

# Imersão do pâncreas por 24 horas em solução de colagenase a 4°C no isolamento de ilhotas de Langerhans

## *Immersion of pancreas for 24 hours in collagenase solution at 4°C in Langerhans islets isolation*

---

LUCIANO PASSAMANI DIOGO<sup>1</sup>  
DAVID SAITOVITCH<sup>2</sup>  
LAURA FUCHS BAHLLIS<sup>3</sup>  
CÍNTHIA FONSECA O'KEEFFE<sup>3</sup>

---

### RESUMO

**Objetivos:** testar se a imersão do pâncreas em solução de 1 ou 2 mg/ml de colagenase em 4°C por 24 horas, no isolamento experimental de ilhotas de Langerhans, aumenta o rendimento de ilhotas por grama de tecido pancreático.

**Métodos:** estudo experimental com camundongos, realizado no Laboratório de Nefrologia do Instituto de Pesquisas Biológicas do Hospital São Lucas da PUCRS, Porto Alegre, RS. Após sacrifício dos animais sob anestesia, os pâncreas foram retirados e triturados, sendo divididos em quatro grupos, conforme a técnica utilizada para isolar as ilhotas. A) colagenase 1mg/mL, a 4°C por 24 horas e posterior aquecimento a 39°C por 15 minutos. B) colagenase 2mg/mL com as mesmas etapas anteriores. C) colagenase 1mg/mL com aquecimento da solução no mesmo dia da retirada, a 39°C por 15 minutos. D) colagenase 2mg/mL com aquecimento da solução no mesmo dia da retirada, a 39°C por 15 minutos.

### ABSTRACT

**Aims:** To test whether the immersion of the pancreas in solutions of 1 or 2 mg/mL of collagenase in 4°C for 24 hours, for the isolation of Langerhans islets, rises the yield of islets/grams of pancreatic tissue.

**Methods:** Experimental study with mice, performed in the Laboratory of Nephrology of the Instituto de Pesquisas Biológicas do Hospital São Lucas da PUCRS, Porto Alegre, RS. After the animals have been sacrificed under anesthesia, the pancreas were removed and divided in four groups, according the technique used for isolating the islets. A) collagenase 1mg/mL, in 4°C for 24 hours and heating for 39°C for 15 minutes. B) collagenase 2mg/mL with the same previous described steps. C) collagenase 1mg/mL and heating of the solution in the same day, in 39°C for 15 minutes. D) collagenase 2mg/mL and heating of the solution in the same day, in 39°C for 15 minutes. We verified the viability of the islet through the trypan blue test.

**Results:** The median numbers of isolated islets in the groups A, B, C and D were 9142, 8285, 2813 e 3199,

---

<sup>1</sup> Professor Adjunto do Departamento de Medicina Interna da Faculdade de Medicina da PUCRS. Mestre e Doutor em Clínica Médica pela PUCRS.

<sup>2</sup> Nefrologista. Transplantólogo. Doutor pela universidade de Oxford. Professor Adjunto do Departamento de Medicina Interna da Faculdade de Medicina da PUCRS.

<sup>3</sup> Acadêmicas da Faculdade de Medicina da PUCRS.

Verificamos a viabilidade das ilhotas através do teste do azul tripano.

**Resultados:** as medianas da quantidade de ilhotas isoladas nos grupos A, B, C e D foram 9.142, 8.285, 2.813 e 3.199 respectivamente. O teste de Kruskal-Wallis demonstrou diferença significativa, com valor de  $H = 17,44$  com  $\alpha = 0,01$  e, na comparação dos grupos entre si, demonstrou que não há diferença entre as soluções de colagenase com concentrações de 1 e 2 mg/dL. Os grupos com a imersão do tecido pancreático em solução de colagenase por 24 horas obtiveram três vezes mais ilhotas, quando comparados aos submetidos à digestão imediata, conforme teste de Dunn com  $\alpha < 0,05$ . O teste do azul tripano demonstrou uma vitalidade maior que 95% em todos os grupos.

**Conclusões:** sugere-se que a imersão em colagenase por tempo mais prolongado melhora o processo de digestão do tecido pancreático, aumentando o rendimento de ilhotas isoladas por grama de tecido pancreático. A diferença de concentração entre as soluções de colagenase não afetou o resultado.

**DESCRIPTORIOS:** TRANSPLANTE DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS; TÉCNICAS DE CULTURA; COLAGENASES; SOLUÇÃO PARA PRESERVAÇÃO DE ÓRGÃOS; EPIDEMIOLOGIA EXPERIMENTAL; PÂNCREAS; CAMUNDONGOS; PRESERVAÇÃO DE TECIDOS; ESFRIAMENTO.

respectively. Kruskal-Wallis test showed significant difference, with the value of  $H = 17,44$  with  $\alpha = 0,01$ , and in the comparison between the groups, there was no difference in the solutions of collagenase with concentrations of 1 and 2 mg/dL. Groups with immersion of pancreatic tissue in collagenase solution for 24 hours had three times more islets when compared to groups submitted to immediate digestion, according to Dunn test with  $\alpha < 0,05$ . The trypan blue test showed viability higher than 95% in all groups.

**Conclusions:** We suggest that the immersion in solution of collagenase for longer time improves the process of digestion of pancreatic tissue, rising the yield of islets/grams of pancreatic tissue. Different concentration between the collagenase solutions did not affect the final result.

**KEY WORDS:** ISLETS OF LANGERHANS TRANSPLANTATION; CULTURE TECHNIQUES; COLLAGENASES; ORGAN PRESERVATION SOLUTIONS; EPIDEMIOLOGY, EXPERIMENTAL; PANCREAS; MICE; TISSUE PRESERVATION; COOLING.

## INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus é uma síndrome caracterizada por hiperglicemia, causada pela deficiência relativa ou absoluta de insulina, resultante da alteração da função secretora pancreática (tipo 1) ou resistência à ação da insulina nos tecidos-alvo (tipo 2).<sup>1,2</sup> A procura por terapêuticas alternativas e mais eficazes para o diabetes levou ao desenvolvimento do transplante de pâncreas e ilhotas pancreáticas.<sup>3</sup> Vários trabalhos clínicos e experimentais têm sido realizados com a preocupação em aprimorar o transplante de ilhotas de Langerhans. Essas pesquisas trabalham nos métodos de isolamento de ilhotas,<sup>4,5</sup> na preservação destas *in vitro*;<sup>6</sup> na preservação e criopreservação,<sup>7,8</sup> nos diferentes locais e formas de implante das ilhotas e na indução de tolerância imunológica.<sup>9</sup> Na investigação do diabetes, o uso de modelos experimentais com animais é uma importante ferramenta. Pode-se induzir o diabetes pela streptozotocina,<sup>10,11</sup> que atua na necrose das células beta das ilhotas de Langerhans, levando a hiperglicemia dentro de 1 a 2 dias após a injeção.<sup>12</sup> Para o isolamento das ilhotas *in vitro* é necessário que haja dissociação das mesmas do tecido acinar,<sup>13</sup> o que pode ser feito pelo uso de enzimas como a colagenase, que

usualmente é ativada por meio de aquecimento da solução de colagenase a 39°C,<sup>14</sup> seguido de separação gravitacional através do uso de gradiente de Ficoll em centrífugas.<sup>13,15</sup> Com o objetivo de desenvolver e implementar um modelo experimental de isolamento de ilhotas de Langerhans, avaliou-se o efeito do tempo de imersão do tecido pancreático na solução de colagenase, assim como da concentração da mesma, no rendimento de ilhotas isoladas.

## MÉTODOS

Foi realizado um estudo experimental, em camundongos, no Laboratório de Nefrologia do Instituto de Pesquisas Biológicas do Hospital São Lucas da PUCRS, após ter sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição.

### Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem C3H isogênica, com idade entre 8 e 12 semanas, adquiridos do biotério do Instituto de Pesquisas Biológicas do Estado do Rio Grande do Sul e mantidos em alojamento no biotério dormitório do Instituto de Pesquisa Biomédica da PUCRS, com alimentação e água *ad libitum* e ciclos de noite dia de 12 horas.

## Soluções utilizadas

As soluções preparadas no laboratório e utilizadas no experimento estão descritas no quadro abaixo.

| Nome da solução        | Descrição  |
|------------------------|--|
| HBSS/<br>HEPES/<br>FCS | Solução básica para manutenção dos tecidos, feita à base de HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Calbiochem, Cambridge, EUA). Para cada 250 mL de HBSS foram acrescentados 5mL de HEPES (Acros, Geel, Bélgica) a 1 molar e 10 mL de FCS (Calbiochem) |
| Colagenase             | Preparada pela adição de colagenase tipo IV (Gibco BRL, Invitrogen, Grand Island, EUA) à solução de HBSS sem FCS, para obter as concentrações de 1 e 2 mg/mL.  |
| Ficoll                 | Ficoll 400 foi dissolvido em solução de Euro-Collins para obter as densidades 1.108, 1.096, 1.085 e 1.037, por meio de um picnômetro a 20°C.   |
| Ditizona               | A solução de ditizona foi diluída em dimetil-sulfóxido na concentração de 10mg/mL e posteriormente utilizada na identificação das ilhotas de Langerhans.   |

## Isolamento de ilhotas

O processo de isolamento de ilhotas foi realizado em três etapas. A primeira consistiu da retirada do tecido pancreático dos camundongos, os quais foram anestesiados com thiopental e sacrificados através de deslocamento cervical. Para cada experimento foi necessário um mínimo de três pâncreas, que, após sua retirada, foram pesados e triturados com o uso de tesoura, estando então prontos para se iniciar a próxima etapa do processo. Na segunda etapa, que consiste na digestão do colágeno do tecido pancreático, a fim de separar o tecido acinar das ilhotas, o preparado de pâncreas foi colocado em solução de colagenase e sofreu o processo de digestão de acordo com cada um dos grupos que serão descritos a seguir. Foram testados quatro meios diferentes para este processo. A comparação diz respeito à concentração de colagenase, 1 ou 2 mg/dL, e ao tempo de permanência do tecido em solução de colagenase a baixa temperatura (nenhum ou 24 horas), para melhor dispersão da solução no tecido, formando assim quatro grupos.

- Grupo A: imersão do tecido em solução de colagenase a 1mg/mL, a 4°C por 24 horas e posterior aquecimento a 39°C por 15 minutos.
- Grupo B: solução de colagenase a 2mg/mL com as mesmas etapas anteriores.
- Grupo C: imersão do tecido em solução de colagenase a 1mg/mL com aquecimento

da solução no mesmo dia da retirada a 39°C por 15 minutos.

- Grupo D: imersão do tecido em solução de colagenase a 2mg/mL com aquecimento da solução no mesmo dia da retirada, a 39°C por 15 minutos.

A terceira etapa do processo ocorreu após a digestão do colágeno e objetivou separar as ilhotas dos demais tecidos. Em virtude de o tecido acinar ser mais denso que as ilhotas de Langerhans, a separação deve ser realizada por meio de gradiente de densidade. Após sofrer o processo de digestão, de acordo com seu grupo, foi realizada a cessação da ação enzimática da solução de colagenase com esfriamento desta, utilizando 5 mL de HBSS a 4°C. Dessa solução foram retirados os fragmentos de tecidos não digeridos ou porções de omento por meio de sua passagem através de filtro com poros de 400 micrômetros. No isolamento pelo gradiente utilizou-se solução de Ficoll com densidades diferentes. A solução com tecido pancreático digerido e filtrado foi colocada em tubo de ensaio de 15 mL, e centrifugada a 3000 RPM por seis minutos, sendo o sobrenadante retirado cuidadosamente. O precipitado foi suspenso em 4 mL de Ficoll com densidade de 1.108 e homogeneizado. Essa camada foi então recoberta de maneira cuidadosa, para que não houvesse mistura entre as camadas, com 2 mL de Ficoll nas densidades 1.096, 1.085 e 1.037. Após, os tubos foram colocados em centrífuga refrigerada a 4°C na rotação de 800 RPM por 15 minutos, ocasionando a precipitação do tecido acinar e isolando as ilhotas. Estas ficam dispersas entre as densidades 1.037 e 1.085, sendo então retiradas e contadas.

## Contagem de ilhotas e teste de viabilidade com o uso do azul tripano

As ilhotas foram diluídas em solução de HBSS/FCS até completarem 3 mL e coradas com 30 mL da solução de ditizona. Duas amostras de 50 mL dessa suspensão foram colocadas sobre uma placa de Petri gradeada. Contou-se o número de ilhotas por meio de um microscópio com aumento de 20 vezes. Somaram-se as quantidades aferidas e multiplicaram-se pelo fator de diluição. As contagens foram feitas por dois examinadores independentes. Quando havia diferença maior que 10% entre os resultados, as contagens eram realizadas novamente.

Após a contagem, a outra amostra de 50mL era corada com azul tripano a 0,4% e agitada

levemente. Após 5 a 15 minutos, o número de ilhotas coradas pelo azul tripano era contabilizado e registrado por dois examinadores.

**Análise estatística**

Foram utilizados dados de descrição, como média, mediana, desvio padrão e amplitude interquartil. A comparação entre os grupos foi feita com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e, para identificar as diferenças significativas entre os grupos, foi utilizado o teste de Dunn.

**RESULTADOS**

Foram utilizados oito camundongos no grupo A e seis nos demais. As medianas da quantidade de ilhotas isoladas nos grupos A, B, C e D foram 9.142, 8.285, 2.813 e 3.199 respectivamente. A análise da variância não paramétrica entre a quantidade de ilhotas por grama de tecido pancreático dos quatro grupos apresentou uma diferença significativa, com valor de  $H = 17,44$  ( $\alpha = 0,01$ ). Os grupos com a imersão do tecido pancreático em solução de colagenase por 24 horas obtiveram três vezes mais ilhotas, quando comparados aos submetidos à digestão imediata,

conforme teste de Dunn com  $\alpha < 0,05$ . Não houve diferença entre as soluções de colagenase com concentrações de 1 e 2 mg/dL. Estes resultados e a comparação entre os grupos estão apresentados na Tabela 1 e na Figura 1.

Foram realizados 13 experimentos com testes de viabilidade com o corante vital azul tripano. Em um dos três experimentos dos grupos A e B, uma quantidade próxima a 5% das ilhotas analisadas coraram com azul tripano, demonstrando morte celular. Nos demais nenhuma ilhota corou, equivalendo a uma taxa de viabilidade maior que 95% para todos os grupos (Tabela 2).

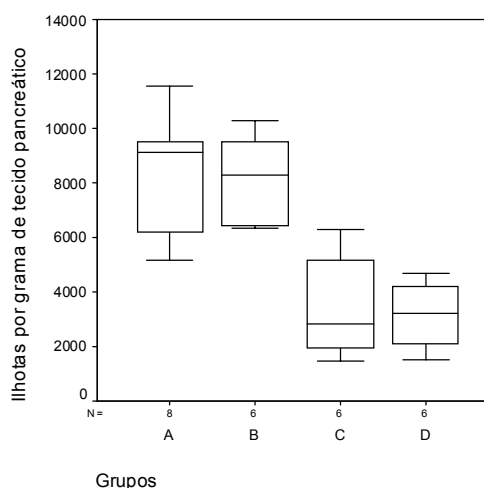


TABELA 1 - Descrição da quantidade de ilhotas isoladas por grama de pâncreas.

| Grupo | Número de experimentos | Média | Mediana <sup>1</sup> | Percentil 25 | Percentil 75 |
|-------|------------------------|-------|----------------------|--------------|--------------|
| A     | 8                      | 8.306 | 9.142 <sup>a</sup>   | 6.119        | 9.678        |
| B     | 6                      | 8.194 | 8.285 <sup>a</sup>   | 6.429        | 9.698        |
| C     | 6                      | 3.414 | 2.813 <sup>b</sup>   | 1.820        | 5.440        |
| D     | 6                      | 3.150 | 3.199 <sup>b</sup>   | 1.953        | 4.328        |

<sup>1</sup> As medianas indicadas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Dunn ( $\alpha=5\%$ )

Figura 1 - Quantidade de ilhotas de Langerhans isoladas, por grama de tecido pancreático de camundongos, conforme a concentração e o tempo de imersão na solução de colagenase a 4°C. Grupos: A) colagenase 1mg/mL, a 4°C por 24 horas e posterior aquecimento a 39°C por 15 minutos; B) colagenase 2mg/mL com as mesmas etapas anteriores; C) colagenase 1mg/mL com aquecimento da solução no mesmo dia da retirada, a 39°C por 15 minutos; D) colagenase 2mg/mL com aquecimento da solução no mesmo dia da retirada, a 39°C por 15 minutos.

TABELA 2 - Viabilidade das ilhotas isoladas, avaliada com o teste do corante vital azul tripano

| Grupo | Nº de ilhotas coradas por ditizona (1º amostra) | Nº de ilhotas coradas por ditizona (2º amostra) | Nº de ilhotas coradas por azul tripano (1º amostra) | Nº de ilhotas coradas por azul tripano (2º amostra) |
|-------|---|---|---|---|
| A     | 62  | 63  | 0   | 0   |
| A     | 40  | 45  | 0   | 0   |
| A     | 63  | 63  | 3   | 3   |
| B     | 52  | 55  | 3   | 3   |
| B     | 46  | 50  | 0   | 0   |
| B     | 39  | 39  | 0   | 0   |
| C     | 35  | 34  | 0   | 0   |
| C     | 37  | 34  | 0   | 0   |
| C     | 30  | 31  | 0   | 0   |
| C     | 21  | 18  | 0   | 0   |
| D     | 38  | 41  | 0   | 0   |
| D     | 33  | 36  | 0   | 0   |
| D     | 10  | 14  | 0   | 0   |

## DISCUSSÃO

Embora o transplante de ilhotas apresente-se como uma abordagem terapêutica atraente, uma das principais limitações é o baixo rendimento do isolamento de ilhotas por pâncreas, o que limita sua aplicação. Os camundongos são animais resistentes ao efeito diabetogênico da estreptozotocina, diferindo entre as linhagens.<sup>6,10,16,17</sup>

Quanto ao isolamento de ilhotas, o resultado encontrado no estudo confirma a teoria de que a melhor obtenção das ilhotas de pâncreas está diretamente relacionada com a capacidade de dissociar-se o tecido exócrino do endócrino.<sup>15,18,19</sup> A imersão em colagenase a frio durante um período de 24 horas (e conseqüentemente com seu efeito enzimático reduzido) possivelmente fez com que a solução de colagenase se difundisse pelo tecido pancreático triturado e envolvesse as ilhotas de Langerhans. Este modelo é similar ao método de isolamento com dois estágios de digestão,<sup>18</sup> no primeiro momento ocorrendo a distribuição pelo tecido pancreático da solução com colagenase em temperatura baixa, desfavorável à ação enzimática, e num segundo momento ocorrendo o processo de aquecimento do tecido, com conseqüente ativação da enzima, havendo uma melhor dissociação entre ácinos e ilhotas, facilitando a separação através do método de gradiente com ficoll. Cui et al.<sup>18</sup> infundiram solução de colagenase a 4°C pelo ducto pancreático e compararam o rendimento de ilhotas quando realizavam a digestão no momento da infusão ou duas horas após, verificando melhor rendimento após duas horas de incubação na solução de colagenase. O tempo menor utilizado por Cui et al., quando comparado às 24 horas utilizadas neste trabalho, deveu-se à maneira como a solução foi distribuída pelo tecido pancreático, através de seu ducto: sendo depositada perto dos ácinos, diminui o tempo necessário para a difusão da solução.<sup>18</sup> Esta suposição é reforçada por outro estudo que utilizou 48 horas de imersão.<sup>4</sup>

No grupo que ficou imerso em colagenase por 24 horas, foram isoladas em média 8.000 ilhotas, cerca de três vezes mais do que no sem imersão. Alguns aspectos sobre os métodos de aferição e contagem, principalmente em roedores pequenos como camundongos, devem ser levados em consideração quando avaliamos estes resultados. Há uma variação na metodologia e análise dos trabalhos descritos na literatura, dificultando a comparação entre os

mesmos.<sup>13,20-22</sup> A diferença está no método de retirada do tecido pancreático, pois o mesmo está disperso no omento entre as alças do intestino superior destes animais. Assim, a quantidade de pâncreas retirado varia de acordo com o examinador. O trabalho de Leow et al.<sup>22</sup> refere o isolamento de 425 ilhotas por pâncreas de linhagem C57B10, e esta diferença reside no fato de os referidos autores terem considerado apenas ilhotas com tamanho acima de 50 mm. Já no presente trabalho foram contabilizados todas as ilhotas visualizadas sob visão estereomicroscópica com aumento de 20 vezes, já que o objetivo do estudo era a comparação dos métodos.

Outra variável que interfere na contagem de ilhotas refere-se ao emprego de filtros para a solução contendo o tecido pancreático digerido, antes de submetê-lo à separação com gradiente de ficoll. Se forem empregados filtros com malhas pequenas (< 400 µm), estes retiram muitas ilhotas maiores da contagem.<sup>23</sup> Erros de técnica podem eventualmente ser responsáveis por discrepância entre os diferentes resultados, tais como o não cuidado com a homogeneização para a coleta de amostras ou erros sistemáticos nas técnicas de diluição.<sup>15</sup> Ainda como forma de minimizar o fator subjetividade nas contagens amostrais, foram empregados, neste trabalho, dois examinadores para cada contagem. Quando havia discrepância maior que 10% entre os resultados, novas amostras eram preparadas e contabilizadas.

Quanto ao teste de viabilidade, menos de 6% das ilhotas foram coradas com o azul tripano, demonstrando boa capacidade de sobrevivência das ilhotas, mesmo se submetidas a um processo de imersão por 24 horas a frio, conforme previamente demonstrado em estudos que preservaram as ilhotas junto com o tecido pancreático por 24 horas ou mais.<sup>4</sup> Esses métodos diferem dos que avaliam a viabilidade das ilhotas por 24 ou 48 horas a frio após o processo completo de isolamento.<sup>6</sup> É provável que o estresse imposto às ilhotas pela dissociação e isolamento diminua sua viabilidade, havendo por esse motivo necessidade de pesquisa de campo sobre soluções de preservação.<sup>7</sup>

Concluindo, a imersão do tecido pancreático, após sua retirada, em solução de colagenase a 4°C por 24 horas, antes do aquecimento, aumentou o rendimento do isolamento de ilhotas por grama de tecido pancreático, em comparação com o aquecimento da solução no mesmo dia da retirada. As diferentes concentrações das

soluções de colagenase testadas neste estudo (1 ou 2 mg/dl) não tiveram diferença no rendimento, com relação ao número de ilhotas isoladas. As ilhotas isoladas através do presente protocolo apresentavam-se viáveis quando testadas com o corante azul tripano.

## REFERÊNCIAS

- Schmidt MI, Branchtein L. Farmacologia clínica. In: Fuchs FD, Wannmacher L, editores. Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional. 2ª ed. Porto Alegre: Guanabara; 1998. p.550-60.
- The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: report. Diabetes Care. 1997;20:1183-97.
- Press M. Report of the 18<sup>th</sup>. workshop of the AIDSPIT (Artificial Insulin Delivery Systems, Pancreas and Islet Transplantation) Study Group. Diabetologia. 1999; 42:33-6.
- Dono K, Gotoh M, Monden M, et al. Low temperature collagenase digestion for islet isolation from 48-hour cold-preserved rat pancreas. Transplantation. 1994; 57:22-6.
- Arita S. Improve human islet isolation by a tube method for collagenase infusion. Transplantation. 1999;68:705-7.
- Delfino VDA. Efeito da inclusão do rutênio vermelho em 3 soluções de preservação celular sobre a viabilidade de ilhotas pancreáticas murinas recém-isoladas e preservadas a frio por 24 e 48 horas [tese]. Campinas (SP): UNICAMP; 2000.
- Delfino VD, Gray DW, Leow CK, et al. A comparison of four solutions for cold storage of pancreatic islets. Transplantation. 1993;56:1325-30.
- Suminoto R, Kamada N, Jamieson NV, et al. A comparison of a new solution combining histidine and lactobionate with UW solution and eurocollins for rat liver preservation. Transplantation. 1991;51:589-93.
- Lau HT, Yu M, Fontana A, et al. Prevention of islet allograft rejection with engineered myoblasts expressing FasL in mice. Science. 1996;273:109-12.
- Like AA, Rossini AA. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. Science. 1976;193:415-7.
- Like AA, Appel MC, Williams RM, et al. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis in mice: morphologic and physiologic studies. Lab Invest. 1978;38:470-86.
- Lukic ML, Stosic-Grujicic S, Shahin A. Effector mechanisms in low-dose streptozotocin-induced diabetes. Dev Immunol. 1998;6:119-28.
- Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islet of Langerhans from the rat pancreas. Diabetes. 1967;16:35-9.
- Junqueira LC, Carneiro J. Histologia básica. 8ª ed. Rio de Janeiro; Guanabara;1995.
- Gray DWR, Morris PJ. Development in isolated pancreatic islet transplantation. Transplantation. 1987; 42:321-30.
- Rossini AA, Apell MC, Williams M, et al. Genetic influence of the streptozotocin-induced insulinitis and hyperglycemia. Diabetes. 1977;26:916-20.
- Mendez JD, Ramos HG. Animal models in diabetes research. Arch Med Res. 1994;25:367-75.
- Cui W, Gu Y, Miyamoto M, et al. Novel method for isolation of adult porcine pancreatic islets with two-stage digestion procedure. Cell Transplant. 1999;8:391-8.
- Andersson A. Islet implantation normalises hyperglycaemia caused by streptozotocin-induced insulinitis. Lancet. 1979;1:581-4.
- Hamelmann W, Esmeraldo R, Gray DWR, et al. A simple method for isolation of islets from the rabbit pancreas. Transplantation. 1994;58:390-2.
- Tatarkiewicz K. Reversal of hyperglycemia in mice after subcutaneous transplantation of microencapsulated islet. Transplantation. 1999;67:665-71.
- Leow CK, Gray DWR, Morris PJ. Successful reversal of diabetes by single donor isolation islet transplantation in a mouse model. Cell Transplant. 1997;6:429-30.
- van der Burg MP, Guicherit OR, Frölich M, et al. Morphometry of native and isolated canine islets: a new approach to isolation assessment. Transplant Proc. 1994;26:632-3.

**Endereço para correspondência:**  
LUCIANO PASSAMANI DIOGO  
Hospital São Lucas da PUCRS  
Av. Ipiranga 6690  
CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil