

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:**  
**ENDOCRINOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES ENZIMAS DE DIGESTÃO USADAS PARA O**  
**ISOLAMENTO DE ILHOTAS PANCREÁTICAS HUMANAS ATRAVÉS DE**  
**UMA META-ANÁLISE DE COMPARAÇÃO DE MÚLTIPLOS**  
**TRATAMENTOS**

**DISSERTAÇÃO DO MESTRADO**

**JAKELINE RHEINHEIMER**

Porto Alegre, Setembro de 2013.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:**  
**ENDOCRINOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES ENZIMAS DE DIGESTÃO USADAS PARA O**  
**ISOLAMENTO DE ILHOTAS PANCREÁTICAS HUMANAS ATRAVÉS DE**  
**UMA META-ANÁLISE DE COMPARAÇÃO DE MÚLTIPLOS**  
**TRATAMENTOS**

**JAKELINE RHEINHEIMER**

**Orientadora: Profa. Dra. Daisy Crispim Moreira**

**Co-Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Bauermann Leitão**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências**  
**Médicas: Endocrinologia, da Universidade**  
**Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)**  
**como requisito parcial para obtenção do**  
**título de Mestre em Endocrinologia.**

Porto Alegre, Setembro de 2013.

## CIP - Catalogação na Publicação

Rheinheimer, Jakeline

Avaliação de diferentes enzimas de digestão usadas para o isolamento de ilhotas pancreáticas humanas através de uma meta-análise de comparação de múltiplos tratamentos / Jakeline Rheinheimer. -- 2013.

83 f.

Orientadora: Daisy Crispim.

Coorientadora: Cristiane Bauermann Leitão.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. comparação de múltiplos tratamentos. 2. meta-análise. 3. enzima de digestão. 4. isolamento de ilhotas humanas. I. Crispim, Daisy, orient. II. Leitão, Cristiane Bauermann, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha orientadora Dra. Daisy Crispim e co-orientadora Dra. Cristiane Leitão, exemplo de profissionais, pelo apoio, confiança e compreensão na conclusão deste trabalho.

Agradeço ainda, a minha orientadora Dra. Daisy Crispim por me mostrar o verdadeiro valor de uma amizade.

A Profa. Dra. Patricia Ziegelmann pela imensa colaboração neste trabalho e por estar sempre disposta a ajudar quando o assunto é estatística.

Aos meus queridos colegas e amigos do laboratório do Serviço de Endocrinologia, por todo apoio, companheirismo e momentos de descontração.

Aos meus pais, Loreno e Suzana, pelos valores que me transmitiram, pelo apoio, e por todo amor e carinho dedicados a mim. Aos meus irmãos, Janyelle, Janaina, Janderson e Jacson, por todo carinho.

Aos meus amigos e familiares, que me apoiaram, torceram por mim e me ajudaram de alguma forma.

Em especial, ao meu companheiro, Fernando, pelo amor, paciência e companheirismo dedicados nesses 7 anos e meio de convivência.

Por fim, agradeço a todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

**Dedico essa dissertação aos meus pais,  
pelo exemplo de vida e família.  
Ao meu companheiro Fernando,  
por todo carinho.**

Se, a princípio, a idéia não é absurda, então não há esperança para ela.

**Albert Einstein**

Esta dissertação de mestrado segue o formato proposto pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo apresentada na forma de um artigo de revisão e um artigo original sobre o tema da dissertação.

- **Artigo de Revisão:** “Transplante de ilhotas pancreáticas humanas: revisão da literatura e descrição da implantação de um laboratório de isolamento de ilhotas pancreáticas” (a ser submetido aos Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia).

- **Artigo Original:** “Diferentes enzimas de digestão usadas para o isolamento de ilhotas pancreáticas humanas: uma meta-análise do tipo comparação de tratamentos múltiplos (MTC)” (submetido à revista Transplantation).

## SUMÁRIO

<b>Lista de abreviaturas</b> .....	7
<b>Resumo</b> .....	9
<b>Abstract</b> .....	11
<b>Parte I – Artigo de revisão:</b> “Transplante de ilhotas pancreáticas humanas: revisão da literatura e descrição da implantação de um laboratório de isolamento de ilhotas pancreáticas”.....	13
<b>Parte II – Artigo original:</b> “Diferentes enzimas de digestão usadas para o isolamento de ilhotas pancreáticas humanas: uma meta-análise do tipo comparação de tratamentos múltiplos (MTC)”.....	45
<b>Conclusão</b> .....	83

## LISTA DE ABREVIATURAS

Artigo de revisão	
BIPH	Biologia das Ilhotas Pancreáticas Humanas
CITR	<i>Collaborative Islet Transplant Registry</i>
CQ	Controle de Qualidade
DM1	Diabetes Mellitus Tipo 1
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HbA1c	Hemoglobina Glicada
IEQ	Equivalentes de Ilhotas
IMC	Índice de Massa Corporal
ME	Morte Encefálica
UW	<i>University of Wisconsin</i>



---

**Artigo original**

---

BMI	Body Mass Index
cGMP	Current Good Manufacturing Practice
CIT	Cold Ischemia Time
CrIs	Credible Intervals
FE	Fixed Effect
GRADE	Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation
IEQ	Islet Equivalent Number
MTC	Mixed Treatment Comparison
NB	Neutral Protease
RE	Random Effect
SMD	Standardized Mean Difference
T1DM	Type 1 Diabetes Mellitus
WMD	Weighted Mean Difference

---

## RESUMO

O transplante de ilhotas, como tratamento do diabetes mellitus tipo 1 (DM1) “lábil”, tem progredido consideravelmente ao longo dos últimos 12 anos. Nesse período, aproximadamente 750 pacientes foram transplantados em diversos centros, com resultados promissores. No entanto, é evidenciada uma grande disparidade entre os centros de transplantes em relação ao sucesso do isolamento e aos desfechos pós-transplante. Alguns fatores podem explicar estas disparidades, como características do doador, qualidade do isolamento e o local da infusão das ilhotas. O isolamento das ilhotas é a fase mais complexa de todo o processo, devendo ser totalmente padronizada. O isolamento é feito com uma enzima de digestão, com auxílio físico e mecânico. A enzima Liberase HI era a enzima de escolha para a digestão do pâncreas, pois proporcionava uma boa quantidade e qualidade de ilhotas. No entanto, esta foi retirada do mercado em 2007, pois havia o risco de transmissão de encefalopatia espongiforme. Novas enzimas têm sido utilizadas e estão sendo testadas para a digestão do pâncreas; entretanto, não existe um consenso de qual enzima de digestão é mais eficiente no isolamento de ilhotas humanas. Devido à implantação do Laboratório de Biologia das Ilhotas Pancreáticas Humanas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre e a necessidade da definição da enzima mais eficiente a ser utilizada no isolamento das ilhotas, consideramos adequada a realização de uma meta-análise sobre o tema. Esta meta-análise será útil para a tomada de decisão de outros Centros de isolamento e transplante de ilhotas pancreáticas. Para realizar a meta-análise foi feita a busca dos artigos nos sites Embase, Cochrane e PubMed. Dos 755 artigos encontrados, 16 artigos preencheram os critérios de elegibilidade e foram incluídos na meta-análise do tipo comparação de tratamentos múltiplos (MTC). Nossos resultados revelaram que as

enzimas Vitacyte e Liberase MTF foram associadas a um pequeno aumento no rendimento das ilhotas [equivalentes de ilhotas (IEQ) /g pâncreas] quando comparadas com a Sevac [diferença média padronizada (95% intervalo de credibilidade) = -2.11 (-4.09 a -0.29) e -2.20 (-4.26 a -0.31), respectivamente]. Contudo, as demais comparações de enzimas não mostraram nenhuma diferença significativa em relação ao rendimento de ilhotas. Além disso, nos desfechos pureza e viabilidade não foi verificada diferenças significativas entre nenhuma das enzimas de digestão analisadas. Assim, a nossa meta-análise MTC sugere que as enzimas de digestão disponíveis para o isolamento de ilhotas possuem eficiência semelhante em relação a rendimento de ilhotas, pureza e viabilidade.

## **ABSTRACT**

Islet transplantation, as a treatment for brittle type 1 diabetes mellitus (DM1), has progressed considerably over the last 12 years. In this period, approximately 750 patients were transplanted in different centers, with promising results. However, a large disparity is observed among transplantation centers regarding the success of isolation and post-transplant outcomes. Some factors may explain these disparities, such as donor's characteristics, quality of the isolation and local of islet infusion. Islet isolation is the most complex phase of all process, and must be completely standardized. Isolation is performed using a digestion enzyme, with physical and mechanical aid. The Liberase HI enzyme was the enzyme of choice for pancreas digestion because it provided a good quantity and quality of islets. Nevertheless, this enzyme was withdrawn from the market in 2007 because there was a risk of transmission of bovine spongiform encephalopathy. New enzymes have been used and tested for pancreas digestion; however, there is no consensus about which is the digestion enzyme more efficient in human islet isolation. Due to the implementation of the Laboratory of Biology of Human Pancreatic Islets at Hospital de Clínicas de Porto Alegre and to the necessity to define the most efficient enzyme for being used in islet isolation, we consider appropriate to conduct a meta-analysis on the issue. This meta-analysis will be helpful for decision-making in other Centers of pancreatic islet transplantation. To carry out the meta-analysis we performed a comprehensive search for all entries in Pubmed, Embase and Cochrane libraries. Of 755 articles retrieved, 16 articles fulfilled the eligibility criteria and were included in a mixed-treatment comparison (MTC) meta-analysis. Our results revealed that Vitacyte and Liberase MTF were associated with a small increase in islet yield (islet equivalent number/g pancreas) when compared with Sevac enzyme

[standardized mean difference (95% credible interval) = -2.11 (-4.09 to -0.29) and -2.20 (-4.26 to -0.31), respectively]. However, all other enzyme comparisons did not show any significant difference regarding islet yield. Moreover, percentages of purity and viability were not significantly different among any of the analyzed digestion enzymes. Thus, our MTC meta-analysis suggests that the digestion enzymes currently being used for islet isolation works with similar efficiency regarding islet yield, purity and viability.

**Parte I**

**Artigo de Revisão**

**TRANSPLANTE DE ILHOTAS PANCREÁTICAS HUMANAS: REVISÃO DA  
LITERATURA E DESCRIÇÃO DA IMPLANTAÇÃO DE UM LABORATÓRIO DE  
ISOLAMENTO DE ILHOTAS PANCREÁTICAS**

**TRANSPLANTE DE ILHOTAS PANCREÁTICAS HUMANAS: REVISÃO DA LITERATURA E DESCRIÇÃO DA IMPLANTAÇÃO DE UM LABORATÓRIO DE ISOLAMENTO DE ILHOTAS PANCREÁTICAS**

**HUMAN PANCREATIC ISLET TRANSPLANTATION: LITERATURE REVIEW AND DESCRIPTION OF THE ESTABLISHMENT OF A PANCREATIC ISLET ISOLATION LABORATORY**

Jakeline Rheinheimer<sup>1,2</sup>

Cristiane Bauermann Leitão<sup>1,2</sup>

Andrea Carla Bauer<sup>1</sup>

Fernanda dos Santos de Oliveira<sup>1</sup>

Daisy Crispim<sup>1,2</sup>

1 - Laboratory of Biology of Human Pancreatic Islets; Endocrinology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre; 2 - Post Graduation Program in Medical Sciences: Endocrinology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brazil.

**Correspondence:**

Dr. Daisy Crispim

Rua Ramiro Barcelos 2350; prédio 12; 4º andar. CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: daisy\_crispim@hotmail.com

**Short title:** Transplante de Ilhotas Pancreáticas.

## RESUMO

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) está associado ao desenvolvimento de complicações crônicas de elevada morbi-mortalidade em indivíduos jovens em idade produtiva. A terapia intensiva com insulina comprovadamente diminui o aparecimento das complicações crônicas da doença. Entretanto, essa terapia ainda está associada ao aumento da incidência de hipoglicemia. Em pacientes com “DM1 lábil”, os quais apresentam hipoglicemias graves sem sintomas de alerta, o transplante de ilhotas pancreáticas humanas é uma das melhores alternativas para restaurar a secreção de insulina e a percepção da hipoglicemia. O grupo de *Edmonton* verificou que a maioria dos pacientes que receberam o transplante de ilhotas de mais de um doador e foram submetidos ao tratamento com imunossupressores obteve declínio considerável na independência à insulina após 8 anos do transplante, mas apresentou secreção persistente de peptídeo C e proteção completa contra reações hipoglicemiantes. Mais recentemente, dados do CITR (*Collaborative Islet Transplant Registry*) demonstraram taxas de independência à insulina de quase 50% dos pacientes após 3 anos do transplante. Sendo assim, o transplante de ilhotas é capaz de diminuir os níveis de glicose plasmática e HbA1c, reduzir a ocorrência de hipoglicemias graves e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. O objetivo deste artigo foi fazer uma breve revisão da literatura sobre o isolamento e transplante de ilhotas pancreáticas humanas e relatar a implantação de um laboratório de isolamento de ilhotas humanas no Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

**Palavras-chaves:** ilhotas pancreáticas humanas; diabetes mellitus tipo 1; isolamento de ilhotas; transplante de ilhotas.



## ABSTRACT

Type 1 diabetes mellitus (DM1) is associated with chronic complications of high morbidity and mortality in young adults in a productive age. Intensive insulin therapy has proved to reduce the development of chronic complications of diabetes. However, this therapy is still associated to an increased incidence of hypoglycemia. In patients with “brittle DM1”, who have severe hypoglycemia without any symptoms (hypoglycemia unawareness), pancreatic islet transplantation is one of the best alternatives for restoring insulin secretion and hypoglycemia perception. The *Edmonton* group found that the majority of patients who received islet of more than one donor and were treated with immunosuppressive drugs, obtained a considerable decline in insulin independence after eight years of transplantation, but showed persistent C-peptide secretion and complete protection against hypoglycemic reactions. More recently, data from CITR (*Collaborative Islet Transplant Registry*) demonstrated insulin independence rates of almost 50% of the patients after 3 years of transplantation. Therefore, islet transplantation is able to diminish plasmatic glucose and HbA1c levels, to reduce the occurrence of severe hypoglycemia, and to improve the quality of life of the patients. The purpose of this paper was to briefly review human islet isolation and transplantation process, and to report the establishing of a human islet isolation laboratory in the Endocrine Service at Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

**Keywords:** human pancreatic islets; type 1 diabetes mellitus; islet isolation; islet transplantation.

## INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é uma doença complexa caracterizada pelo comprometimento do metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, bem como pelo desenvolvimento tardio de complicações micro- e macrovasculares crônicas devido à hiperglicemia (1). O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é responsável por 10% dos casos de DM e é caracterizado pela destruição autoimune das células  $\beta$  pancreáticas, o que causa a deficiência total de secreção de insulina e a necessidade de administração de insulina exógena para a sobrevivência do indivíduo (1, 2).

Apesar de nas últimas décadas terem surgido avanços significativos no manejo dos pacientes com DM1 e existirem inúmeras apresentações comerciais de insulina (3-5), ainda hoje esta doença está associada ao desenvolvimento de complicações crônicas de elevada morbidade em indivíduos jovens em idade produtiva (6, 7). Além disso, existe uma fração dos pacientes com DM1 que apresenta o chamado “DM1 lábil”, o qual é caracterizado por incursões imprevisíveis da glicemia ao longo de poucas horas, com hiperglicemias seguidas por hipoglicemias graves, podendo evoluir para convulsões, coma e, até mesmo, morte (8). Neste grupo, o tratamento adequado ainda não foi estabelecido e terapias de substituição de células  $\beta$  através de transplante de pâncreas inteiro ou ilhotas são as únicas alternativas concretas capazes de restaurar a secreção de insulina endógena e a percepção dos sintomas hipoglicêmicos (9, 10).

O transplante de pâncreas como órgão inteiro promove controle glicêmico adequado e reduz a ocorrência das complicações crônicas, sendo indicado para pacientes com DM1 com insuficiência renal terminal, no momento do transplante renal (11, 12). Apesar dos pacientes submetidos ao transplante de pâncreas apresentarem uma boa sobrevida a longo prazo, esse tipo de transplante não é indicado para pacientes com

DM1 sem indicação de transplante renal, uma vez que o procedimento está associado à morbi-mortalidade de uma cirurgia de grande porte (9, 11, 12). Nestes casos, o transplante alogênico de ilhotas pancreáticas é, atualmente, uma opção. O transplante de ilhotas não requer cirurgia ou anestesia geral. Isto ocorre porque somente as ilhotas são purificadas e infundidas no fígado pela veia porta (**Figura 1**), através de técnicas de radiologia (9).

Sendo assim, nosso objetivo foi realizar uma breve revisão da literatura sobre o isolamento e o transplante de ilhotas pancreáticas humanas em pacientes com DM1 e relatar o estabelecimento de um Laboratório para isolamento de ilhotas pancreáticas humanas no Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

## **HISTÓRICO DO TRANSPLANTE DE ILHOTAS PANCREÁTICAS**

Os primeiros relatos de tentativas de “transplante” de ilhotas pancreáticas ocorreram em 1894 (13), mas foi somente em 1972 que Lacy (14) conseguiu reverter a hiperglicemia de roedores diabéticos após a infusão de ilhotas normais. Na década de 1980 foram relatados transplantes autólogos de ilhotas pancreáticas em pacientes submetidos à pancreatectomia total por dor intratável decorrente de pancreatite crônica (15), com obtenção de independência de insulina até 13 anos após o transplante (16). A partir destes resultados, muitos pesquisadores pensaram que a utilização do transplante de ilhotas para tratamento do DM1 traria uma possível cura para essa doença.

No entanto, as primeiras tentativas de transplante alogênico de ilhotas pancreáticas em humanos não obtiveram resultados muito animadores, com taxa de independência de insulina de apenas 10% (17-19). Dados obtidos a partir do *Islet*

*Transplant Registry (ITR)*, no período de 1983 a 2000, documentam um total de 493 transplantes realizados em todo o mundo, com taxas de independência de insulina decrescentes com o passar do tempo após o transplante: 66% após 1 mês, 40% após 1 ano, 22% após 2 anos, 11% após 3 anos, 6% após 4 anos e apenas 2% após 5 anos (20).

A criação do protocolo de *Edmonton*, em 2000, possibilitou melhores resultados, com 100% de independência de insulina um ano após o transplante em sete pacientes (21). A melhor resposta ao transplante foi atribuída basicamente aos seguintes fatores: regime de imunossupressão sem uso de corticóides (indução com daclizumab e manutenção com sirolimus e baixa dose de tacrolimus) e múltiplas infusões de ilhotas de mais de um doador com o objetivo de aumentar a massa de ilhotas transplantada (21). Em 2005, o mesmo grupo relatou os resultados após 5 anos de seguimento de 65 pacientes submetidos ao transplante de ilhotas. A duração média da independência de insulina foi de 15 meses e apenas 10% dos pacientes permaneceram livres de insulina após 5 anos (22).

O protocolo de *Edmonton* foi reproduzido posteriormente em um estudo multicêntrico organizado pelo *Immune Tolerance Network* e que envolveu 36 pacientes com DM1 de nove centros dos EUA e Europa (23). Apenas 13,8% dos pacientes permaneceram livres de insulina após 2 anos de seguimento, mas aqueles pacientes que mantiveram pelo menos função parcial do enxerto tiveram uma melhora substancial do controle metabólico (23). As taxas de sucesso foram bastante variáveis entre os centros envolvidos no estudo, sendo que os centros com maior experiência obtiveram os melhores resultados, com até 80% dos pacientes permanecendo livres de insulina após 1 ano (23).

Os resultados apresentados levaram a um aumento significativo no número de transplantes de ilhotas nos centros de pesquisa já existentes na época e incentivou a

abertura de outros centros de transplante de ilhotas no mundo inteiro (<http://citregistry.org>). O CITER – *Collaborative Islet Transplant Registry* é uma organização criada para monitorizar o progresso e promover a segurança dos transplantes de ilhotas, através de registro, análise e comunicação de dados abrangentes e atuais sobre o andamento de todos os transplantes de ilhotas realizados na América do Norte, bem como alguns centros Europeus e Australianos. Setenta e seis centros ao redor do mundo realizavam transplantes de ilhotas no ano de 2005 (24) e, até maio de 2011, 730 pacientes já haviam sido transplantados ao redor do mundo (25). Apesar de alguns países, como o Canadá e Suíça, já realizarem o transplante de ilhotas como tratamento clínico para indivíduos com DM1 (26, 27), na maioria dos países esta terapêutica não está amplamente disponível para todos os potenciais candidatos, sendo ainda considerada como procedimento experimental (28).

O transplante de ilhotas tem apresentado, progressivamente, melhores resultados ao longo dos últimos anos. Isso pode ser evidenciado por um estudo recente realizado pelo CITER onde foram analisados resultados de 677 pacientes transplantados nos períodos de 1999 a 2010, os quais foram subdivididos em 3 grupos de acordo com o período do transplante: “*Early Era*” (de 1999 a 2002), “*Mid Era*” (2003 – 2006) e “*Recent Era*” (2007 – 2010). Foram avaliados 5 desfechos principais: presença de pectídeo C, queda da HbA1c, estabilização da glicemia de jejum, independência à insulina e frequência de hipoglicemias (29). Na era mais recente foi evidenciada uma melhora significativa nos desfechos, em geral. Com taxas de independência à insulina nos pacientes com DM1 de quase 50% após 3 anos do transplante (25, 29). Esse resultado foi, provavelmente, devido a alguns fatores, como o aperfeiçoamento das técnicas de isolamento e cultura de ilhotas, melhora no esquema imunossupressor de indução e manutenção, melhora na seleção de pacientes e melhor conhecimento e

entendimento das características e necessidades das células  $\beta$  (29). Atualmente, o Centro de Vancouver, no Canadá, está realizando o primeiro estudo que compara os desfechos do transplante de ilhotas com aqueles do tratamento clínico padrão (<http://chitbr.med.ubc.ca>).

No Brasil existem atualmente dois Laboratórios de isolamento de ilhotas pancreáticas que já realizaram transplantes: em São Paulo, vinculado a Universidade de São Paulo (USP), está o NUCEL (Núcleo de Terapia Celular e Molecular), que já realizou 3 transplantes de ilhotas, sendo o primeiro em 2002 (30); e o outro em Curitiba (Paraná), vinculado a PUC-PR e Fundação Pró-Renal, que realizou seu primeiro transplante em novembro de 2006 (31).

O Serviço de Endocrinologia - HCPA inaugurou seu Laboratório de isolamento de ilhotas pancreáticas humanas em novembro de 2010 e já realizou 21 isolamentos de ilhotas. Desde então vem trabalhando no aprimoramento da técnica de isolamento e cultura das ilhotas e na realização dos testes de controle de qualidade (CQ) das ilhotas isoladas, para a futura realização de um projeto pré-clínico fase III de transplante de ilhotas em pacientes com “DM1 lábil”.

## **ISOLAMENTO DE ILHOTAS PANCREÁTICAS HUMANAS**

O objetivo principal do isolamento das ilhotas é liberá-las do tecido conectivo e exócrino, preservando a integridade estrutural e funcional das ilhotas pancreáticas (32). Os métodos de isolamento de ilhotas melhoraram significativamente nas últimas três décadas (9, 18) e o avanço fundamental nesta área veio com o uso do método semiautomático para digestão controlada do pâncreas desenvolvido por Camillo Ricordi em 1989 (33). Esse método é composto pelas seguintes etapas: limpeza do pâncreas,

canulação dos ductos pancreáticos, perfusão, distensão e digestão enzimática do pâncreas, diluição, purificação e cultura das ilhotas (**Figura 2**).

O processo laboratorial inicia-se com o recebimento e verificação das condições do pâncreas pela equipe de isolamento e termina com a liberação das ilhotas isoladas para o transplante ou pesquisa pela equipe de CQ. A primeira etapa do processamento do pâncreas é a limpeza do órgão, isto é, a retirada de gordura e a lavagem com soluções antibióticas e antifúngicas. A fase seguinte é a separação das ilhotas do pâncreas exócrino e tecido ductal por digestão, realizada através da perfusão de uma colagenase purificada no ducto pancreático. Neste processo ocorre aumento do volume do pâncreas (distensão). O pâncreas é então cortado e transferido para a Câmara de Ricordi (33), que contém 7-9 esferas de silicone e é preenchida com solução de colagenase, para a realização da fase de digestão, a qual é auxiliada pela agitação mecânica da câmara (digestão química e mecânica). O tecido pancreático digerido é coletado em um grande volume de solução de diluição, a qual interrompe a digestão. No passo de purificação, as ilhotas são separadas do tecido exócrino usando-se gradientes de densidade contínuos ou descontínuos na centrífuga COBE 2991. A purificação tem por objetivo garantir a infusão de uma maior quantidade de ilhotas em um volume menor de tecido, a fim de se reduzir o risco de desenvolvimento de hipertensão portal (19). Após o isolamento é realizada a cultura das ilhotas por até 3 dias (34, 35).

Segundo a *Food and Drug Administration (FDA)*, para que as ilhotas alogênicas possam ser disponibilizadas como uma terapia viável, alguns problemas devem ser abordados, tais como: segurança, pureza, potência e eficácia das ilhotas. Para que o lote de ilhotas seja aprovado, o produto final do isolamento e o processo usado para isolar e purificar as ilhotas terão que ser definidos e validados, demonstrando a consistência da qualidade do produto (36). Sendo assim, a última etapa do processo de isolamento das

ilhas é constituída pelos testes de CQ, os quais são: avaliação da pureza, número de equivalentes de ilhotas (IEQ – um IEQ corresponde a uma ilha com 150 µm ou mais de diâmetro), viabilidade e função das células e esterilidade (37).

A avaliação da pureza (isto é, a quantidade de ilhotas em comparação a outros tecidos) é realizada nas diversas etapas do isolamento e após a cultura das ilhotas. A pureza deve ser >30% para que as ilhotas sejam liberadas para o transplante. O número de IEQ é determinado pelo diâmetro estimado das ilhotas e o lote somente é liberado para transplante caso o IEQ seja >5000 IEQ/kg do recipiente em um volume de no máximo 5-10 ml (37). A viabilidade das ilhotas (número de células vivas/número de células mortas) é determinada pela integridade da membrana celular após coloração com dois corantes (diacetato de fluoresceína, que cora em verde as células viáveis, e iodeto de propídeo, que cora em vermelho as células com membrana celular danificada) e visualização em um microscópio de fluorescência (38). O lote de ilhotas é liberado se apresentar viabilidade acima de 70%. A função das ilhotas é avaliada pela determinação dos níveis secretados de insulina após incubação estática com glicose em baixas e altas concentrações (21). A esterilidade do material é comprovada através de cultura para bactérias aeróbicas e anaeróbicas, cultura para fungos e micoplasma e teste para presença de endotoxinas (19, 37).

## **PRINCIPAIS DESAFIOS**

Os desafios para implantação de um laboratório de isolamento de ilhotas humanas são inúmeros e podem ser divididos em: financeiros, administrativos, técnico-laboratoriais e médicos (10, 18, 32, 39).



## **Desafios financeiros e administrativos**

O alto investimento inicial, referente à compra de equipamentos e gastos relacionados à realização de obras para adequação do espaço físico, é expressivo. Além disso, os custos relacionados à manutenção do laboratório, pagamento de profissionais treinados e compra de reagentes e outros materiais necessários para cada isolamento necessitam ser cuidadosamente planejados (39, 40). Em 2004, um estudo francês avaliou o custo do transplante de ilhotas desde a retirada do órgão do doador, ao transplante e posterior acompanhamento dos pacientes transplantados, e mostrou que o processo de isolamento das ilhotas realizado no laboratório é a fase mais dispendiosa, correspondendo a 30% dos gastos totais (41). Como, em muitos países, o transplante de ilhotas é ainda considerado um procedimento experimental, as fontes requeridas para o desenvolvimento e manutenção do laboratório geralmente dependem de fundos de pesquisas governamentais e não governamentais.

Uma equipe administrativa bem estruturada também é essencial para garantir o bom funcionamento das atividades laboratoriais e médicas relacionadas ao transplante (10). Além disso, o desenvolvimento de um laboratório de isolamento de ilhotas para transplante deve seguir aspectos regulatórios específicos. Nos EUA, o processamento de ilhotas para transplante deve seguir normas para uso de “medicamentos” e “produtos biológicos”, estabelecidas pela *FDA* e pelo *Public Health Service Act* (42). No Brasil ainda não há uma legislação que regule especificamente o transplante de ilhotas. No entanto, a construção do laboratório e todas as etapas do isolamento das ilhotas devem estar de acordo com as normas das Resoluções - RDC Nº 210 (“Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos”, de 04 de agosto de 2003) e RDC Nº 9 (“Disposição sobre o funcionamento dos Centros de Tecnologia Celular para fins de pesquisa clínica

e terapia”, de 14 de março de 2011) - da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (43, 44), já que as ilhotas também são consideradas como um medicamento constituído por produto biológico e como terapia celular (39).

Devido à complexidade do procedimento utilizado, o isolamento bem sucedido das ilhotas só é possível com o envolvimento de uma equipe multidisciplinar comprometida e devidamente treinada, que atuem respeitando os padrões internacionais de isolamento e CQ das ilhotas (39). A equipe deverá ser formada por técnicos, biólogos, biomédicos, bioquímicos, médicos endocrinologistas e nefrologistas, cirurgiões, radiologistas e enfermeiras.

### **Desafios médicos relacionados ao doador**

A escassez de doadores de órgãos em morte encefálica (ME) deve ser sempre levada em conta como uma das principais limitações para a maioria dos centros que fazem transplante de ilhotas (10). No Brasil, conforme dados da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos, somente 6,3% (n = 80) dos pâncreas disponíveis de doadores de órgãos (n = 1273) foram utilizados no 1º semestre de 2013 (45). O restante poderia ter sido disponibilizado para a realização do isolamento das ilhotas, o que demonstra oferta adequada de órgãos para a instalação de um programa de transplante de ilhotas.

As ilhotas começam a ser danificadas mesmo antes da retirada do pâncreas, uma vez que a ME está relacionada à produção de citocinas proinflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, as quais induzem apoptose das células e diminuem a qualidade do enxerto (46). Além disso, os centros de isolamento de ilhotas geralmente recebem pâncreas não utilizados para o transplante de órgão inteiro, o que faz com que o tempo de isquemia fria do órgão seja acima do ideal (>12h) (10). Como a isquemia causa

grandes danos ao tecido pancreático, o tipo de solução usada para preservação do pâncreas e diminuição dos efeitos deletérios da hipóxia tem um papel importante no resultado do transplante (32). A principal solução de preservação utilizada atualmente é a solução de UW (*University of Wisconsin*), a qual contém glicose, alguns eletrólitos, glutatona e outras substâncias que preservam a integridade celular (32). Mais recentemente, o uso combinado da solução UW e compostos com alta afinidade por oxigênio (método de duas camadas com perfluorocarbono) melhorou a preservação do órgão em alguns estudos (47, 48), mas seu papel parece ser mais relevante nos casos de isquemia fria prolongada (49).

Características do doador, tais como idade, sexo, história médica prévia, IMC (índice de massa corporal), causa de morte, uso de agentes vasopressores e o tamanho e o conteúdo de gordura do pâncreas são fatores que influenciam a qualidade das ilhotas isoladas (32, 50). Pâncreas de doadores com um IMC  $>25 \text{ kg/m}^2$  e/ou com mais de 50 anos de idade estão associados a um número maior de ilhotas isoladas; porém estas ilhotas podem ter sua função prejudicada (50, 51).

### **Desafios técnico-laboratoriais**

Um dos estágios primordiais para o sucesso do transplante de ilhotas é o laboratorial. Neste processo, caso a quantidade de ilhotas isoladas seja insuficiente poderá não ser realizado o transplante (10). O trauma mecânico causado às ilhotas durante o isolamento e a própria ação da enzima colagenase usada durante a fase de digestão podem fragmentar as ilhotas, danificando principalmente as células  $\alpha$ ,  $\delta$  e PP, localizadas na periferia das ilhotas (**Figura 3**) (52). Adicionalmente, as complexas redes vasculares e neuronais do pâncreas são destruídas durante o isolamento, o que modifica a

comunicação bioquímica entre as células. Dessa forma, o isolamento das ilhotas resulta em estresse oxidativo e inflamatório, ocasionando perda da viabilidade celular (52).

As dificuldades relacionadas ao isolamento das ilhotas aumentaram nos últimos 4 anos porque a enzima colagenase anteriormente utilizada (*Liberase HI, Roche Pharmaceuticals*) foi retirada do mercado, pois havia o risco de transmissão de encefalopatia espongiiforme, uma vez que durante a sua produção se utilizava um meio de cultura que continha extrato de cérebro bovino (53). Novas colagenases estão sendo testadas para a digestão do pâncreas, obtendo resultados encorajadores (54). No entanto, ainda hoje, não existe um consenso de qual enzima de digestão seria mais eficiente para o isolamento de ilhotas humanas (55). Baseando-se no que foi discutido acima, vários centros de transplante de ilhotas têm focado suas pesquisas nestas novas enzimas de digestão, em meios de cultura mais apropriados para manter a viabilidade e a função das ilhotas e em mudanças no protocolo de isolamento, para que no futuro seja necessário o enxerto de ilhotas isoladas de apenas um único doador em cada paciente transplantado (55).

### **Desafios relacionados ao receptor**

O acompanhamento dos pacientes após o transplante deve ser realizado por uma equipe médica treinada em endocrinologia, terapia imunossupressora e prevenção de infecções. O tratamento adequado das complicações pós-transplante minimiza drasticamente a morbidade relacionada ao procedimento (10).

No transplante de ilhotas, assim como no transplante de pâncreas, a persistência ou reaparecimento de autoanticorpos para componentes das ilhotas estão correlacionados a uma piora na evolução e podem ser fatores chaves na falência do

enxerto (56). Características dos pacientes também influenciam o resultado do transplante. Os pacientes mais jovens, com maior HbA1c, com perfil clínico sugestivo de resistência à ação da insulina e valores de lipídios séricos mais elevados na avaliação pré-transplante apresentam maior risco de perda precoce do enxerto (57).

A avaliação da função do enxerto e os efeitos colaterais das drogas imunossupressoras necessitam atenção especial por parte da equipe médica. Estima-se que 50-70% das ilhotas são destruídas no período imediato após o transplante, devido às características únicas do fígado, o qual está exposto a elevados níveis de glicose, lipídeos e toxinas, e também pelo efeito danoso das drogas imunossupressoras sobre a secreção de insulina e viabilidade das ilhotas (58). Entretanto, após 3 meses, as ilhotas sobreviventes já estão envolvidas em tecido endotelial e uma rede de capilares, como demonstrado em um modelo de primata não-humano. A avaliação da função das ilhotas remanescentes após esse período é uma tarefa difícil e, atualmente, não existe uma forma direta de determiná-la (10). As formas indiretas mais utilizadas para avaliação da função das células  $\beta$  são: a medida do peptídeo-C durante alimentação (*mixed meal test*) (59); a taxa de glicose/ peptídeo-C e o escore beta (determinado a partir dos valores de glicose plasmática, HbA1c, dose diária de insulina e secreção de peptídeo-C após estimulação) (60). Mais recentemente, Caumo et al. (61) descreveram o escore de “Função Estimada do Transplante”, o qual se baseia apenas na dose diária de insulina e níveis de HbA1c e pode ser normalizado pelo número de ilhotas infundidas. Entretanto, estas medidas indiretas não são ideais para se avaliar a rejeição do enxerto, uma vez que monitoram a homeostase de glicose, a qual pode ainda estar intacta durante os estágios iniciais de rejeição (32). O desenvolvimento de métodos clínicos não invasivos para detecção da rejeição do enxerto em uma fase inicial será um passo muito importante para aumentar o sucesso dos transplantes, já que poderá permitir a realização de

intervenções mais específicas com o objetivo de prevenir a rejeição do enxerto (32). Métodos radiológicos para se detectar danos às ilhotas antes do surgimento do defeito metabólico têm também sido investigados. Monitoramento por ressonância magnética das ilhotas marcadas com ferro é um método seguro e viável, mas necessita ser otimizado (62).

Os níveis plasmáticos dos imunossuppressores usados no protocolo de *Edmonton* devem ser monitorados com cuidado, objetivando-se um balanço entre a prevenção da rejeição do enxerto e a minimização dos efeitos colaterais já mencionados (10). Como tanto o tacrolimus quanto o sirolimus interferem negativamente na função e proliferação das células  $\beta$  (63, 64), a modificação do regime de imunossupressão do protocolo de *Edmonton* deverá trazer efeitos positivos na função e sobrevivência do enxerto.

## **IMPLANTAÇÃO DE UM LABORATÓRIO DE ISOLAMENTO DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS HUMANAS NO HCPA**

O Laboratório de Biologia das Ilhotas Pancreáticas Humanas (BIPH) foi construído no Serviço de Endocrinologia do HCPA com o objetivo de realizar o isolamento das ilhotas humanas para: 1) desenvolvimento de estudos experimentais visando o aumento da quantidade e qualidade das ilhotas isoladas; 2) realização de estudos relacionados a alterações funcionais das células  $\beta$  em diferentes situações fisiológicas e patológicas; e 3) futura infusão em pacientes com “DM1 lábil”. O laboratório de BIPH foi construído em uma área de 63,6 m<sup>2</sup> localizada dentro do Serviço de Endocrinologia. A construção do laboratório foi iniciada em 2008 e concluída em 2010 e seguiu as normas estabelecidas pelas RDCs 134 e 210 da ANVISA (43) e as recomendações da equipe de

transplante de ilhotas do *Diabetes Research Institute, University of Miami* (EUA). A maior parte das obras de construção do laboratório foi custeada pelo HCPA (**Tabela 1**).

O laboratório de BIPH está de acordo com os padrões estabelecidos para salas cirúrgicas com respeito à pressão positiva interna, uso de ar-condicionado com sistema de filtração HEPA (*high efficiency particulated air*) e acesso restrito. O controle ambiental mantém o vestiário em Classe 100.000 (até 100.000 partículas de 0,5 micron ou maiores por m<sup>3</sup> de ar) e todo o restante da área interna em Classe 10.000. Além do vestiário para vestimenta das vestimentas estéreis, o laboratório inclui a área de escovação das mãos, a área interna para isolamento e cultura das ilhotas, um depósito para reagentes, uma câmara-fria e uma antecâmara de saída do laboratório. Todo o mobiliário do laboratório é feito de inox para facilitar a limpeza e impedir a contaminação por microorganismos. A área externa do laboratório, no Serviço de Endocrinologia, apresenta um Laboratório de Biologia Molecular e Celular, uma sala de lavagem de vidrarias com autoclave e uma sala de CQ das ilhotas isoladas, a qual contém um microscópio de fluorescência e uma leitora de microplacas de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*).

Os seguintes equipamentos foram adquiridos para o início das atividades do Laboratório de BIPH: 3 capelas de fluxo laminar classe IIA, 2 incubadoras para cultura de células, 2 centrífugas refrigeradas, 1 lavadora automática de células (COBE 2991), 2 balanças analíticas, 1 bomba à vácuo, 2 bombas peristálticas, 1 freezer -80°C, 1 freezer -20°C, 1 refrigerador tipo banco de sangue, 1 microscópio de fluorescência invertido para CQ, 1 microscópio de contraste de fase, 2 microscópio tipo lupa com sistema de fotodocumentação, 1 sonda de temperatura para monitoramento da temperatura de digestão, 2 Câmaras de Ricordi (*Biorep Technologies*, Flórida, EUA), 1 *gradient maker* (*Biorep Technologies*, Flórida, EUA), 1 leitora de microplacas de ELISA, 1 lavadora de

microplacas e 1 contêiner de nitrogênio líquido para congelamento de células. Uma descrição detalhada de todos os equipamentos, reagentes e materiais de consumo necessários para o isolamento das ilhotas já foi relatada por outros autores (21, 39). O gasto inicial com a compra de equipamentos e reagentes está descrito na **Tabela 1**.

O núcleo da equipe de isolamento de ilhotas é formado por uma médica nefrologista e por uma bióloga, ambas contratadas pelo HCPA e que realizaram treinamento por um a dois anos em centros de referência no exterior. A médica recebeu treinamento no *Diabetes Institute for Immunology and Transplantation* (Universidade de Minnesota, Minneapolis, EUA). A bióloga recebeu treinamento no *Laboratory of Experimental Medicine* da *Free University of Brussels* (Bruxelas, Bélgica) sobre isolamento de ilhotas de ratos e estudos da função das células  $\beta$ . Além disso, a equipe conta com o auxílio de uma médica endocrinologista que recebeu treinamento no *Diabetes Research Institute da University of Miami* (Flórida, EUA) sobre isolamento de ilhotas humanas e monitoramento e tratamento dos pacientes transplantados. A equipe de isolamento é auxiliada por alunos de iniciação científica, alunos de mestrado e doutorado, por um bolsista de apoio técnico e um aluno de pós-doutorado, os quais recebem bolsas disponibilizadas por agências nacionais de fomento à pesquisa (**Tabela 1**). A equipe cirúrgica responsável pela retirada dos órgãos é formada por 2 médicos contratados da Equipe de Transplante de Fígado do HCPA (órgãos de doadores em ME).



## CONCLUSÕES

O transplante de ilhotas pancreáticas deve ser considerado como um tratamento capaz de diminuir a ocorrência de hipoglicemias graves e melhorar o controle glicêmico em alguns pacientes diabéticos selecionados. Entretanto, no Brasil e em diversos outros países, o procedimento é considerado ainda pesquisa experimental. Dessa forma, esforços têm sido feitos para melhorar as diversas etapas do isolamento, do transplante de ilhotas e do seguimento dos pacientes após o transplante para que esse procedimento possa ser incorporado na prática clínica.

A implantação de um laboratório de isolamento de ilhotas é um processo complexo e demorado e que necessita de investimento alto. O Laboratório de BIPH do Serviço de Endocrinologia do HCPA espera fornecer ilhotas humanas para pesquisa e, futuramente, se tornar um centro de referência de transplantes de ilhotas e pesquisa da função das células  $\beta$  no Brasil.

## REFERÊNCIAS

1. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2013; 36 Suppl 1S67-74.
2. Pugliese A, Skyler JS, George S, Eisenbarth: insulin and type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2013; 36(6): 1437-42.
3. Langendam M, Luijf YM, Hooft L, Devries JH, Mudde AH, Scholten RJ. Continuous glucose monitoring systems for type 1 diabetes mellitus. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2012; 1CD008101.
4. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulindependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1993; 329(14): 977- 86.
5. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care*. 2006; 29 Suppl 1S4-42.
6. SBD. Classificação Etiológica do Diabetes Mellitus. Sociedade Brasileira do Diabetes. 2009; 13-17.
7. Kobayashi N. The current status of islet transplantation and its perspectives. *The review of diabetic studies : RDS*. 2008; 5(3): 136-43.
8. Ryan EA, Shandro T, Green K, Paty BW, Senior PA, Bigam D, et al. Assessment of the severity of hypoglycemia and glycemic lability in type 1 diabetic subjects undergoing islet transplantation. *Diabetes*. 2004; 53(4): 955-62.
9. Ichii H, Ricordi C. Current status of islet cell transplantation. *J Hepatol-Bil Panc Surg*. 2009; 16(2): 101-12.
10. Leitao CB, Tharavanij T, Cure P, Pileggi A, Baidal DA, Ricordi C, et al. Restoration of hypoglycemia awareness after islet transplantation. *Diabetes Care*. 2008; 31(11): 2113-15.

11. Gruessner RW, Sutherland DE, Kandaswamy R, Gruessner AC. Over 500 solitary pancreas transplants in nonuremic patients with brittle diabetes mellitus. *Transplantation*. 2008; 85(1): 42-47.
12. Vardanyan M, Parkin E, Gruessner C, Rodriguez Rilo HL. Pancreas vs. islet transplantation: a call on the future. *Curr Opin Org Transp*. 2010; 15(1): 124-30.
13. Williams P. Notes on diabetes treated with extract and by grafts of sheep's pancreas. *Br Med J*. 1894; 21303-4.
14. Lacy PE, Walker MM, Fink CJ. Perfusion of isolated rat islets in vitro. Participation of the microtubular system in the biphasic release of insulin. *Diabetes*. 1972; 21(10): 987-98.
15. Najarian JS, Sutherland DE, Baumgartner D, Burke B, Rynasiewicz JJ, Matas AJ, et al. Total or near total pancreatectomy and islet autotransplantation for treatment of chronic pancreatitis. *Ann Surg*. 1980; 192(4): 526-42.
16. Robertson RP, Lanz KJ, Sutherland DE, Kendall DM. Prevention of diabetes for up to 13 years by autoislet transplantation after pancreatectomy for chronic pancreatitis. *Diabetes*. 2001; 50(1): 47-50.
17. Leitao CB, Cure P, Tharavani T, Baidal DA, Alejandro R. Current challenges in islet transplantation. *Curr Diab Rep*. 2008; 8(4): 324-31.
18. Merani S, Shapiro AM. Current status of pancreatic islet transplantation. *Clin Sci (Lond)*. 2006; 110(6): 611-25.
19. Robertson RP. Islet transplantation as a treatment for diabetes - a work in progress. *N Engl J Med*. 2004; 350(7): 694-05.
20. Brendel MD HB, Schultz AO, Bretzel RG., cartographer International Islet Transplant Registry Newsletter 92001.
21. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med*. 2000; 343(4): 230-38.

22. Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Alfadhli E, Kneteman NM, et al. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes*. 2005; 54(7): 2060-69.
23. Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, Auchincloss H, Lindblad R, Robertson RP, et al. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med*. 2006; 355(13): 1318-30.
24. Johnson PRV. Challenges in setting up a new islet transplant program. In: Shapiro AMJ SJ, editor. *Islet Transplantation and Beta Cell Replacement Therapy* ed. New York: Informa Healthcare USA; 2007. p. 203-14.
25. Shapiro AM. Islet transplant activity (1999-2011). IHE, Edmonton AB Presentation 2010.
26. Scuteri J FL, O'Mahony CA, Lewis S, Shapiro AMJ. Health Technology Assessment of proposal to establish the islet transplantation procedure as a nationally funded centre. Ltd AR-DHCP, editor. New South Wales, Australia: Health Consult Pty Ltd 2011.
27. Lehman R, Gerber PA. [End-stage nephropathy in type 1-diabetes mellitus - kidney transplantation alone or combined with islet or pancreas transplantation?]. *Ther Umsch Rev Ther*. 2011; 68(12): 699-06.
28. Mineo D, Pileggi A, Alejandro R, Ricordi C. Point: steady progress and current challenges in clinical islet transplantation. *Diabetes Care*. 2009; 32(8): 1563-69.
29. Barton FB, Rickels MR, Alejandro R, Hering BJ, Wease S, Naziruddin B, et al. Improvement in outcomes of clinical islet transplantation: 1999-2010. *Diabetes Care*. 2012; 35(7): 1436-45.
30. Eliaschewitz FG, Aita CA, Genzini T, Noronha IL, Lojudice FH, Labriola L, et al. First Brazilian pancreatic islet transplantation in a patient with type 1 diabetes mellitus. *Transplant Proc*. 2004; 36(4): 1117-28.
31. Percegon LS, Aita CA, Pereira E, Sotta ED, Silva IC, Riella MC. [Clinical protocol for selection of the candidates for islet transplantation]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008; 52(3): 506-14.

32. Correa-Giannella ML, Raposo do Amaral AS. Pancreatic islet transplantation. *Diabetol Metabol Synd.* 2009; 1(1): 9-10.
33. Ricordi C, Lacy PE, Scharp DW. Automated islet isolation from human pancreas. *Diabetes.* 1989; 38 Suppl 1140-42.
34. Kin T, Senior P, O'Gorman D, Richer B, Salam A, Shapiro AM. Risk factors for islet loss during culture prior to transplantation. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation.* 2008; 21(11): 1029-35.
35. Qi M, Barbaro B, Wang S, Wang Y, Hansen M, Oberholzer J. Human pancreatic islet isolation: Part II: purification and culture of human islets. *J Vis Exp.* 2009; 26(27): 1343-43.
36. Linetsky E, Ricordi C. Regulatory challenges in manufacturing of pancreatic islets. *Transplant Proc.* 2008; 40(2): 424-26.
37. Yamamoto T, Horiguchi A, Ito M, Nagata H, Ichii H, Ricordi C, et al. Quality control for clinical islet transplantation: organ procurement and preservation, the islet processing facility, isolation, and potency tests. *J Hepatol-Bil Panc Surg.* 2009; 16(2): 131-36.
38. Barnett MJ, McGhee-Wilson D, Shapiro AM, Lakey JR. Variation in human islet viability based on different membrane integrity stains. *Cell Transplant.* 2004; 13(5): 481-88.
39. Sotta ED, Madalozzo TM, Percegoni L, Pereira J, Bignelli A, Senegaglia A, et al. Establishing an islet transplantation program in a developing country. *Transplant Proc.* 2004; 36(6): 1700-03.
40. Kaddis JS, Olack BJ, Sowinski J, Cravens J, Contreras JL, Niland JC. Human pancreatic islets and diabetes research. *JAMA.* 2009; 301(15): 1580-87.
41. Guignard AP, Oberholzer J, Benhamou PY, Touzet S, Bucher P, Penfornis A, et al. Cost analysis of human islet transplantation for the treatment of type 1 diabetes in the Swiss-French Consortium GRAGIL. *Diabetes Care.* 2004; 27(4): 895-00.

42. Wonnacott K. Update on regulatory issues in pancreatic islet transplantation. *Am Journal Therap.* 2005; 12(6): 600-04.
43. ANVISA. RDC Nº 210 – Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2010.
44. ANVISA. Resolução RDC Nº 9, de 14 de março de 2011. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2011.
45. Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. 2013.
46. Contreras JL, Eckstein C, Smyth CA, Sellers MT, Vilatoba M, Bilbao G, et al. Brain death significantly reduces isolated pancreatic islet yields and functionality in vitro and in vivo after transplantation in rats. *Diabetes.* 2003; 52(12): 2935-42.
47. Tsujimura T, Kuroda Y, Churchill TA, Avila JG, Kin T, Shapiro AM, et al. Short-term storage of the ischemically damaged human pancreas by the two-layer method prior to islet isolation. *Cell Transplant.* 2004; 13(1): 67-73.
48. Caballero-Corbalan J, Eich T, Lundgren T, Foss A, Felldin M, Kallen R, et al. No beneficial effect of two-layer storage compared with UW-storage on human islet isolation and transplantation. *Transplantation.* 2007; 84(7): 864-69.
49. Qin H, Matsumoto S, Klintmalm GB, De Vol EB. A meta-analysis for comparison of the two-layer and university of Wisconsin pancreas preservation methods in islet transplantation. *Cell Transplant.* 2011; 20(7): 1127-37.
50. Sakuma Y, Ricordi C, Miki A, Yamamoto T, Pileggi A, Khan A, et al. Factors that affect human islet isolation. *Transplant Proc.* 2008; 40(2): 343-45.
51. Ponte GM, Pileggi A, Messinger S, Alejandro A, Ichii H, Baidal DA, et al. Toward maximizing the success rates of human islet isolation: influence of donor and isolation factors. *Cell Transplant.* 2007; 16(6): 595-07.
52. Rosenberg L, Wang R, Paraskevas S, Maysinger D. Structural and functional changes resulting from islet isolation lead to islet cell death. *Surgery.* 1999; 126(2): 393-98.

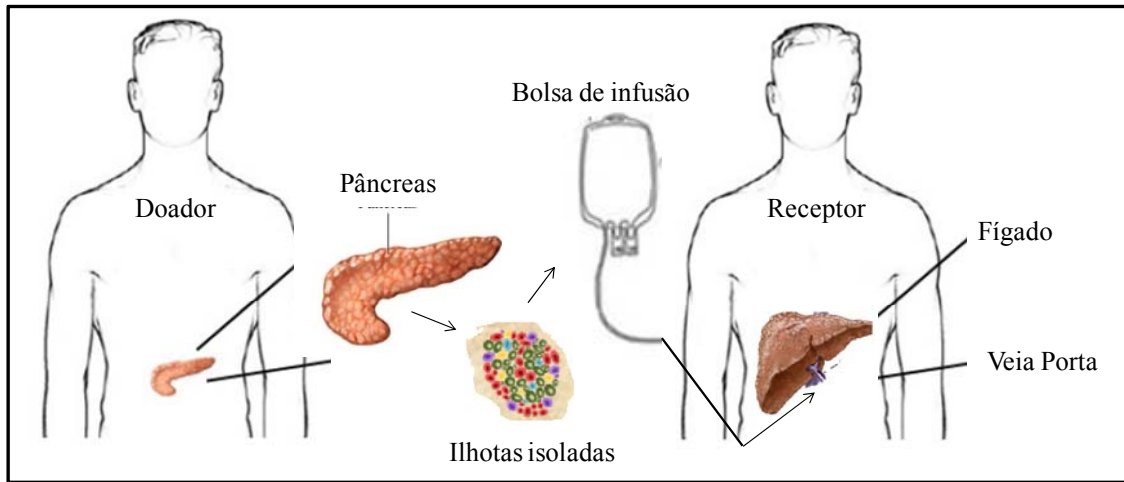
53. Linetsky E, Bottino R, Lehmann R, Alejandro R, Inverardi L, Ricordi C. Improved human islet isolation using a new enzyme blend, liberase. *Diabetes*. 1997; 46(7): 1120-23.
54. Balamurugan AN, Loganathan G, Bellin MD, Wilhelm JJ, Harmon J, Anazawa T, et al. A new enzyme mixture to increase the yield and transplant rate of autologous and allogeneic human islet products. *Transplantation*. 2012; 93(7): 693-02.
55. McCall M, Shapiro AM. Update on islet transplantation. *Cold Spring Harbor Perspec Med*. 2012; 2(7): a007823.
56. Huurman VA, Hilbrands R, Pinkse GG, Gillard P, Duinkerken G, van de Linde P, et al. Cellular islet autoimmunity associates with clinical outcome of islet cell transplantation. *PloS one*. 2008; 3(6): e2435.
57. 2007 update on allogeneic islet transplantation from the Collaborative Islet Transplant Registry (CITR). *Cell Transplant*. 2009; 18(7): 753-67.
58. Shapiro AM, Ryan EA, Lakey JR. Diabetes. Islet cell transplantation. *Lancet*. 2001; 358 SupplS21.
59. Froud T, Ricordi C, Baidal DA, Hafiz MM, Ponte G, Cure P, et al. Islet transplantation in type 1 diabetes mellitus using cultured islets and steroid-free immunosuppression: Miami experience. *Am J Transplant*. 2005; 5(8): 2037-46.
60. Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Lakey JR, Bigam D, Shapiro AM. Beta-score: an assessment of beta-cell function after islet transplantation. *Diabetes Care*. 2005; 28(2): 343-47.
61. Caumo A, Maffi P, Nano R, Bertuzzi F, Luzi L, Secchi A, et al. Transplant estimated function: a simple index to evaluate beta-cell secretion after islet transplantation. *Diabetes Care*. 2008; 31(2): 301-05.
62. Toso C, Vallee JP, Morel P, Ris F, Demuylder-Mischler S, Lepetit-Coiffe M, et al. Clinical magnetic resonance imaging of pancreatic islet grafts after iron nanoparticle labeling. *Am J Transplant*. 2008; 8(3): 701-06.

63. Zhang N, Su D, Qu S, Tse T, Bottino R, Balamurugan AN, et al. Sirolimus is associated with reduced islet engraftment and impaired beta-cell function. *Diabetes*. 2006; 55(9): 2429-36.
64. Zahr E, Molano RD, Pileggi A, Ichii H, Jose SS, Bocca N, et al. Rapamycin impairs in vivo proliferation of islet beta-cells. *Transplantation*. 2007; 84(12): 1576-83.

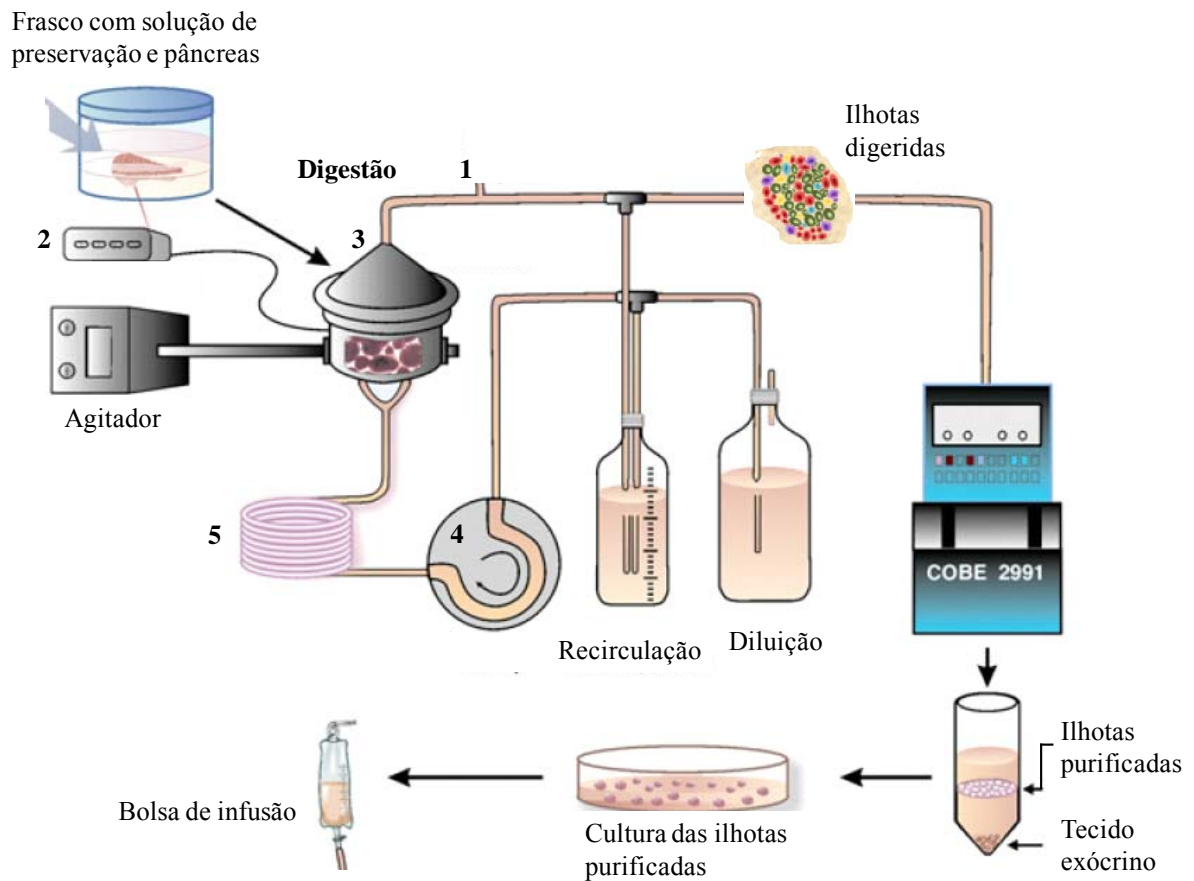


## **AGRADECIMENTOS**

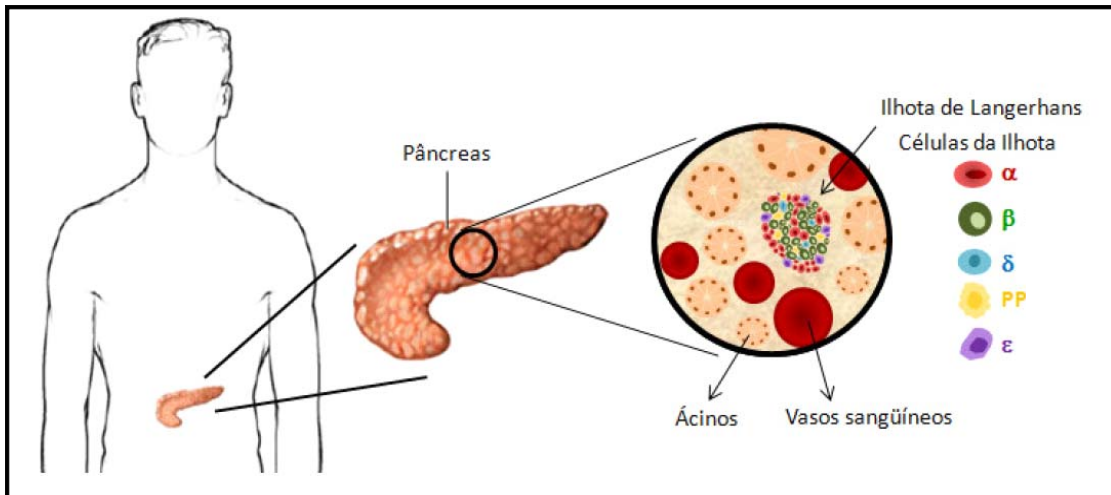
Este estudo foi parcialmente financiado por fundos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.



**Figura 1:** Infusão de ilhotas pancreáticas humanas na veia porta do receptor com diabetes mellitus tipo 1.



**Figura 2:** Isolamento das ilhotas pancreáticas e transplante: do doador ao receptor. Adaptado a partir da referência (1). **1** = porta de amostragem para coleta e monitoramento das ilhotas digeridas; **2** = sonda de temperatura para monitoramento da temperatura da câmara (37°C); **3** = Câmara de Ricordi com esferas de silicone, pâncreas e solução de collagenase; **4** = bomba peristáltica para circulação das soluções no sistema; **5** = serpentina de aquecimento localizada dentro de banho-maria a 50°C.



**Figura 3:** Figura esquemática representando os principais componentes do pâncreas: ácinos, vasos sanguíneos e ilhotas de Langerhans e sua estrutura celular. Adaptado de [www.betacell.org](http://www.betacell.org).

**Tabela 1** - Investimento inicial necessário para a implantação do Laboratório de Biologia das Ilhotas Pancreáticas Humanas no Serviço de Endocrinologia – HCPA e realização de 10 isolamentos.

	<b>Valor (R\$)</b>
Instalações <sup>1</sup>	181.410,50
Equipamentos <sup>2</sup>	490.000,00
Reagentes e materiais de consumo descartáveis necessários para 10 isolamentos de ilhotas pancreáticas <sup>3</sup>	305.000,00
Materiais de consumos não descartáveis <sup>2</sup>	16.500,00
Treinamento dos funcionários no exterior <sup>2</sup>	110.000,00
Bolsas de pesquisa (iniciação científica, apoio técnico e pós-doutorado) <sup>2</sup>	215.904,00
<b>Total</b>	<b>1.318.814,50</b>

1 – Custeado pelo HCPA; 2 – Custeado com verbas de agências nacionais de fomentos à pesquisa (CNPq, CAPES e FAPERGS); 3 – Custeados com verbas do FIPE-HCPA e de agências nacionais de fomento à pesquisa (CNPq, CAPES e FAPERGS).

**Parte II**  
**Artigo Original**

**DIFERENTES ENZIMAS DE DIGESTÃO USADAS PARA O ISOLAMENTO  
DE ILHOTAS PANCREÁTICAS HUMANAS: UMA META-ANÁLISE DO TIPO  
COMPARAÇÃO DE TRATAMENTOS MÚLTIPLOS (MTC)**

## **Different Digestion Enzymes Used for Human Pancreatic Islet Isolation: A Mixed Treatment Comparison (MTC) Meta-Analysis**

Jakeline Rheinheimer<sup>1,2</sup>, Patrícia Klarmann Ziegelmann<sup>3</sup>, Rodrigo Carlessi<sup>1,2</sup>, Luciana Ross Reck<sup>2</sup>, Andrea Carla Bauer<sup>1</sup>, Cristiane Bauermann Leitão<sup>1,2</sup> and Daisy Crispim<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Laboratory of Biology of Human Pancreatic Islets, Endocrine Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, UFRGS. Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup> Post-Graduation Program in Medical Sciences: Federal University of Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>3</sup> Statistics Department and Post-Graduation Program in Cardiology: Federal University of Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brazil.

**Keywords:** Meta-analysis, Mixed treatment comparison, Human islet isolation, Collagenase, Digestion enzyme.

Corresponding author and reprint requests:

Dr. Daisy Crispim

Endocrine Division - Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, Prédio 12, 4º andar, Zip Code: 90035-003, Porto Alegre-RS, Brazil.

Phone: + 55 51 3359 8127. E-mail: [daisy\\_crispim@hotmail.com](mailto:daisy_crispim@hotmail.com).

## **Contributors**

J.R. designed the study, collected and analyzed data and wrote the manuscript; P.K.Z. analyzed data, contributed to the discussion and wrote the manuscript; R.C collected data, contributed to the discussion and reviewed the final version of the manuscript; L.R.R analyzed data, contributed to the discussion and reviewed the final version of the manuscript; A.C.B contributed to the discussion and reviewed the final version of the manuscript; C.B.L designed the study, contributed to the discussion and reviewed the final version of the manuscript; D.C. designed the study, contributed to the discussion and wrote the manuscript.



## ABSTRACT

**Background and Aims:** Collagenases are critical reagents determining yield and quality of isolated human pancreatic islets and may affect islet transplantation outcome. Some islet transplantation centers have compared two or more collagenase blends; however, the results regarding differences in quantity and quality of islets are conflicting. Thus, for the first time, a mixed treatment comparison (MTC) meta-analysis was carried out to compile data about the effect of different collagenases used for human pancreas digestion on islet yield, purity and viability. **Methods:** Pubmed, Embase and Cochrane libraries were searched. Of 755 articles retrieved, a total of 16 articles fulfilled the eligibility criteria and were included in the MTC meta-analysis. **Results:** Our results revealed that Vitacyte and Liberase MTF were associated with a small increase in islet yield (islet equivalent number/g pancreas) when compared with Sevac enzyme [standardized mean difference (95% credible interval) = -2.11 (-4.09 to -0.29) and -2.20 (-4.26 to -0.31), respectively]. However, all other enzyme comparisons did not show any significant difference regarding islet yield. Moreover, percentages of purity and viability were not significantly different among any of the analyzed digestion enzymes. **Conclusions:** Our MTC meta-analysis suggests that the digestion enzymes currently being used for islet isolation works with similar efficiency regarding islet yield, purity and viability.

**Keywords:** mixed treatment comparison (MTC), meta-analysis, digestion enzymes, transplantation islet

## INTRODUCTION

Human islet transplantation has become a promising treatment for type 1 diabetes mellitus (T1DM) since several centers worldwide have replicated the isolation and transplantation procedures defined by the Edmonton Protocol (1, 2). The Collaborative Islet Transplant Registry (CITR) has recently published data from last decade, showing improvement in efficacy and safety outcomes of islet transplantation (3). Both number of islet infusions and adverse events per recipient dropped significantly in 2007-2010 as compared to 1999-2006 (3). However, some centers were consistently more successful than others (4), suggesting that post isolation islet quality and, consequently, transplantation success are highly sensitive to the expertise and experience of the centers performing the procedure.

Tissue dissociation enzymes are critical reagents determining yield and quality of isolated human pancreatic islets and may significantly affect clinical outcomes (5). The enzyme Liberase HI (Roche Applied Science, Indianapolis, USA) has been widely used in human islet isolation procedures for clinical transplantation, and was considered the enzyme of choice (5, 6). However, in 2007, serious concerns regarding the utilization of this particular enzyme were raised up after the discovery that its manufacturing process involved bovine brain-derived raw material, which have the potential to transmit prion-associated diseases (7). Since then, efforts have been made to replace the Liberase HI enzyme, such as purification of collagenase and protease enzyme blend components as well as characterization of composition and digestion efficacy of new enzymes (8, 9).

Current state-of-the-art digestion enzyme blends includes collagenase NB1 (Serva NB1, Serva, Heidelberg, Germany), a mammalian tissue-free version of Liberase

(Liberase MTF, Roche, Indianapolis, USA) and a new blend that enhances the proportion of intact C1 collagenase (CIzyme HA, Vitacyte, Indianapolis, USA) (4, 10-12). Some centers have compared two or more enzymes, and results regarding differences in islet yield and viability are conflicting (5, 6, 8, 12-14).

Liberase HI and Serva NB1 have been the most widely investigated enzymes for human islet isolation (4, 15). Nevertheless, even today, there is no standardization of collagenase digestion in human islet isolation between centers, and this might account, in part, for the high variability in islet isolation results (11). Moreover, all digestion enzymes have never been directly compared with respect to islet isolation outcomes in the same study. Given that evidence-based decision-making requires comparison of all relevant competing interventions, network meta-analysis might provide useful evidence for judiciously selecting the best enzyme for islet isolation. In this context, mixed treatment comparison (MTC) meta-analysis, a special case of network meta-analysis, compares all digestion enzymes using a single model. As a result, pairwise comparisons are made by combining direct and indirect evidence or by using direct or indirect evidence when only one of them is available, thereby synthesizing a greater share of the available evidence than a traditional meta-analysis (16, 17). Therefore, in order to define the most appropriate enzyme to be used in human pancreatic islet isolation, we performed a MTC meta-analysis of studies that reported human islet isolation and evaluated the effect of different pancreas digestion enzymes regarding to islet equivalent number (IEQ)/g pancreas, islet viability and purity of the islet product. Analyzed enzymes were as follows: Liberase HI, Serva NB1, Vitacyte, Liberase MTF, Collagenase P, Sevac, Sigma V, Recombinant and Collagenase Custom.

## RESULTS

### **Literature search results and characteristics of the eligible studies**

**Figure 1** is a flow diagram illustrating the strategy used to identify and select studies for inclusion in this systematic review and MTC meta-analysis. A total of 755 potentially relevant citations were retrieved by searching the electronic databases, and 699 of them were excluded during the review of titles and abstracts. Fifty-six articles, therefore, appeared to be eligible at this point and had their full texts evaluated. However, after critical reading of full texts, another 40 studies were excluded because of ineligible study designs, duplicated results, absence of comparison of at least two types of collagenases, no outcome of interest analyzed, and islet isolation from non-human pancreas. A total of 16 articles fulfilled the eligibility criteria and were included in the MTC meta-analysis.

**Supplementary Table 1** summarizes the characteristics of the 16 selected studies. Among these 16 studies, two of them compared more than two enzymes (8, 13): one compared Liberase HI, Serva NB1, and Collagenase P (8), and the other compared Liberase HI, Serva NB1, Vitacyte and Liberase MTF (13). Six studies compared Liberase HI *vs.* Serva NB1 (5, 10, 11, 14, 18, 19), two compared Serva NB1 *vs.* Vitacyte (20, 21), one compared Serva NB1 *vs.* Sigma V (15), and one compared Serva NB1 *vs.* Liberase MTF (12). Four were conducted comparing Liberase HI with other different enzymes (Collagenase P, Sevac, Recombinant and Collagenase Custom) (6, 22-24). **Supplementary Table 2** depicts age, gender proportions, weight and body mass index (BMI) of pancreatic donors included in the 16 selected studies, as well as the cold ischemia time (CIT) of their pancreases.

## Evidence network

**Figure 2** shows the evidence network of enzyme comparisons. From the evidence network is possible to observe that some pairwise comparisons have only direct evidence that comes from head-to-head studies (Custom *vs.* Liberase HI, for example), some have only indirect evidence (for example, Custom *vs.* Sevac evidence comes indirectly from the trials comparing Custom *vs.* Liberase HI and Sevac *vs.* Liberase HI) and other pairs have both direct and indirect evidence (**Figure 2A**). Eight enzymes were compared for the outcome IEQ/g pancreas (**Figure 2A**), including 15 studies, totalizing 1221 analyzed pancreases. Seven enzymes were compared for viability (**Figure 2B**) and derived from 9 studies including 537 pancreases. Seven enzymes were also compared for purity (**Figure 2C**), derived from 10 studies including 880 pancreases.

## Islet equivalent number (IEQ)/g pancreas

**Figure 3A** summarizes the results of the MTC meta-analysis of the effect of different digestion enzymes on the standardized mean difference (SMD) of the IEQ/g pancreas. Vitacyte and Liberase MTF enzymes were associated with significantly better results on outcome IEQ/g pancreas as compared with the Sevac enzyme [-2.11 (-4.09 to -0.29) and -2.20 (-4.26 to -0.31), respectively]. However, Vitacyte and Liberase MTF enzymes showed no significant difference on this outcome when compared with the other analyzed enzymes (Liberase HI, Serva NB1, Collagenase P, Sigma V, and Collagenase Custom). Moreover, these other enzymes also did not show any significant differences when compared with each other (**Figure 3A**).

**Figure 4** shows the estimated probability that each enzyme is ranked first, second, third and so on as being the most effective enzyme in generating better results on the analyzed outcomes. For the outcome IEQ/g pancreas, Liberase MTF was the

enzyme that had the greatest probability of being the best enzyme (46%), followed by Vitacyte (34%) (**Figure 4C**). The other enzymes showed similar probabilities of being ranked the first best enzyme.

### **Viability and purity**

**Figure 3B** summarizes the results of the MTC meta-analysis of the effect of different enzymes on the unstandardized weighted mean difference (WMD) of both islet viability and purity of the islet product. Our results revealed that percentages of purity and viability were not significantly different when using any of the analyzed digestion enzymes. Nevertheless, when evaluating the estimated probability of each enzyme being the best effective enzyme in generating better purity and viability of the islets (**Figure 4A and 4B, respectively**), the Vitacyte enzyme showed a 35% probability of being the most effective enzyme in generating higher islet viability, followed by Collagenase Custom (23%) and Serva NB1 (22%) enzymes. For purity outcome, the Recombinant enzyme showed the greatest probability of being the best enzyme (29%), followed by Collagenase P (21%), Vitacyte and Sevac (15%), Liberase MTF (8%), and Serva NB1 and Liberase HI (6%) (**Figure 4A**).

### **Data quality and inconsistency checking**

We assessed the quality of each individual study included in the meta-analyses using GRADE (The Grading of Recommendation Assessment, Development and Evaluation) recommendations (25). For each outcome (IEQ/g pancreas, islet viability and purity), studies were evaluated for risk of bias, imprecision, inconsistency, indirectness, magnitude of the treatment effect and presence of a dose-response gradient. The quality of the evidence was then classified as high, moderate, low or very low. Studies included in our MTC meta-analyses are not-blinded observational studies with non-direct

outcomes and are associated with conflicting results mainly due to inter-study heterogeneity. Therefore, using the GRADE recommendations, the evidence was classified as low to very low quality for the three outcomes.

One key assumption of MTC meta-analysis models is the consistency between direct and indirect evidence, that is, if the information of both sources of evidence are similar enough in order to be combined. Therefore, the interpretation of the MTC meta-analysis results should rely on this assumption (17, 26). Thus, it is important to stress out that our results showed that there is no significant inconsistency between direct and indirect evidences for the outcomes IEQ/g pancreas, islet viability and purity (**Supplementary Table 3**).

## **DISCUSSION**

In the present MTC meta-analysis, the majority of collagenases used for pancreas digestion were similar for islet yield, islet purity and islet viability outcomes. The only exception was a small and not clinically relevant increment in the islet yield when Vitacyte and Liberase MTF enzymes were used as compared with Sevac. Islet yield (IEQ/g pancreas), purity and viability were chosen as outcomes for our meta-analysis since they are validated islet batch product release criteria for human islet transplantation (27).

The original islet isolation protocol currently being used at most islet processing centers was first described by Ricordi *et al.* (28) in 1988 and, since then, each islet isolation center has refined the isolation protocol. Centers have improved their own isolation protocols by developing new digestion enzyme combinations, by modifying the media and procedures, and by adding various reagents to the culture media (29).

However, even though a human pancreas contains an estimated one to two million islets (30), it is still difficult for islet processing laboratories to consistently obtain sufficient quantities of intact islets from different donors (30, 31). Scientists performing human islet isolation face several challenges to get a sufficient yield of islet for clinical transplantation, which is typically achieved only in fewer than 45% of human donor pancreas isolations (32). Assuming that the team is experienced in human islet isolation, the two primary factors that influence the islet yield and quality are donor variables and the tissue digestion enzyme quality (33). In this scenario, the standardization of all procedures used during human islet isolation is an essential requisite for the reproducible production of sufficient numbers of good-quality islets and, consequently, for the establishment of a successful clinical transplant program (29, 34).

The critical procedure of islet isolation is a mechanically enhanced enzymatic digestion of the pancreas, which allows dissociation and freeing of the islets from the surrounding acinar tissue (35, 36). Collagenase plays a crucial role in dissociating the pancreas during enzymatic digestion phase (8), but the heterogeneity of enzyme preparations has hindered the standardization of the collagenase digestion protocol in human islet isolation, and continue to hamper a process that is inherently difficult to control (15, 30). Some studies have attempted to identify the most suitable digestion enzyme to be used in islet isolation (5, 8, 13, 14, 20, 21). However, taking into account that these studies analyzed different enzymes, and used different enzyme lots or different isolation protocols, presently, it is difficult to conclude which, among the available digestion enzymes, best suits the islet isolation procedure. Thus, making many laboratories base the selection on personal experience.

Since *Clostridium histolyticum* collagenase became commercially available in the early 1960s, it has been widely used as a tissue-dispersing enzyme (37-39). The



Liberase HI was introduced in 1994 as the first dissociation enzyme blend specially developed to isolate human islets. This low-endotoxin product contains purified collagenase from *C. histolyticum*, class I and class II isoforms, and a thermostable purified bacterial neutral protease (Dispase® or Thermolysin) active at neutral pH (6, 21). Class I and II isoforms are identified by differences in their substrate specificity and work synergistically to degrade collagen (33). Neutral protease is thought to further enhance the degradation of all major components of the extracellular matrix, also playing an important role in enzymatic digestion (40-42).

The development of Liberase HI blend dramatically improved human islet isolation, consistently yielding large number of islets without compromising their functional viability, and has become the preferred blend for clinical islet isolation by many islet transplant programs (6, 30). Unfortunately, in 2007, following recommendations from the Food and Drug Administration (FDA), this enzyme blend was withdrawn from the market due to the potential, although low, risk of prion disease transmission (7, 10). After the Liberase HI became unavailable for clinical use, clinical islet transplant centers were forced to identify a substitute enzyme blend that consistently produced sufficient number of good-quality islets for transplantation.

The enzyme blend that then became available and is now used by many centers, including those in the Clinical Islet Transplantation Consortium (CITR), is a combination of a current Good Manufacturing Practice (cGMP) grade collagenase (collagenase NB1) and a cGMP neutral protease (NB) that is manufactured by Serva Electrophoresis (10, 43). Collagenase NB1 and neutral protease NB are reconstituted separately and mixed immediately before use to minimize degradation of the collagenase by neutral protease. Consequently, a theoretical advantage of the Serva

NB1 blend is that the amounts of collagenase and neutral protease can be adjusted independently to match the size of pancreas being processed (10, 43).

According to the certificate of analysis, the biochemical activity of Serva NB1 is similar to Liberase HI, but its parameters for optimal use are different and many experienced centers have had inconsistent results using this product for clinical islet isolation (10, 43). Interestingly, recent data from CITR show improvement in primary efficacy and safety outcomes of islet transplantation in recipients who received transplants in 2007–2010 compared with those in 1999–2006, with fewer islet infusions and adverse events per recipient (3). Although these dates coincide with the switch in the use of Liberase HI enzyme to Serva NB1 enzyme, it is not possible to conclude that the improvement of the islet transplantation results in more recent years is only due to the utilization of Serva NB1 blend, since no randomized clinical trials were performed specifically to compare these two enzymes.

An analysis of more than 400 human islet isolations demonstrated that the efficacy of an enzyme blend is extremely important for a successful isolation process and posttransplant function after human islet allotransplantation (44). Consequently, the selection of an appropriate enzyme blend is a critical step in the process of islet isolation. Thus, aiming at improvement of islet isolation and clinical transplantation, other state-of-the-art enzyme blends were recently developed: Liberase MTF, which is a tissue-free version of Liberase HI manufactured in a manner similar to the previous Liberase; and Vitacyte enzyme blend, which has an enhanced proportion of intact Class 1 isoform collagenase (4, 10-12). At the present time, Serva NB1, Liberase MTF, and Vitacyte products seem to perform with similar success, but head-to-head comparisons are pending to determine the optimal enzyme blend that maximizes human islet yield and quality (4). As already commented, some centers have compared two or more

enzymes and were included in our meta-analysis, but individual results regarding differences in islet yield and viability are conflicting (5, 8, 13, 14, 20, 21).

In this scenario, our MTC meta-analysis combined direct and indirect evidence; allowing comparisons among enzymes even when head-to-head studies were not available. Combining results from direct and indirect evidences in a MTC model might yield a more refined and precise estimate of the interventions directly compared and a broader inference to the population sampled because it links and maximizes existing information within the network of treatment comparisons. Moreover, a major advantage of the MTC-Bayesian approach is that the method naturally leads to a decision framework that supports decision making (16, 17). Such a fact might help researches in selecting the most appropriate enzyme for islet isolation. In this context, our results from the MTC meta-analysis did not indicate any significant difference between the enzymes most commonly used regarding the analyzed outcomes. Nonetheless, it is worth noting that when we evaluated the ranking of the best enzyme for IEQ/g pancreas, Liberase MTF and Vitacity enzymes demonstrated a slightly superiority when compared to the other enzymes. Furthermore, regarding the most used enzymes nowadays, Vitacity and Serva NB1 also seems to have a slightly superiority when analyzing the viability outcome.

Recently, Balamurugan *et al.* (45) evaluated eight different enzyme combinations in an attempt to improve islet yield. The enzyme combinations consisted of purified, intact or truncated Class 1 and Class 2 collagenases from *C. histolyticum* (*Ch*), and neutral protease (NP) from *Bacillus thermoproteolyticus rokko* (thermolysin) or from *C. histolyticum*. A new enzyme mixture composed of the Vitacyte blend and a neutral protease from *C. histolyticum* was able to recover the highest islet yield while

retaining islet quality and function (45). Probably, future comparisons will be made analyzing this new enzyme mixture.

The present study has some limitations. First, most of the articles included are observational retrospective studies rather than randomized clinical trials. Second, the general quality of these studies was considered low according to GRADE guidelines (25), raising the possibility of bias. Third, for some enzyme comparisons, only a few studies were available to be included in the MTC meta-analysis. Fourth, heterogeneity is potentially a significant problem when interpreting the results of any meta-analysis, and our meta-analysis showed significant inter-study heterogeneity in almost all analyses. The heterogeneity that we observed could originate from the improvement of islet isolation over the years, as well as differences in donor selection, enzyme lots, isolation procedures, culture medium and other reagents used for promoting islet survival. Besides that, it could also raise from differences in expertise of the isolation teams (29, 34, 46-49). Without detailed information on these variables we cannot exclude the possibility that the heterogeneity observed might reduce our power to detect true differences between enzymes. However, we believe that our results are still robust since we applied a Bayesian model to explore the effects of indirect evidence between studies, which is thought to be the most appropriate method for MTC meta-analysis (16, 50).

In summary, improvement of islet isolations and standardization of these procedures are important prerequisites for the success of clinical islet transplantation. Thus, although this MTC meta-analysis has some limitations, this is the first study that provides a useful and complete picture of the comparison between the enzymes used in islet isolation. Our MTC meta-analysis suggests that the enzymes most widely used nowadays works with similar efficiency regarding to islet yield, purity and viability.

Only a few studies compared Vitacyte and Liberase MTF blends; therefore, further studies are necessary to compare these new enzymes.

## **METHODS**

### **Search strategy and study selection**

This study was designed and described in accordance with current guidelines (51, 52). To identify studies that reported human islet isolation and compared different enzymes for pancreas digestion, we performed an electronic literature search in Medline, Embase and Cochrane libraries, without date restriction, using the following medical subject readings (MeSH): “pancreas islet transplantation” OR “pancreas islet and collagenase” OR “islet isolation” AND “clostridiopeptidase” OR “collagenase” OR “Serva” OR “Liberase” OR “Sigma V” OR “Vitacyte” OR “Liberase MTF” OR “NB1 Premium Grade” OR “Cizyme collagenase HA” OR “Liberase HI” OR “Clostridium histolyticum”. The search was limited to human and English or Spanish language papers and was completed on August 22, 2013. All included articles were also hand-searched to identify any other relevant citations. An effort was made to contact authors for missing information.

Two investigators (J.R. and R.C.) independently reviewed the titles and abstracts of all retrieved articles in order to evaluate whether the studies were eligible for inclusion in the systematic review. Disagreements were resolved by discussion between them and when necessary a third reviewer (D.C.) was consulted. When abstracts did not provide enough information regarding the inclusion and exclusion criteria, the full text of the article was retrieved for evaluation. Studies were considered eligible for inclusion if they fulfilled the following criteria: 1) the study should have

been performed in human pancreatic islet isolation; 2) it should have tested at least two types of collagenases; and 3) it should have analyzed one or more of the outcomes of interest: IEQ/g pancreas, islet viability and purity of the islet product. If data were duplicated and had been published more than once, the most complete study was chosen.

### **Data extraction and quality analysis**

Data were independently extracted by two investigators (J.R. and R.C) using a standardized abstraction form and a consensus was sought in all extracted items. When consensus could not be reached, differences in data extraction were resolved by a third reviewer (D.C or C.B.L.) and by referencing the original publication. The information extracted from each individual study was as follows: author's first name, publication year, name of collagenases used, number of subjects in each group, donor's characteristics (age, gender, weight, BMI, and cause of death), characteristics of the pancreas (weight, CIT, and digestion time), and data about the outcomes of interest previously described.

Two investigators (J.R. and R.C) independently assessed the quality of each eligible study using GRADE recommendations (25). GRADE classifies quality of evidence into four categories: high, moderate, low or very low. The quality assessment includes factors such as the study design (risk of bias), imprecision, inconsistency, indirectness, and publication bias. Some factors, particularly relevant to observational studies, which may lead to rating up quality, were including - magnitude of treatment effect and the presence of a dose-response gradient (25).

## **Statistical analyses**

Outcomes of interest were IEQ/g pancreas, islet viability and purity. The effects of each digestion enzyme on the outcome were analyzed using a Mixed Treatment Comparison (MTC) meta-analysis, conducted by using Markov-Chain Monte Carlo simulations and fitted in the software WinBUGS version 1.4.3 (Medical Research Council Biostatistics Unit, Cambridge, United Kingdom). The MTC meta-analysis is a generalization of traditional pairwise meta-analysis that allows all evidence from multiple treatments to be taken into account simultaneously in a single model, combining direct and indirect evidence. It can be applied whenever a connected network of evidence is available, and is highly flexible, allowing the inclusion of data from multiple-arm studies (16, 17).

For this MTC meta-analysis, the Liberase HI enzyme was considered the baseline enzyme and both fixed effect (FE) and random effect (RE) models were fitted for each outcome. The choice between FE or RE models was made comparing the competing models using the deviance information criteria (DIC). For each model, goodness-of-fit to the data was evaluated using residual deviance (53).

Therefore, the results are shown for RE models conducted using Markov chains. Each chain used 300,000 iterations with a burn-in of 50,000 and a thinning interval of 40. Vague prior distributions were used for all models. Due to the high variability found for the variable IEQ/g pancreas, the results for this outcome are summarized as median of the SMD calculated by the Hedges method (49, 52). For viability and purity, the results are shown as median of the unstandardized WMD. For all outcomes, 95% credible intervals (CrIs, the Bayesian equivalents of CI) are also shown (16).

One particularly useful characteristic of MTC models is the possibility to calculate the expected ranking of efficacy for all treatments based on the posterior probabilities of all treatment rankings (i.e., probability of being the best, probability of

second best, and so on) (16, 17, 54). Thus, we calculated the probability of each digestion enzyme to be the most effective (first-best) enzyme, the second-best, the third-best, and so on, for our outcomes, and presented the results graphically in Figure 4.

When direct and indirect evidences are combined for a particular pairwise comparison, it is important to check if there is no discrepancy between direct and indirect evidences. Therefore, this consistency assumption should be accounted for (17). In this study, the consistency assumption was checked using posterior plots and the Bayesian P-values produced by the node-splitting method proposed by Dias *et al.* (26). In this approach, each pairwise comparison in a closed loop of the evidence network has its direct and indirect components compared. The evidence of a pair was considered inconsistent if the resulting P value was smaller than the significance level ( $\alpha = 0.05$ ) adjusted for multiple comparisons (26).



## REFERENCES

1. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med.* 2000; 343(4): 230-38.
2. 2007 update on allogeneic islet transplantation from the Collaborative Islet Transplant Registry (CITR). *Cell Transplant.* 2009; 18(7): 753-67.
3. Barton FB, Rickels MR, Alejandro R, Hering BJ, Wease S, Naziruddin B, et al. Improvement in outcomes of clinical islet transplantation: 1999-2010. *Diabetes Care.* 2012; 35(7): 1436-45.
4. McCall M, James Shapiro AM. Update on islet transplantation. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012; 2(7): a007823.
5. Misawa R, Ricordi C, Miki A, Barker S, Molano RD, Khan A, et al. Evaluation of viable beta-cell mass is useful for selecting collagenase for human islet isolation: comparison of collagenase NB1 and liberase HI. *Cell Transplant.* 2012; 21(1): 39-47.
6. Linetsky E, Bottino R, Lehmann R, Alejandro R, Inverardi L, Ricordi C. Improved human islet isolation using a new enzyme blend, liberase. *Diabetes.* 1997; 46(7): 1120-23.
7. Alejandro R, Barton FB, Hering BJ, Wease S. 2008 Update from the Collaborative Islet Transplant Registry. *Transplantation.* 2008; 86(12): 1783-88.
8. Sabek OM, Cowan P, Fraga DW, Gaber AO. The effect of isolation methods and the use of different enzymes on islet yield and in vivo function. *Cell Transplant.* 2008; 17(7): 785-92.
9. Bertuzzi F, Cainarca S, Marzorati S, Bachi A, Antonioli B, Nano R, et al. Collagenase isoforms for pancreas digestion. *Cell Transplant.* 2009; 18(2): 203-06.

10. Szot GL, Lee MR, Tavakol MM, Lang J, Dekovic F, Kerlan RK, et al. Successful clinical islet isolation using a GMP-manufactured collagenase and neutral protease. *Transplantation*. 2009; 88(6): 753-56.
11. Brandhorst H, Friberg A, Nilsson B, Andersson HH, Felldin M, Foss A, et al. Large-scale comparison of Liberase HI and collagenase NB1 utilized for human islet isolation. *Cell Transplant*. 2010; 19(1): 3-8.
12. O'Gorman D, Kin T, Imes S, Pawlick R, Senior P, Shapiro AM. Comparison of human islet isolation outcomes using a new mammalian tissue-free enzyme versus collagenase NB-1. *Transplantation*. 2010; 90(3): 255-59.
13. Shimoda M, Noguchi H, Naziruddin B, Fujita Y, Chujo D, Takita M, et al. Assessment of human islet isolation with four different collagenases. *Transplant Proc*. 2010; 42(6): 2049-51.
14. Iglesias I, Valiente L, Shiang KD, Ichii H, Kandeel F, Al-Abdullah IH. The Effects of Digestion Enzymes on Islet Viability and Cellular Composition. *Cell Transplant*. 2012; 21: 649-55.
15. Wang Y, Paushter D, Wang S, Barbaro B, Harvat T, Danielson K, et al. Highly Purified versus Filtered Crude Collagenase: Comparable Human Islet Isolation Outcomes. *Cell Transplant*. 2011; 20; 1817-25.
16. Lu G, Ades AE. Combination of direct and indirect evidence in mixed treatment comparisons. *Stat Med*. 2004; 23(20): 3105-24.
17. Jansen JP, Fleurence R, Devine B, Itzler R, Barrett A, Hawkins N, et al. Interpreting indirect treatment comparisons and network meta-analysis for health-care decision making: report of the ISPOR Task Force on Indirect Treatment Comparisons Good Research Practices: part 1. *Value in health : J Int Soc Pharm Out Res*. 2011; 14(4): 417-28.
18. Bucher P, Mathe Z, Morel P, Bosco D, Andres A, Kurfuest M, et al. Assessment of a novel two-component enzyme preparation for human islet isolation and transplantation. *Transplantation*. 2005; 79(1): 91-97.
19. Anazawa T, Balamurugan AN, Bellin M, Zhang HJ, Matsumoto S, Yonekawa Y, et al. Human islet isolation for autologous transplantation: comparison of

- yield and function using SERVA/Nordmark versus Roche enzymes. *Am J Transplant*. 2009; 9(10): 2383-91.
20. Caballero-Corbalan J, Friberg AS, Brandhorst H, Nilsson B, Andersson HH, Felldin M, et al. Vitacyte collagenase HA: a novel enzyme blend for efficient human islet isolation. *Transplantation*. 2009; 88(12): 1400-02.
  21. Balamurugan AN, Breite AG, Anazawa T, Loganathan G, Wilhelm JJ, Papas KK, et al. Successful human islet isolation and transplantation indicating the importance of class 1 collagenase and collagen degradation activity assay. *Transplantation*. 2010; 89(8): 954-61.
  22. O'Gorman D, Kin T, McGhee-Wilson D, Shapiro AM, Lakey JR. Multi-lot analysis of custom collagenase enzyme blend in human islet isolations. *Transplant Proc*. 2005; 37(8): 3417-19.
  23. Olack BJ, Swanson CJ, Howard TK, Mohanakumar T. Improved method for the isolation and purification of human islets of langerhans using Liberase enzyme blend. *Hum Immunol*. 1999; 60(12): 1303-09.
  24. Brandhorst H, Brandhorst D, Hesse F, Ambrosius D, Brendel M, Kawakami Y, et al. Successful human islet isolation utilizing recombinant collagenase. *Diabetes*. 2003; 52(5): 1143-46.
  25. Balshem H, Helfand M, Schunemann HJ, Oxman AD, Kunz R, Brozek J, et al. GRADE guidelines: 3. Rating the quality of evidence. *J Clin Epidemiol*. 2011; 64(4): 401-06.
  26. Dias S, Welton NJ, Caldwell DM, Ades AE. Checking consistency in mixed treatment comparison meta-analysis. *Stat Med*. 2010; 29(7-8): 932-44.
  27. Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, Auchincloss H, Lindblad R, Robertson RP, et al. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med*. 2006; 355(13): 1318-30.
  28. Ricordi C, Lacy PE, Finke EH, Olack BJ, Scharp DW. Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes*. 1988; 37(4): 413-20.

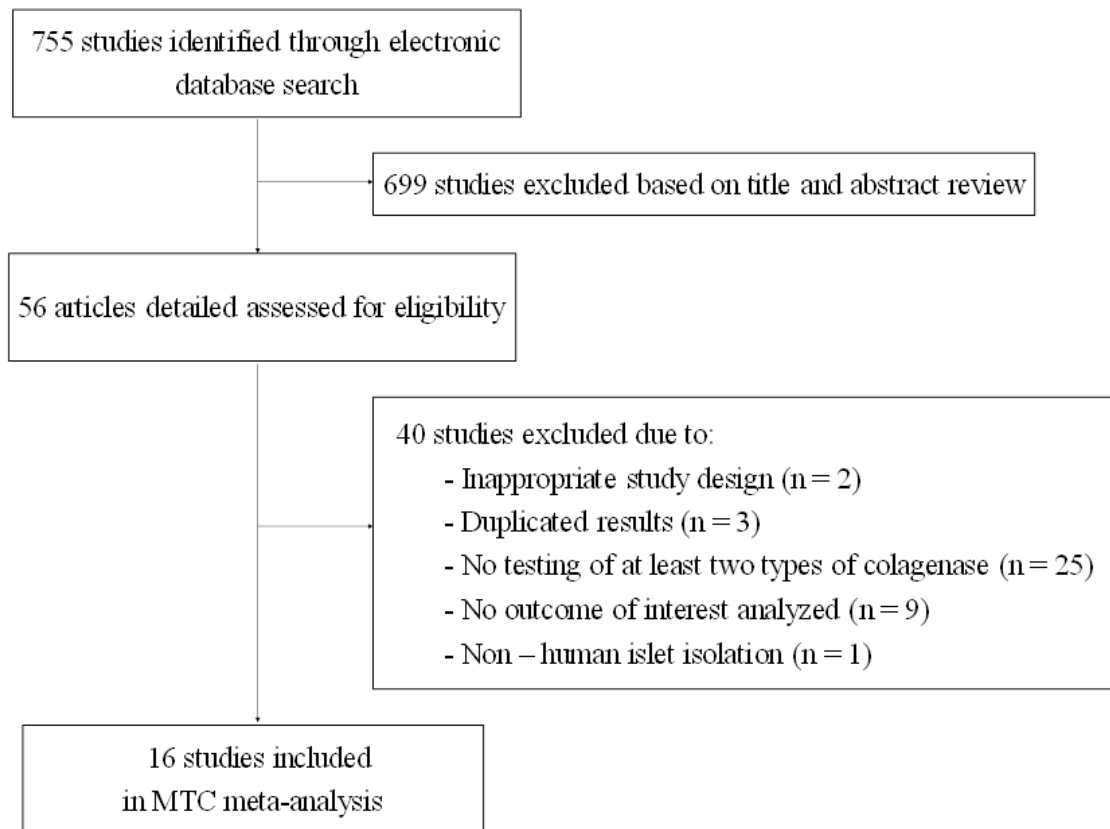
29. Yamamoto T, Horiguchi A, Ito M, Nagata H, Ichii H, Ricordi C, et al. Quality control for clinical islet transplantation: organ procurement and preservation, the islet processing facility, isolation, and potency tests. *J Hepato-Bili Pancreat Surg.* 2009; 16(2): 131-36.
30. Lakey JR, Burridge PW, Shapiro AM. Technical aspects of islet preparation and transplantation. *Transpl Int.* 2003; 16(9): 613-32.
31. Johnson PR, White SA, London NJ. Collagenase and human islet isolation. *Cell Transplant.* 1996; 5(4): 437-52.
32. Kin T, Zhai X, Murdoch TB, Salam A, Shapiro AM, Lakey JR. Enhancing the success of human islet isolation through optimization and characterization of pancreas dissociation enzyme. *Am J Transplant.* 2007; 7(5): 1233-41.
33. McCarthy RC, Breite AG, Green ML, Dwulet FE. Tissue dissociation enzymes for isolating human islets for transplantation: factors to consider in setting enzyme acceptance criteria. *Transplantation.* 2011; 91(2): 137-45.
34. Ricordi C, Lakey JR, Hering BJ. Challenges toward standardization of islet isolation technology. *Transplant Proc.* 2001; 33(1-2): 1709.
35. Hanley SC, Paraskevas S, Rosenberg L. Donor and isolation variables predicting human islet isolation success. *Transplantation.* 2008; 85(7): 950-55.
36. Lakey JR, Warnock GL, Shapiro AM, Korbitt GS, Ao Z, Kneteman NM, et al. Intraductal collagenase delivery into the human pancreas using syringe loading or controlled perfusion. *Cell Transplant.* 1999; 8(3): 285-92.
37. Howard RB, Christensen AK, Gibbs FA, Pesch LA. The enzymatic preparation of isolated intact parenchymal cells from rat liver. *J Cell Biol.* 1967; 35(3): 675-84.
38. Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes.* 1967; 16(1): 35-39.
39. Moskalewski S. Isolation and Culture of the Islets of Langerhans of the Guinea Pig. *Gen Comp Endocrinol.* 1965; 44:342-53.

40. Lakey JR, Helms LM, Moser G, Lix B, Slupsky CM, Rebeyka IM, et al. Dynamics of cryoprotectant permeation in porcine heart valve leaflets. *Cell Transplant*. 2003; 12(2): 123-28.
41. Brandhorst D, Iken M, Tanioka Y, Brendel MD, Bretzel RG, Brandhorst H. Influence of collagenase loading on long-term preservation of pig pancreas by the two-layer method for subsequent islet isolation. *Transplantation*. 2005; 79(1): 38-43.
42. Kin T, O'Gorman D, Zhai X, Pawlick R, Imes S, Senior P, et al. Nonsimultaneous administration of pancreas dissociation enzymes during islet isolation. *Transplantation*. 2009; 87(11): 1700-05.
43. Bucher P, Mathe Z, Bosco D, Andres A, Kurfuerst M, Ramsch-Gunther N, et al. Serva collagenase NB1: a new enzyme preparation for human islet isolation. *Transplant Proc*. 2004; 36(4): 1143-44.
44. Nano R, Clissi B, Melzi R, Calori G, Maffi P, Antonioli B, et al. Islet isolation for allotransplantation: variables associated with successful islet yield and graft function. *Diabetologia*. 2005; 48(5): 906-12.
45. Balamurugan AN, Loganathan G, Bellin MD, Wilhelm JJ, Harmon J, Anazawa T, et al. A new enzyme mixture to increase the yield and transplant rate of autologous and allogeneic human islet products. *Transplantation*. 2012; 93(7): 693-02.
46. Ichii H, Pileggi A, Molano RD, Baidal DA, Khan A, Kuroda Y, et al. Rescue purification maximizes the use of human islet preparations for transplantation. *Am J Transplant*. 2005; 5(1): 21-30.
47. Ichii H, Wang X, Messinger S, Alvarez A, Fraker C, Khan A, et al. Improved human islet isolation using nicotinamide. *Am J Transplant*. 2006; 6(9): 2060-68.
48. Ponte GM, Pileggi A, Messinger S, Alejandro A, Ichii H, Baidal DA, et al. Toward maximizing the success rates of human islet isolation: influence of donor and isolation factors. *Cell Transplant*. 2007; 16(6): 595-07.

49. Qin H, Matsumoto S, Klintmalm GB, De Vol EB. A meta-analysis for comparison of the two-layer and university of Wisconsin pancreas preservation methods in islet transplantation. *Cell Transplant*. 2011; 20(7): 1127-37.
50. Caldwell DM, Ades AE, Higgins JP. Simultaneous comparison of multiple treatments: combining direct and indirect evidence. *BMJ*. 2005; 331(7521): 897-00.
51. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Ann Intern Med*. 2009; 151(4): 264-9, W64.
52. Coleman CI, Phung OJ, Cappelleri JC, Baker WL, Kluger J, White CM, et al. *Use of Mixed Treatment Comparisons in Systematic Reviews*. Rockville (MD) 2012.
53. Spiegelhalter DJ, Best NG, Carlin BP, Van Der Linde A. Bayesian measures of model complexity and fit. *J Roy Stat Soc: Series B (Statistical Methodology)*. 2002; 64(4): 583-39.
54. Salanti G, Ades AE, Ioannidis JP. Graphical methods and numerical summaries for presenting results from multiple-treatment meta-analysis: an overview and tutorial. *J Clin Epidemiol*. 2011; 64(2): 163-71.

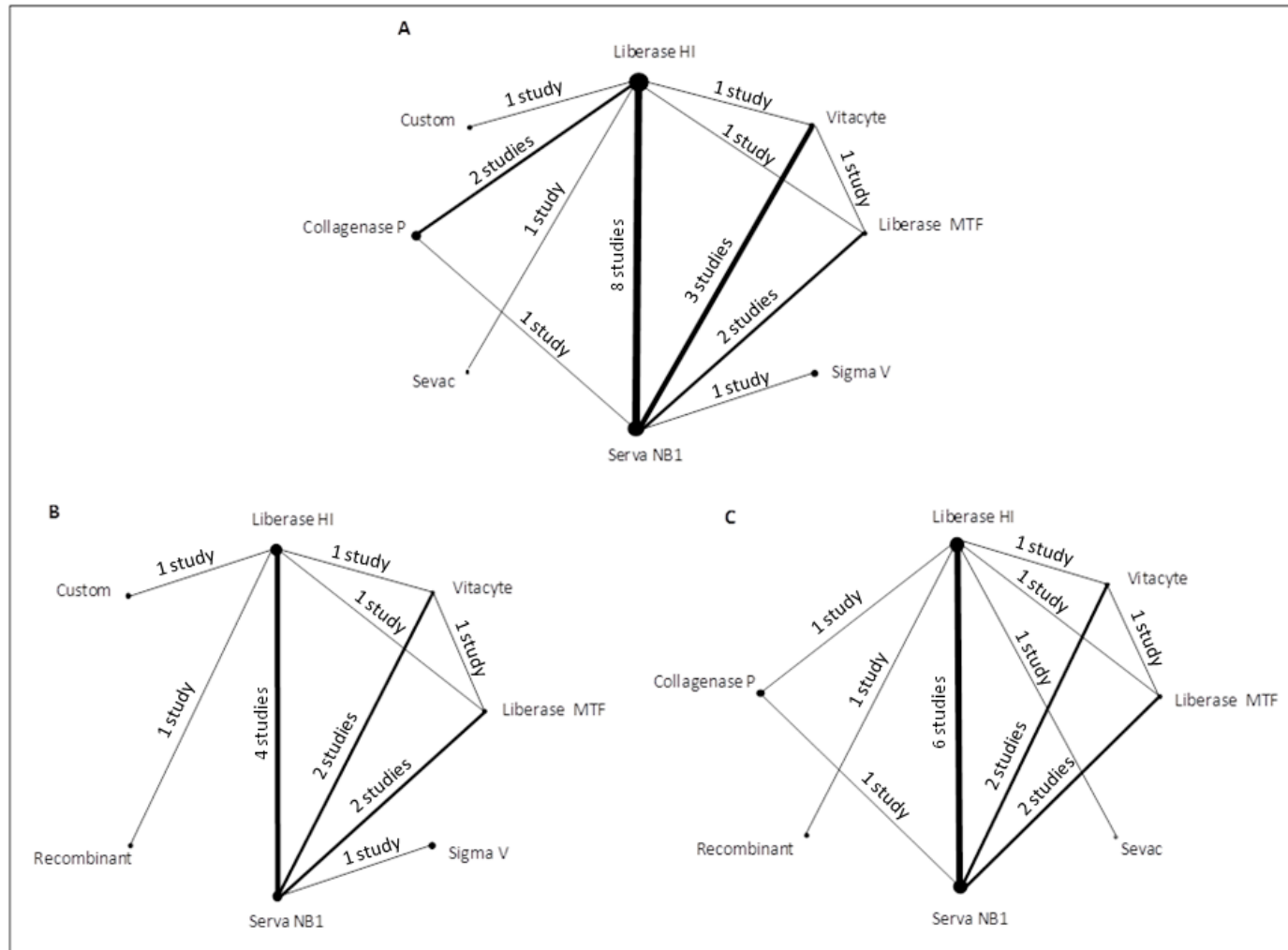
## **ACKNOWLEDGMENTS**

This study was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. C.B.L. and D.C. are recipients of scholarships from CNPq.

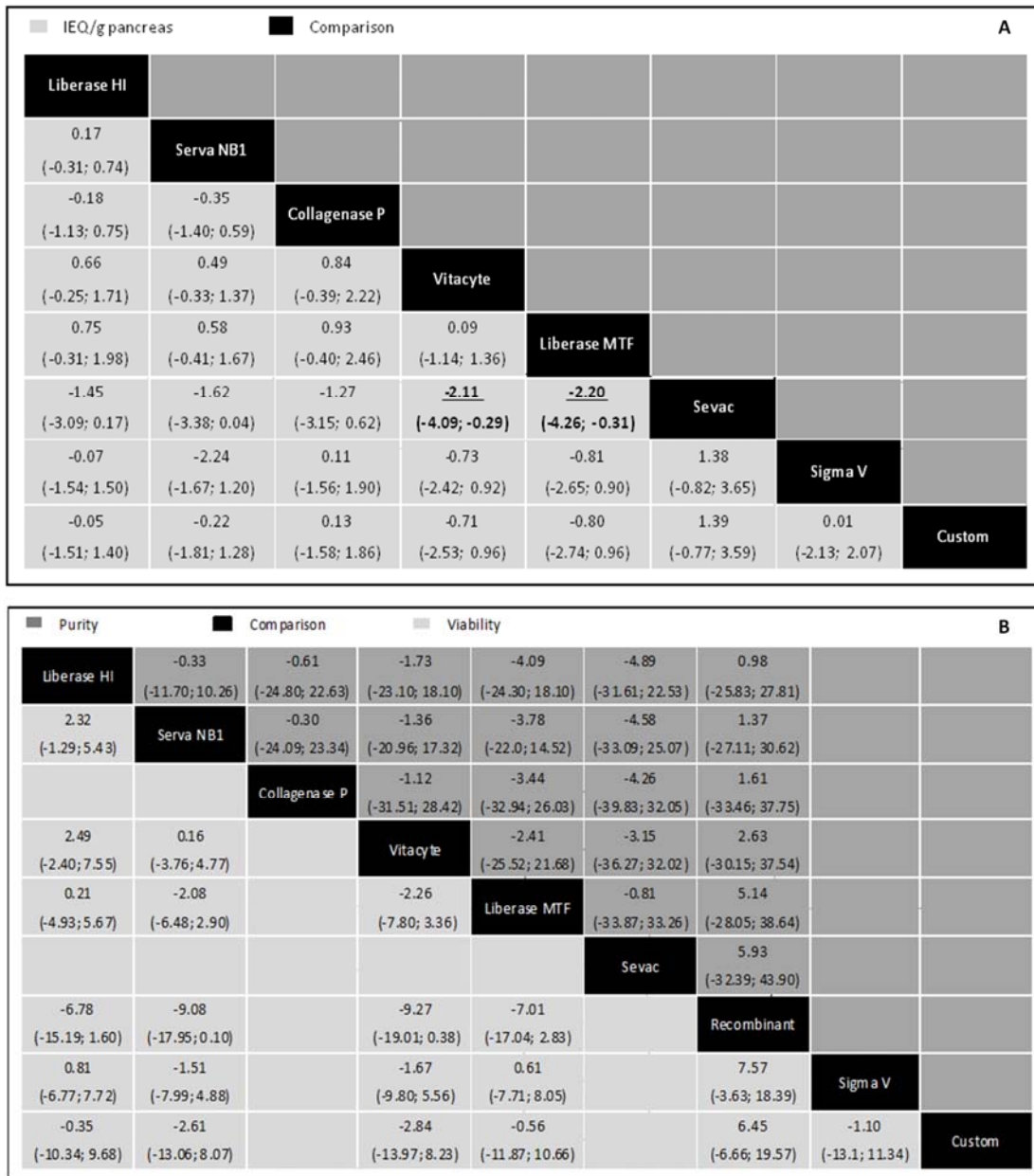


**Figure 1:** Flowchart illustrating the search strategy used in the systematic review and mixed treatment comparison meta-analysis.



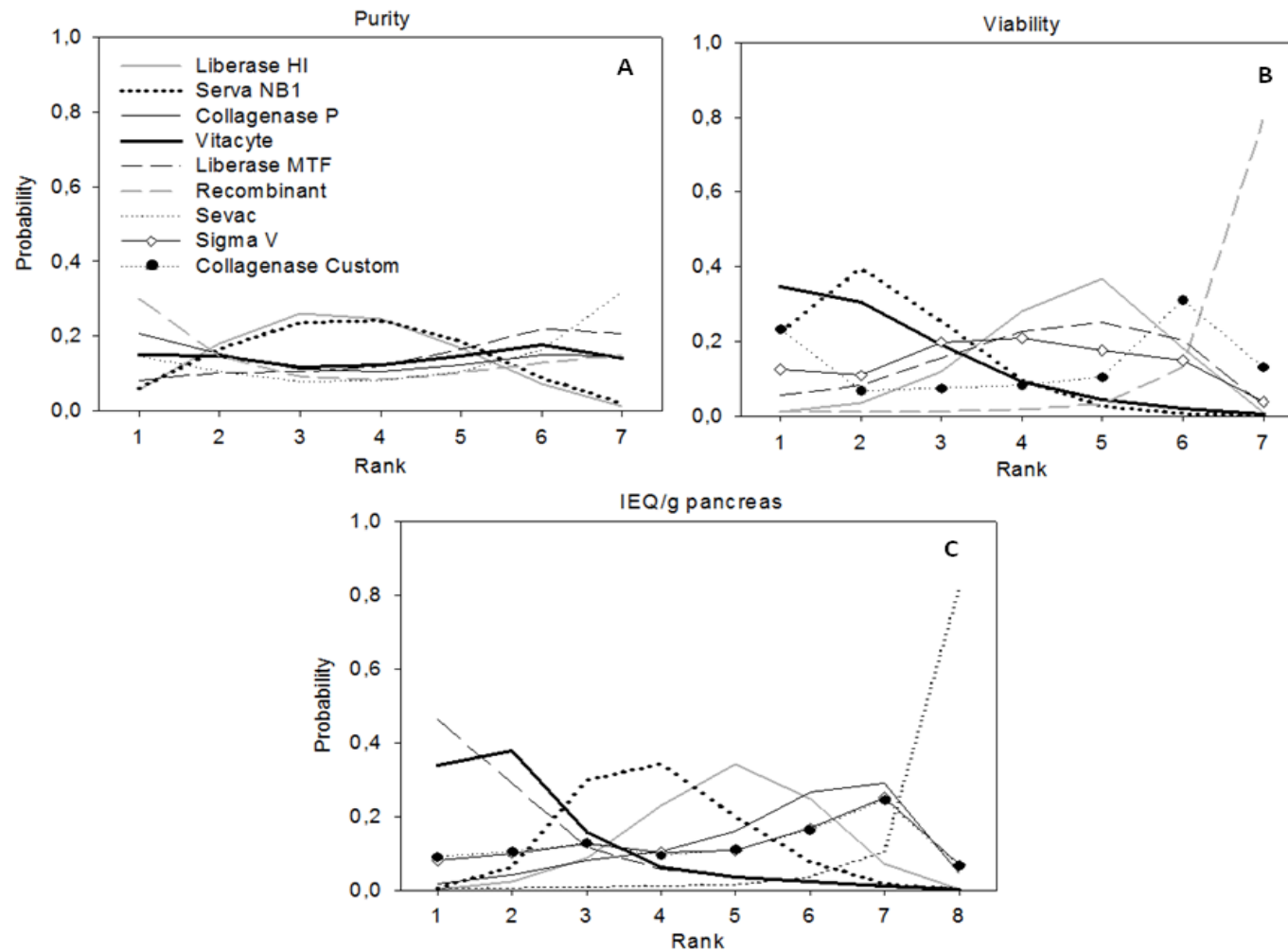


**Figure 2:** Network of eligible comparisons for the mixed-treatment comparison meta-analysis. **A:** islet equivalent number (IEQ)/g pancreas; **B:** Viability; **C:** Purity. Lines connect the enzymes that have been studied in head-to-head (direct) comparisons. The width of the lines represents the cumulative number of studies for each comparison, and the size of each node is proportional to the sample size.



**Figure 3:** Mixed-treatment comparison (MTC) meta-analysis of the effect of different digestion enzymes on changes of islet equivalent number (IEQ)/g pancreas, islet purity and viability. **3A:** MTC of the effect of different enzymes on the median of the standardized mean difference (SMD) of the IEQ/g pancreas. Results are SMD [(95% credible interval (CrI)] in the column-defining enzyme compared with the row-defining enzyme. A negative

value favors the column-defining enzyme. **3B**: MTC of the effects of different enzymes on the median of the unstandardized weighted mean difference (WMD) of islet purity and viability. Results are WMD (95% CrI) in the column-defining enzyme compared with the row-defining enzyme. For viability, a negative value favors the column-defining enzyme, and for purity, a negative value favors the row-defining enzyme. Significant results are in bold and underlined.



**Figure 4:** Plots for ranking probability of different enzymes in generating better results on the analyzed outcomes. Ranking = probability of being the best enzyme, of being the second best, the third best and so on, among all enzymes. **A:** Rank for purity of the islet product; **B:** Rank for islet viability; and **C:** rank for islet equivalent number (IEQ)/g pancreas.

**SUPPLEMENTARY MATERIAL**

**Supplementary Table 1:** Summary of studies comparing at least two types of digestion enzymes and outcomes assessed.

	<b>Enzymes</b>	<b>n</b>	<b>Outcomes</b>
Bucher (2005)	Liberase	9	IEQ/g , Purity, Viability, SI, <i>In vivo</i> function (human and non-human)
	Serva	9	
Sabek (2008)	Liberase	123	IEQ/g , Purity, <i>In vivo</i> function (non-human)
	Serva	113	
	Collagenase P	53	
Anazawa (2009)	Liberase	40	IEQ/g , Purity, Viability, <i>In vivo</i> function ( human)
	Serva	46	
Szot (2009)	Liberase	49	IEQ/g
	Serva	14	
Brandhorst (2010)	Liberase	101	IEQ/g, Purity, SI
	Serva	96	
Shimoda (2010)	Liberase	9	IEQ/g , Purity, Viability, SI
	Serva	7	

	Vitacyte	4	
	Liberase MTF	4	
Iglesias (2012)	Liberase	46	IEQ/g, SI
	Serva	20	
Mizawa (2012)	Liberase	50	IEQ/g , Purity, Viability, SI, <i>In vivo</i> function ( non-human)
	Serva	40	
Linetzky (1997)	Liberase	50	IEQ/g
	Collagenase P	36	
O' Gorman (2005)	Liberase	43	IEQ/g , Viability, SI
	Custom	25	
Olack (1999)	Liberase	13	IEQ/g , Purity
	Sevac	10	
Brandhorst (2003)	Liberase	51	Purity, Viability, SI, <i>In vivo</i> function (non-human)
	Recombinant	25	
Caballero (2009)	Serva	18	IEQ/g, Purity , SI
	Vitacyte	18	
Balamurugan (2010)	Serva	26	IEQ/g, Viability, SI

	Vitacyte	14	
O' Gorman (2010)	Serva	24	IEQ/g , Purity, Viability, SI
	Liberase MTF	17	
Wang (2011)	Serva	42	IEQ/g , Viability, SI
	Sigma V	52	

---

IEQ/g = islet equivalent number /g pancreas. SI = Stimulation Index.

**Supplementary Table 2:** Summary of the main characteristics of the donors included in the study as well as the cold ischemia time of their pancreases

	Enzymes	Age (years)		Gender (% male)		Donor weight (Kg)		CIT		BMI	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Bucher (2005)	Liberase	46	11			81	7	5.6	2	26	4
	Serva	48	11	NI	NI	77	8	5.4	2	25	2
Sabek (2008)	Liberase	41	15	61				11.6	4	25	7
	Serva	41	14	50	NI	NI	NI	13.3*	4	25	7
	Collagenase P	41	16	53				11.9	3	28	7
Anazawa (2009)	Liberase	39.6*	11.8	35	NI	69.8	18.2	< 1h	NI	24.7	6.2
	Serva	33.5	14.4	21.7		66.4	23	< 1h		24.5	5.7
Szot (2009)	Liberase	45*	10	NI	NI	122*	27	NI	NI	37.7*	8.6
	Serva	37	12			105	15	5.9	1.5	32	5.7
Brandhorst (2010)	Liberase	52.9	10	57.4	NI	NI	NI	8.7	3	26	4
	Serva	54.1	10.8	54.2				9.3	3.9	25.7	3.9
Shimoda (2010)	Liberase	42	9	NI	NI	NI	NI	4.1	1.9	32	6
	Serva	39	13.2					3.3	0.6	29	5.3



	Vitacyte	40	14					3.0	1.4	25	6
	Liberase MTF	36	12					1,9	1,2	25	2
Iglesias (2012)	Liberase	47.8	10.9	NI	NI	94.6*	21.2	9	3.1	32.4	6.6
	Serva	45.2	9.8			83.5	19.7	8.6	4.1	28.5	6.7
Mizawa (2012)	Liberase	43.8	9.9	70	NI	89.1	18.4	10.3	4.2	29.9	4.9
	Serva	40	10.8	65		84.9	17.1	10.6	0.9	28.5	4.4
Linetzky (1997)	Liberase	36	13.6		NI	78.3	25	8.8	3.9	NI	NI
	Collagenase P	30.3	12.6	NI	NI	86.9	29	11.2*	5.1		
O' Gorman (2005)	Liberase	45	13.8		NI	NI	NI	9.1	3.5	27.1	4.9
	Custom	44.8	15.5	NI	NI	NI	NI	8.2	3	26.3	5.5
Olack (1999)	Liberase	47	10	54	NI	NI	NI	7	2.3	29*	3.9
	Sevac	52	13	50				8.8	3.2	23.6	3.9
Brandhorst (2003)	Liberase	44.8	12.1	52.9				7.7	2.1	26.2	4.3
	Recombinant	45.7	11.5	64	NI	NI	NI	8.5	2.5	26.9	4
Caballero (2009)	Serva	53.4	9.8	61.1	NI	NI	NI	9.8	3.4	25.6	2.5

	Vitacyte	53.5	8.9	61.1				9.7	3.4	25.9	3
Balamurugan (2010)	Serva	42.3*	12.9	48.2				8.8	3.7	30	6.3
	Vitacyte	34.5	8.8	42.9	NI	NI	NI	7.3	2.9	33.5	7.2
O' Gorman (2010)	Serva	53.5	7.8	NI	NI	NI	NI	10.2	2.9	29.8	5.9
	Liberase MTF	53.2	11.5					8.1	2.9	28.9	8.2
Wang (2011)	Serva	48.5	12.6	54.8		88.8	19.9	9.3	2.9	28.9	6.6
	Sigma V	47.4	12.9	53.8	NI	82.3	19.5	10.6*	2.4	27.3	5.8

Data are expressed as mean  $\pm$  SD (standard deviation). BMI = body mass index. CIT = cold ischemia time. NI = not informed. \* P < 0.05.

**Supplementary Table 3:** Evaluation of the consistency assumption between direct and indirect evidence used in the mixed treatment comparison (MTC) meta-analysis.

<b>Enzymes - IEQ/g pancreas</b>	<b>Direct</b>	<b>Indirect</b>	<b>MTC</b>	<b>p-value</b>
Liberase HI vs Serva NB1	0.22 (-0.31; 0.83)	0.68 (-1.07; 2.76)	0.17 (-0.31; 0.74)	0.6040
vs Vitacyte	0.85 (-0.80; 2.86)	0.82 (-0.39; 2.13)	0.66 (-0.25; 1.71)	0.9760
vs Liberase MTF	1.48 (-0.16; 3.40)	0.40 (-1.25; 2.12)	0.75 (-0.31; 1.98)	0.3322
Vitacyte vs Liberase MTF	0.17 (-1.58; 2.01)	-0.24 (-2.28; 1.85)	0.09 (-1.14; 1.36)	0.7260
<b>Viability</b>				
Liberase HI vs Serva NB1	2.17 (-2.56; 6.32)	4.19 (-5.42; 14.39)	2.32 (-1.29; 5.43)	0.5352
vs Collagenase P	4.22 (-3.28; 13.39)	1.07 (-8.49; 9.83)	2.50 (-2.37; 7.55)	0.3746
vs Vitacyte	0.79 (-5.79; 8.95)	1.21 (-8.49; 10.25)	0.21 (-4.93; 5.67)	0.9264
Collagenase P vs Vitacyte	-3.27 (-11.35; 4.51)	-1.26 (-12.81; 9.33)	-2.29 (-7.80; 3.36)	0.6672
<b>Purity</b>				
Liberase HI vs Serva NB1	1.97 (-5.40; 8.35)	-25.89 (-47.40; -5.94)	-0.33 (-11.70; 10.26)	0.0140
vs Vitacyte	-16.03 (-42.21; 8.22)	7.51 (-16.69; 30.96)	-1.73 (-23.10; 18.10)	0.1570
vs Liberase MTF	-18.94 (-38.65; -1.45)	10.51 (-10.86; 31.22)	-4.09 (-24.30; 15.55)	0.0328
Vitacyte vs Liberase MTF	-7.62 (-26.74; 14.13)	12.24 (-12.47; 38.64)	-2.41 (-25.52; 21.68)	0.1862

## CONCLUSÃO

O transplante de ilhotas pancreáticas é considerado tratamento clínico para “DM1 lábil” em alguns países. Com a infusão de ilhotas é possível verificar uma diminuição na ocorrência de hipoglicemias graves, melhora no controle glicêmico e independência à insulina pelo menos por alguns anos. No entanto, no Brasil e em vários outros países, o procedimento é considerado ainda pesquisa experimental. Dessa forma, esforços têm sido feitos para melhorar as etapas do isolamento, padronizar essas etapas e treinar equipes para que esse procedimento possa ser incorporado futuramente na prática clínica. Para tal, a equipe do Laboratório de Biologia das Ilhotas Pancreáticas Humanas do HCPA está em constante treinamento e realizando pesquisas relacionadas. Neste contexto, nossa meta-análise MTC foi desenvolvida visando fornecer uma avaliação útil e completa da comparação entre as diferentes enzimas de digestão utilizadas no isolamento de ilhotas pancreáticas humanas. Nosso estudo sugere que as enzimas mais utilizadas apresentam uma eficiência similar em relação à qualidade e quantidade das ilhotas isoladas. Entretanto, verificou-se a necessidade de estudos que proporcionem um grau de recomendação mais alto.