~ 40 minutos.

xii. Después de la carga, llevar a cabo el lavado del colorante en la cámara anterior, prefundiendo la cámara anterior a una velocidad rápida (~ 10 µl/min).

Durante las etapas de perfusión, controlar la perfusión y el ojo. Poner atención en que el ojo no muestre edema debido a un flujo externo que está bloqueado.

xiii. Después del lavado del colorante, eliminar la perfusión. No eliminar las pipetas.

xiv. Para obtener las imágenes de los cambios en la concentración citoplásmico de Ca+2 libre, cambiar a un objetivo de inmersión acuosa con un aumento más alto (10, 20 o 40 x) y aplicar Viscotears como líquido de inmersión.

xv. Obtener simultáneamente la imagen Fluo-4 y Fura-Red para permitir mediciones ratiométricas de cambios en la concentración citoplasmática de Ca^{2+} libre. Excitar Fluo-4 y Fura-Red a 488 nm y recuperar la luz

emitida para Fluo-4 entre 495-535 nm y para Fura-Red entre 600-700 nm.

Aplicar la mínima potencia del láser requerida y el tiempo de escaneado necesario para la visualización, con objeto de evitar daño lumínico y blanqueamiento, por ejemplo, por debajo de 75 mW, y a partir de 800 Hz y por encima.

xvi. Empezar a obtener una serie temporal de la fluorescencia Fluo-4 y Fura-Red en las células de interés.

xvii. Obtener una línea básica de niveles de fluorescencia no estimulada, y estimular la liberación sistémica de insulina inyectando glibenclamida (1 mg/kg) intravenosamente mediante la vena de la cola. En algunos segundos después de la inyección, podrán observarse cambios en la concentración de Ca^{2+} citoplásmico libre en las células beta dentro del injerto de los islotes.

xviii. Después de la obtención de las imágenes, eliminar cuidadosamente las pipetas del ojo.

xix. Para aliviar el dolor postoperatorio, inyectar subcutáneamente al ratón con butremorfina (0,05 mg/kg).

xx. Colocar al animal en un entorno caliente (~ 30ºC), hasta que se duerma. Después de la anestesia Hypnorm/Dormicum, esto puede durar varias horas.

Tiempos

Aislamiento de los islotes (paso 1): ~ 4 horas.

Trasplante de islotes a la cámara anterior (pasos 2-5): ~ 25 min/ratón.

Formación de imágenes de la morfología de los injertos (paso 13 A): ~ 1h/ratón.

Formación de imágenes de la vascularización de los injertos (pasos 13 B, i-ii o iii-iv): ~ 1h/ratón.

Formación de imágenes de la muerte de células beta (pasos 13 C i-ii): ~ 24 horas; (paso 13 C iii-iv): ~ 5 horas.

Obtención de la concentración de Ca^{2+} libre citoplásmico, después de la carga del injerto con indicadores de Ca^{2+} vía perfusión de la cámara anterior ocular (paso 13 D i): ~ 1,5 h/4-6 pipetas (pasos 13 D ii-xx): ~ 2 h/ratón.

Resultados anticipados

La plataforma introducida en la presente memoria permite la evaluación longitudinal de varios parámetros biológicos *in vivo* sin necesidad de procedimientos quirúrgicos invasivos para acceder al tejido de interés. Después del trasplante de islotes pancreáticos de Langerhans a la cámara anterior ocular, el protocolo habitual permite fácilmente la detección de la morfología de los injertos de los islotes mediante la formación de imágenes por fluorescencia o reflejo. Se llevó a cabo la caracterización morfológica de un injerto de islote pancreático mediante la formación de imágenes por reflexión y GFP, en la que, islotes de ratones que expresaban GFP, bajo el promotor insulínico (células beta verdes), se trasplantaron a ratones que expresaban GFP bajo el promotor Tie2 (células endoteliales verdes). GFP se excitó con 488 nm con una potencia láser del 35% y la emisión se midió entre 495-530 nm. El reflejo formó la imagen mediante excitación con 633 nm con una potencia láser del 35%, y midiéndose la emisión entre 632-639 nm.

Además, a la vascularización y la muerte celular puede seguirse longitudinalmente mediante inyecciones sistémicas de colorantes fluorescentes. Los vasos sanguíneos se visualizaron mediante una inyección intravenosa de un dextrano de 70 kDa, marcado Texas Red. GFP Texas Red se excitaron con un láser bifotónico a 890 nm a una mínima potencia láser necesaria requerida, recuperándose la emisión sobre detectores no descaneado, utilizando un espejo dicroico (RSP 560) y filtros de emisión (BP 525/50 y BP 640/20). Para la formación de imágenes de la muerte celular, se indujo la muerte de las células beta mediante inyección intravenosa de aloxan. Las células muertas y apoptósicas se visualizaron mediante inyección intravenosa de anexina V-APC. El reflejo obtuvo las imágenes excitando con 543 nm, midiéndose la emisión entre 539-547 nm con una potencia de láser del 35%. GFP se excitó a 488 nm y la emisión se midió entre 495-530 nm con una potencia láser del 35%. APC se excitó a 633 nm, con una recuperación de la luz de emisión de entre 645-680 nm, con una potencia láser del 75%.

Además, las células de los islotes pueden cargarse repetidamente con indicadores de Ca^{2+}, mediante perfusión de la cámara anterior, para medir sistémicamente cambios inducidos en la concentración del Ca^{2+} citoplásmico libre. Para cargar con los indicadores del calcio, la cámara anterior se perfundió con Fluo-4 y Fura-Red. Fluo-4 y Fura-Red se excitaron con 488 nm con una potencia láser del 25%, y la emisión se midió para Fluo-4 entre 495-535 nm y para Fura-Red entre 600-700 nm. El reflejo dio lugar a imágenes mediante excitación con 543 nm y la emisión se midió entre 539-547 nm, con una potencia láser del 15%.

La extensión del protocolo habitual, utilizando varios ratones transgénicos e indicadores, permitirá la observación de numerosos parámetros biológicos adicionales. Por tanto, esta plataforma ayudará a investigar la biología celular de sistemas complejos bajo condiciones, tanto fisiológicas como patofisiológicas.

Ejemplo 2 Referencias

1. Koo, V., Hamilton. P.W. & Williamson, K. Non-invasive in vivo imaging in small animal research. Cell Oncol 28, 127-139 (2006).

2. Handbook of biological confocal microscopy, Edn. 3 (Pawley, J.B.) (Springer, New York, NY, 2005).

3. Adeghate, E., Ponery, A.S., Ahmed, I. & Donath, T. Comparative morphology and biochemistry of pancreatic tissue fragments transplanted into the anterior eye chamber and subcutaneous regions of the rat. European journal of morphology 39, 257-268 (2001).

4. Katoh, N., *et al.* Target-specific innervation by autonomic and sensory nerve fibers in hairy fetal skin transplanted into the anterior eye chamber of adult rat. Cell and tissue research 266, 259-263 (1991).

5. Olson, L. & Seiger, A. Beating intraocular hearts: light-controlled rate by autonomic innervation from host iris. Journal of neurobiology 7, 193-203 (1976).

6. Wu, W., Scott, D.E. & Reiter, R.J. Transplantation of the mammalian pineal gland: studies of survival, revascularization, reinnervation, and recovery of function. Experimental neurology 122, 88-99 (1993).

7. Hoffer, B., Seiger, A., Ljungberg, T. & Olson, L. Electrophysiological and cytological studies of brain homografts in the anterior chamber of the eye: maturation of cerebellar cortex in oculo. Brain research 79, 165-184 (1974).

8. Niederkorn, J.Y. Immune privilege in the anterior chamber of the eye. Critical reviews in immunology 22, 13-46 (2002).

9. Adeghate, E. Pancreatic tissue grafts are reinnervated by neuro-peptidergic and cholinergic nerves within five days of transplantation. Transplant immunology 10, 73-80 (2002).

10. Adeghate, E. Host-graft circulation and vascular morphology in pancreatic tissue transplants in rats. The Anatomical record 251, 448-459 (1998).

12. Zhuravleva, Z.N., Bragin, A.G. & Vinogradova, O.S. Organization of the nervous tissue (hippocampus and septum) developing in the anterior eye chamber. 1. General characteristic and non-neural elements. Journal fur Himforschung 25, 313-330 (1984).

13. Adeghate, E. & Donath, T. Distribution of neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide immunoreactive nerves in normal and transplanted pancreatic tissue. Peptides 11, 1087-1092 (1990).

14. Boutet de Monvel, J., Le Calvez, S. & Ulfendahl, M. Image restoration for confocal microscopy: improving the limits of deconvolution, with application to the visualization of the mammalian hearing organ. Biophysical journal 80, 2455-2470 (2001).

15. Kohler, M., et al. On-line monitoring of apoptosis in insulin-secreting cells. Diabetes 52, 2943-2950 (2003).

16. Berney, T., et a/. Endotoxin-mediated delayed islet graft function is associated with increased intra-islet cytokine production and islet cell apoptosis. Transplantation 71, 125-132 (2001).

17. Nyqvist, D., Köhler, M., Wahlstedt, H. & Berggren, P.O. Donor islet endothelial cells participate in formation of functional vessels within pancreatic islet grafts. Diabetes 54, 2287-2293 (2005).

18. Bernd, A.S., Aihara, M., Lindsey, J.D. & Weinreb, R.N. Influence of molecular weight on intracameral dextran movement to the posterior segment of the mouse eye. Investigative ophthalmology & visual science 45, 480-484 (2004).

19. Aynsley-Green, A., Biebuyck, J.F. & Alberti, K.G. Anaesthesia and insulin secretion: the effects of diethyl ether, halothane, pentobarbitone sodium and ketamine hydrochloride on intravenous glucose tolerance and insulin secretion in the rat. Diabetologia 9, 274-281 (1973).

20. Brown, E.T., Umino, Y., Loi, T., Solessio, E. & Barlow, R. Anesthesia can cause sustained hyperglycemia in C57/BL6J mice. Visual neuroscience 22, 615-618 (2005).

21. Desborough, J.P., Jones, P.M., Persaud, S.J., Landon, M.J. & Howell, S.L Isoflurane inhibits insulin secretion from isolated rat pancreatic islets of Langerhans. British journal of anaesthesia 71, 873-876 (1993).

Detección de fallos

TABLA 1

Problema	Razón posible	Solución
Movimiento del injerto durante la formación de imágenes (paso 12).	Movimiento de la cabeza, debido a que el fijador de ésta no está fijado apropiadamente.	Fijar la grapa del sostenedor de la cabeza.
	Movimiento del ojo durante la respiración normal.	Ajustar cuidadosamente el estabilizador ocular.
	Respiración entrecortada del ratón.	Asegurarse de que el flujo de aire de la unidad anestésica y de que los niveles de isofluorano están apropiadamente fijados.
No puede detectarse fluorescencia en los vasos sanguíneos (paso 13 B ii).	Falló la inyección en la vena de la cola	Repetir la inyección en la vena de la cola.
	Los valores fijados para la excitación y emisión no son correctos.	Ajustar los valores fijados para excitación y emisión.
	La circulación sanguínea al ojo se interrumpe debido a la falsa fijación del estabilizador ocular.	Ajustar la posición del estabilizador ocular.
La perfusión no tiene lugar (paso 13 D x).	Las burbujas de aire bloquean las pipetas, el sostenedor de capilares o los tubos.	Asegurarse de que no haya burbujas de aire en los tubos, sostenedores de capilares, antes del experimento.
	El polvo bloquea los extremos de las pipetas.	Asegurarse de limpiar las pipetas después de biselar que queden rectas después del experimento.

1. Procedimiento para tratar un individuo con diabetes tipo I, que comprende trasplantar dentro del ojo de un individuo con diabetes tipo I una cantidad eficaz de célula productora de insulina para favorecer la producción de insulina en el individuo.

2. Procedimiento para el desarrollo de fármacos, que comprende

   (a) injertar unas células diana dentro del ojo de un animal de prueba, en el que uno o más componentes celulares de interés terapéutico en las células diana trasplantadas son marcados de manera fluorescente;

   (b) poner en contacto las células diana con uno o más compuestos de prueba; y

   (c) llevar a cabo la formación de imágenes fluorescentes no invasiva en el ojo del animal de prueba,

   en el que la formación de imágenes fluorescentes es utilizada para detectar cambios inducidos en el compuesto de prueba en uno o varios de entre actividad, localización, y cantidad de componentes celulares marcados de manera fluorescente de interés terapéutico en las células diana injertadas, identificando los cambios aquellos compuestos de prueba que pueden proporcionar un beneficio terapéutico a las células diana.

3. Procedimiento según el artículo 2, en el que las células diana son derivadas de un tejido seleccionado de entre el grupo constituido por células endocrinas, grasas, músculos, cerebro, hígado, corazón, riñón y pulmón.

4. Procedimiento según el artículo 2 o 3, en el que las células diana son trasplantadas dentro de la cámara anterior del ojo del animal de prueba.

5. Procedimiento según cualquiera de los artículos 2 a 4, en el que uno o más de los compuestos de prueba son aplicados tópicamente sobre el ojo del animal de prueba.

6. Procedimiento según cualquiera de los artículos 2 a 4, en el que uno o más de los compuestos de prueba

son inyectados dentro de la cámara anterior del ojo del animal de prueba.

7. Procedimiento según cualquiera de los artículos 2 a 6, en el que la formación de imágenes comprende un microscopio de escaneado por láser.

8. Procedimiento según cualquiera de los artículos 2 a 7, en el que la formación de imágenes fluorescentes es utilizada para detectar los cambios inducidos por el compuesto de prueba en uno o varios de entre actividad, localización y cantidad de los componentes celulares marcados de forma fluorescente de interés terapéutico en las células diana injertadas en múltiples puntos temporales.

9. Procedimiento según cualquiera de los artículos 2 a 8, en el que en el que las células diana comprenden células beta pancreáticas.

REIVINDICACIONES

1. Islote pancreático aislado para su utilización en el tratamiento de un individuo con diabetes tipo I que comprende, trasplantar dentro de la cámara anterior del ojo de un individuo con diabetes tipo I una cantidad eficaz de la célula de islote pancreático aislado para favorecer la producción de insulina en el individuo.

2. Islote pancreático aislado según la reivindicación 1, en el que el trasplante dentro de la cámara anterior del ojo implica la inyección a través de la córnea.

3. Célula de islote pancreático aislado para su utilización en el tratamiento de un individuo con diabetes tipo I que comprende, trasplantar dentro de la cámara anterior del ojo de un individuo con diabetes tipo I una cantidad eficaz de la célula de islote pancreático aislado para favorecer la producción de insulina en el individuo.

4. Célula de islote pancreático aislado según la reivindicación 3, en la que el trasplante dentro de la cámara anterior del ojo implica la inyección a través de la córnea.

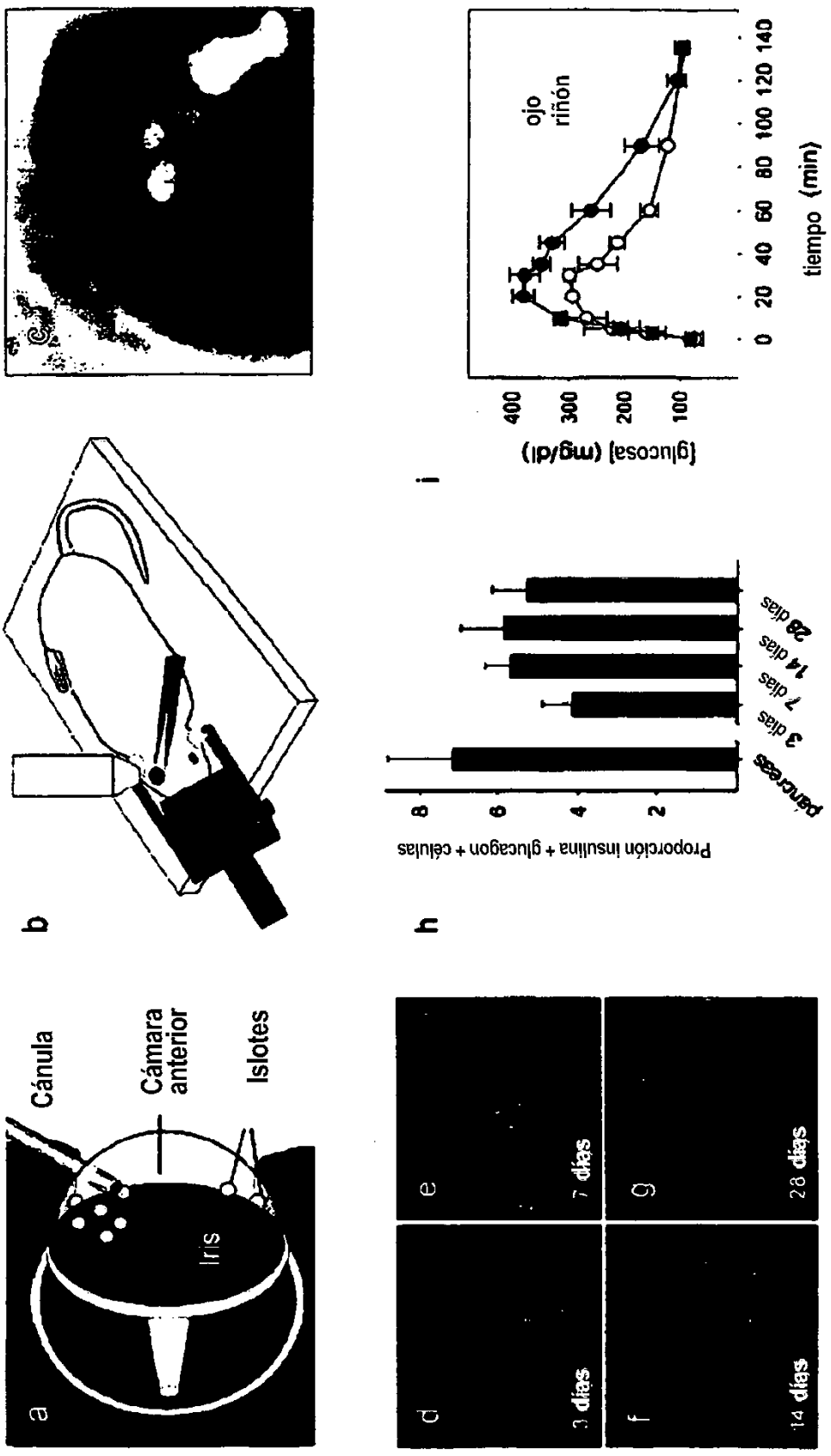

a
Cánula
Cámara anterior
Iris
Islotes
b
d
3 días
e
7 días
f
14 días
g
28 días
h
Proporción insulina + glucagon + células
8
6
4
2
páncreas
3 días
7 días
14 días
28 días
i
[glucosa] (mg/dl)
400
300
200
100
ojo
riñón
0 20 40 60 80 100 120 140
tiempo (min)

Fig. 1

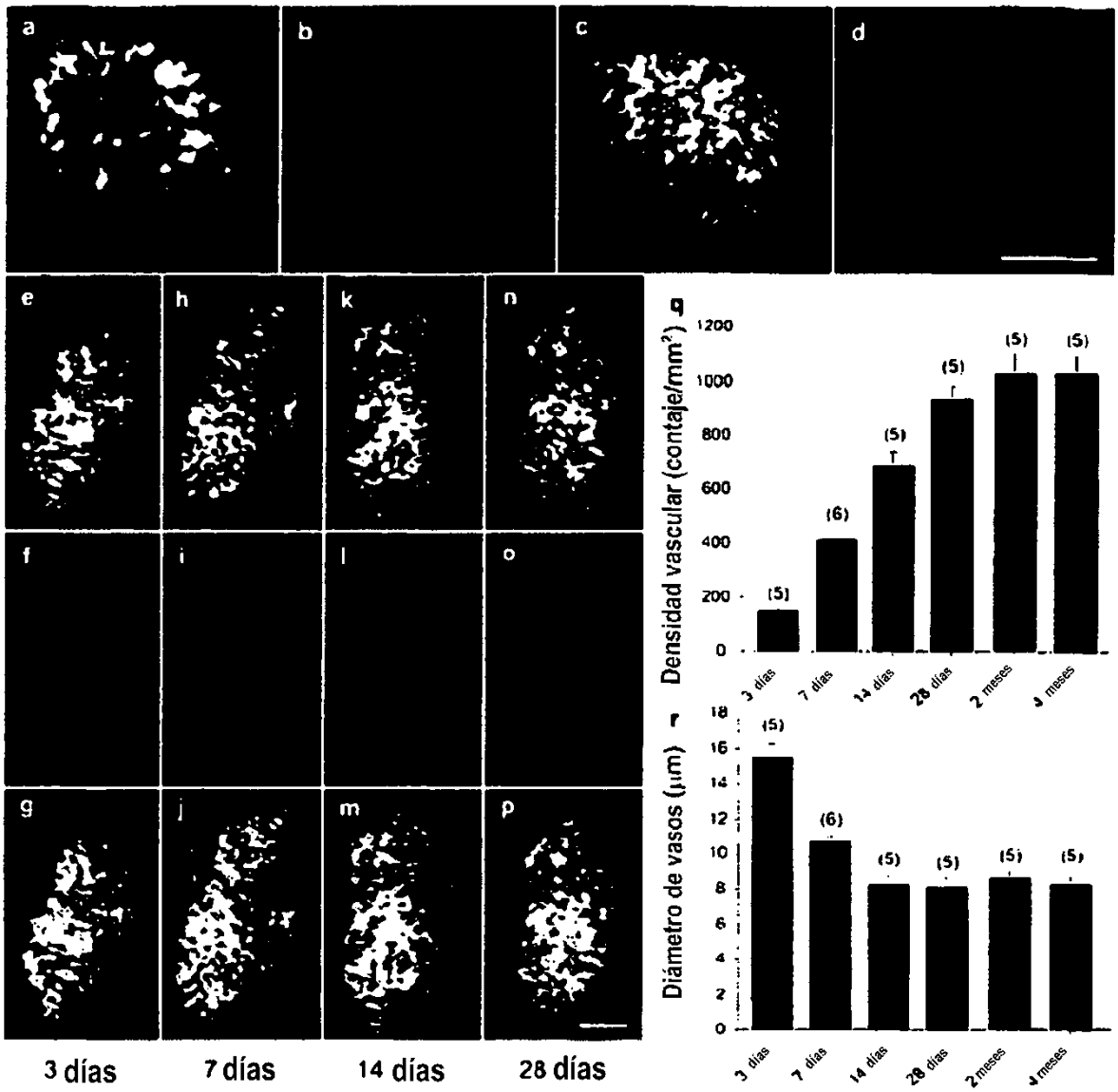

a
b
c
d
e
h
k
n
f
i
l
o
g
j
m
p
3 días
7 días
14 días
28 días
q
Densidad vascular (contaje/mm²)
1200
1000
800
600
400
200
0
(5)
(6)
(5)
(5)
(5)
(5)
3 días
7 días
14 días
28 días
2 meses
3 meses
r
Diámetro de vasos (µm)
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
(5)
(6)
(5)
(5)
(5)
(5)
3 días
7 días
14 días
28 días
2 meses
3 meses

Fig. 2

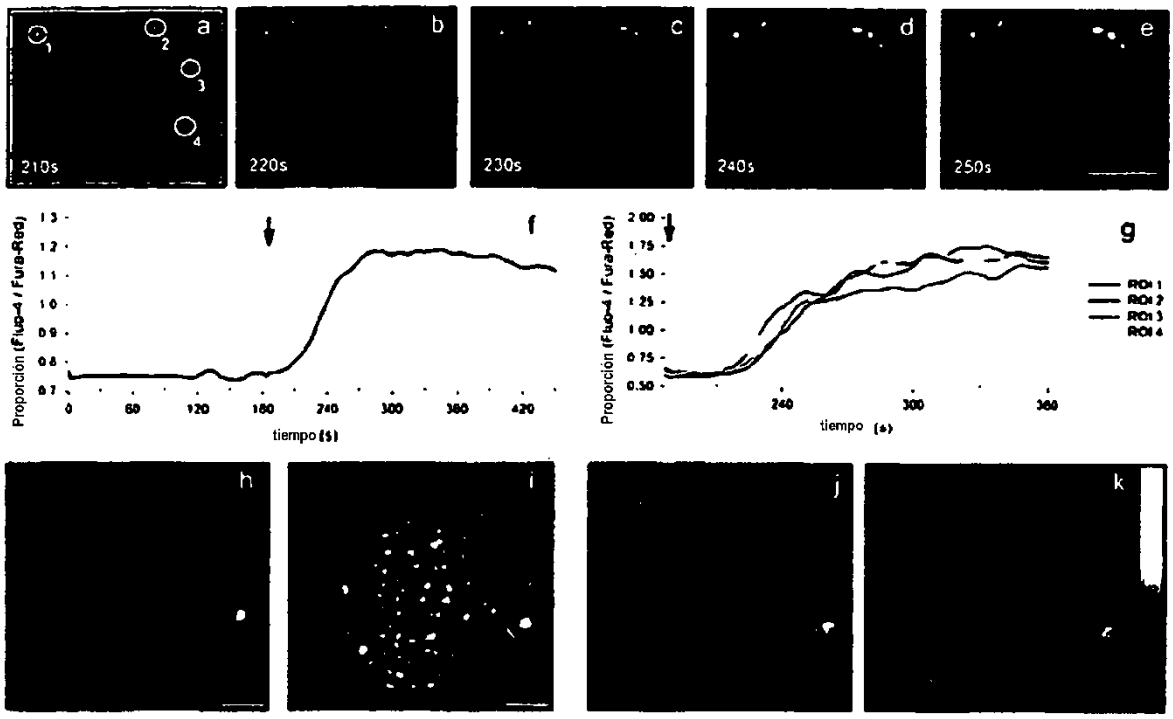

a
b
c
d
e
210s
220s
230s
240s
250s
f
g
Proporción (Fluo-4 / Fura-Red)
tiempo (s)
ROI 1
ROI 2
ROI 3
ROI 4
h
i
j
k

Fig. 3

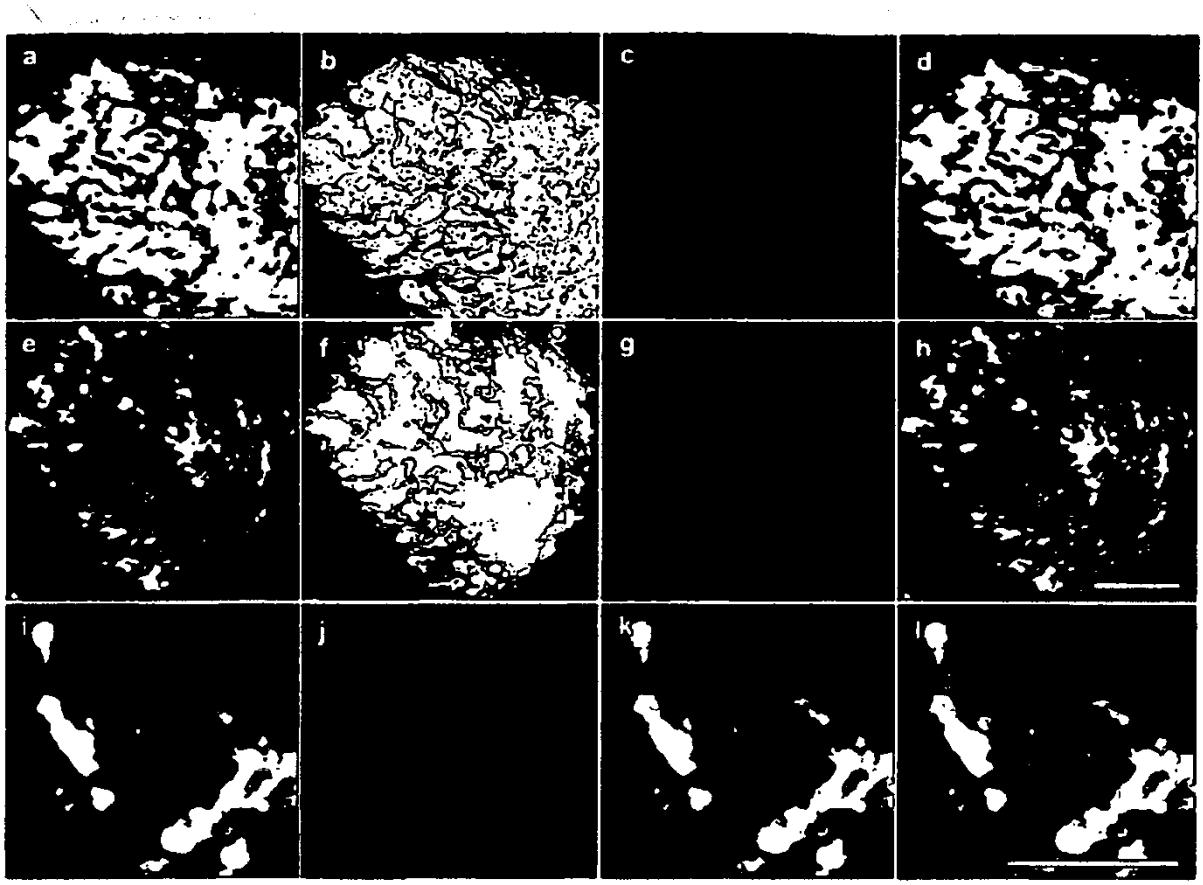


Fig. 4

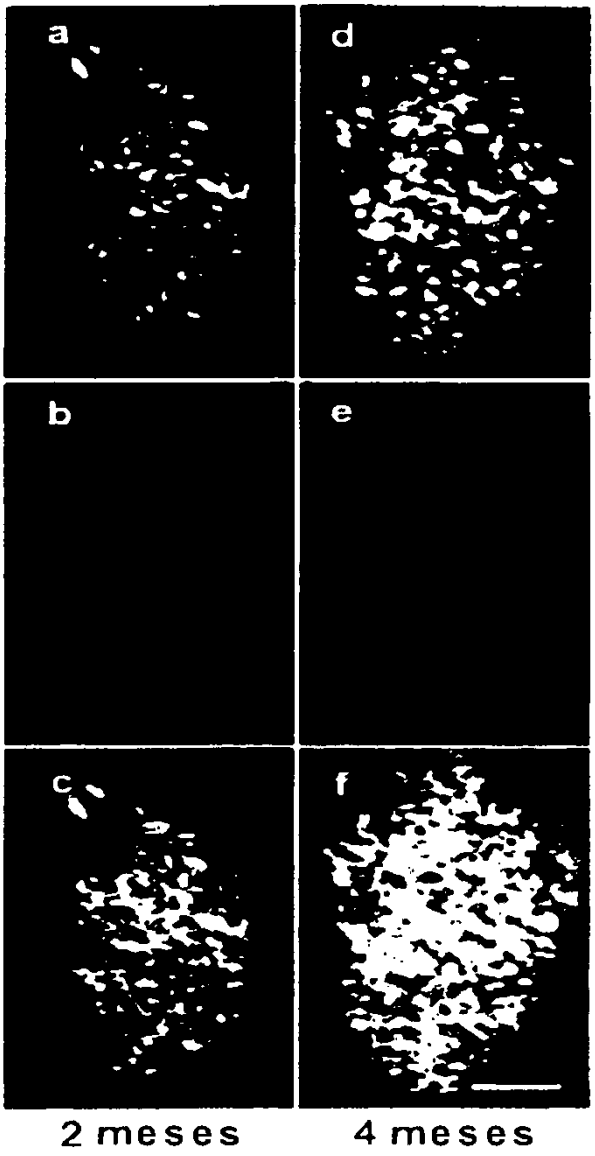


Fig. 5