

## MÉTODO DE ISOLAMENTO DE ILHOTAS PANCREÁTICAS PANCREÁTICAS DE CAMUNDONGOS

RAFAEL SCHERDIEN DA SILVA<sup>1</sup>, INES SCHADOCK<sup>2</sup>, AUGUSTO SCHNEIDER<sup>3</sup>,  
CARLOS CASTILHO BARROS<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Nutrigenômica-UFPEL – [rafaelscherdien@hotmail.com](mailto:rafaelscherdien@hotmail.com) –  
[augustoschneider@gmail.com](mailto:augustoschneider@gmail.com)

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina-FURG – [i.schadock@ymail.com](mailto:i.schadock@ymail.com)

<sup>3</sup> Laboratório de Nutrigenômica-UFPEL – [barroscapel@gmail.com](mailto:barroscapel@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

A diabetes mellitus, em especial a do tipo 2, é uma pandemia mundial. Estima-se que há mais de 475 milhões de diabéticos entre 20 e 79 anos no mundo e que é possível que esse número atinja 629 milhões até 2045(CHO et al). Dados da Federação Internacional de Diabetes (IDF) de 2013, indicava que haviam 11,9 milhões de diabéticos no Brasil, ocupando o quarto lugar no ranking dos países com maior prevalência de diabéticos (COSTA et al. 2017).

Um dos primeiros relatos do uso do método de isolamento de ilhotas pancreáticas com colagenase foi apresentado por MOSKALEWSKI (1964), o qual foi usado para isolar ilhotas pancreáticas de Porquinhos-da-índia. Com isso em mente, vemos a importância do método de isolamento de ilhotas pancreáticas em camundongos, para um possível aprimoramento do estudo do diabetes. O método de isolamento de ilhotas será usado em camundongos ob/ob obesos deficientes em leptina, modelos de obesidade severa e diabetes mellitus tipo 2, que serão testados em soluções com diferentes concentrações de glicose e posteriormente a ação de medicamentos antidiabéticos.

### 2. METODOLOGIA

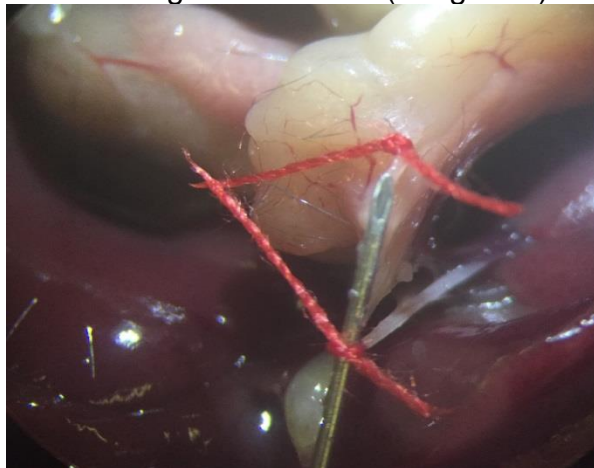
Meio de cultura tamponado básico para manipulação das ilhotas pancreáticas ex vivo:

Solução salina balanceada de Hank's:

- \* 800 ml de água destilada.
- \* NaCl - 0.15M
- \* KCl - 0.005M
- \* CaCl<sub>2</sub> - 0.001M
- \* MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0.0004M
- \* MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O - 0.0005M
- \* Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 0.0003M
- \* KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 0.0004M
- \* Glicose - 0.006M
- \* NaHCO<sub>3</sub> - 0.004M
- \* Completar a solução até com água destilada até chegar ao volume de 1 litro.

## Procedimento de isolamento das Ilhotas pancreáticas:

Método usado conforme descrito anteriormente por BARROS et al. (2012). Os camundongos, foram expostos a uma incisão abdominal. Utilizando um fio de sutura, o ducto pancreático foi obstruído próximo da ampola de Vater por ligadura para evitar o extravasamento da solução de collagenase para o intestino. Uma pequena incisão foi feita no ducto para introduzir uma agulha, com ajuda de uma lupa biocular Metrimplex, Hungary 6.3x a 80x e foi utilizado um fio de sutura de algodão e poliéster para fixar a agulha no ducto (Imagem 1).



**Imagem 1:** Agulha já dentro do ducto pancreático para injeção de solução de collagenase para digestão retrógrada do pâncreas exócrino.

Logo após Foi usada uma solução de collagenase a 0,2 U/mL ,em solução de Hanks. Três mililitros desta solução foi injetado no pâncreas via retrógrada, a fim de digerir o pâncreas exócrino sem danificar as ilhotas pancreáticas. Em seguida ao inflamento do pâncreas com esta solução, foi feita a remoção deste, o qual foi colocado em um tubo contendo 3 ml da mesma solução de collagenase preaquecida a 37°C, para encubação em banho maria por 7 minutos. A reação foi interrompida pela adição de solução de Hanks gelada (4°C) e os resíduos de collagenase foram removidos com 3 lavagens sequenciais após centrifugação. O conteúdo restante no tubo foi colocado em uma placa de petri e as ilhotas foram selecionadas manualmente entre os restos celulares com ajuda de uma lupa e um sistema de sucção.



**Imagem 2:** Ilhotas Pancreáticas já isoladas por processo descrito anteriormente.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a utilização desse método, foi possível isolar uma média de 30 a 80 ilhotas pancreáticas por camundongo testado. O resultado bate com relatos de rendimento de 40 ilhotas por camundongo (BOWEN, ANDRUS e LAFFERTY, 1980), mas difere de alguns estudos que indicam metodologias que isolem de 200 a 400 ilhotas pancreáticas por animal (SHEWADE, UMRANI e BHONDE, 1999). Isso indica que o método precise ser aprimorado antes de empregado em estudos de larga escala.

### 4. CONCLUSÕES

Conclui-se que o método de isolamento de ilhotas pancreáticas foi estabelecido no Laboratório de Nutrigenômica da Faculdade de Nutrição, porém ainda é possível fazer o aprimoramento deste. Esse método será usado para estudos sobre diabetes *ex vivo* podendo ser usado para ver o efeito de diferentes drogas sobre a secreção de insulina em ilhotas pancreática isoladas.

### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CHO, N.H. et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes research and clinical practice* 138 (2018) 271 – 281.
2. COSTA, Amine Farias et al. Carga do diabetes mellitus tipo 2 no Brasil. **Cad. Saúde Pública, Rio** de Janeiro, v. 33, n. 2, e00197915, 2017.
4. MOSKALEWSK, S. (1965). Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. *General and Comparative Endocrinology*, 5(3), 342–353. doi:10.1016/0016-6480(65)90059-6
3. BARROS, CC, Haro A, Russo FJVP, Schadock I, Almeida SS, et al. (2012) Altered Glucose Homeostasis and Hepatic Function in Obese Mice Deficient for Both Kinin Receptor Genes. *PLoS ONE* 7(7): e40573. doi: 10.1371/journal.pone.0040573
4. BOWEN, K. M., Andrus, L., & Lafferty, K. J. (1980). Successful Allotransplantation of Mouse Pancreatic Islets to Nonimmunosuppressed Recipients. *Diabetes*, 29(Supplement\_1), 98–104.
5. SHEWADE, YM. M Umrani, and R.R. Bhonde. Large-Scale Isolation of Islets by Tissue Culture of Adult Mouse Pancreas. *Transplantation Proceedings*, 31, 1721–1723 (1999).