

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a),
o texto completo desta dissertação será disponibilizado
somente a partir de 01/03/2020.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Franciane Quintanilha Gallego Souza

**Repercussão do diabetes moderado no estresse
oxidativo e hormônios pancreáticos ao longo da vida
de ratas**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção
do título de Doutor(a) em
Ginecologia, Obstetrícia e
Mastologia.

Orientador (a): Prof(a). Dr(a). Débora Cristina Damasceno
Coorientador(a): Prof(a). Dr(a). Yuri Karen Sinzato

**Botucatu
2018**

Franciane Quintanilha Gallego Souza

Repercussão do diabetes moderado no estresse
oxidativo e hormônios pancreáticos ao longo da
vida de ratas

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção
do título de Doutor(a) em
Ginecologia, Obstetrícia e
Mastologia.

Orientador (a): Prof(a).Dr(a). Débora Cristina Damasceno
Coorientador(a):Prof(a).Dr(a). Yuri Karen Sinzato

Botucatu
2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Souza, Franciane Quintanilha Gallego.

Repercussão do diabete moderado no estresse oxidativo e
hormônios pancreáticos ao longo da vida de ratas /
Franciane Quintanilha Gallego Souza. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: Débora Cristina Damasceno

Coorientador: Yuri Karen Sinzato

Capes: 40101150

1. Ilhotas pancreáticas. 2. Stress oxidativo. 3.
Diabetes mellitus. 4. Prenhez. 5. Rato como animal de
laboratório.

Palavras-chave: Diabete; Estresse oxidativo; Ilhotas
pancreáticas; Prenhez; Ratas.

“Deus transforma choro em sorriso, dor em força,
fraqueza em fé e sonho em realidade”

(Autor desconhecido)

Dedicatórias

Á **DEUS**, por nunca me abandonar e me carregar em seu colo, transformando minha jornada em momentos leves, verdadeiros e insubstituíveis!

Aos meus pais, **Elisabeth Quintanilha Gallego** e **José Gallego Masaia**, por me darem o dom da vida, me ensinarem o certo e o errado, por me apoiarem sempre em todos os momentos! Sem vocês eu não conseguiria! Amo vocês!

Ao meu marido, **Bruno de Castro Silva Souza**, por estar sempre ao meu lado nos momentos difíceis, por me amar quando nem eu mesma me amava, por me incentivar, por acreditar no meu potencial, por viver todos os dias ao meu lado! Te amo!

Agradecimentos

Á minha orientadora, Profa. Dra. **Débora Cristina Damasceno**, por se tornar muito mais que minha orientadora, por abrir as portas de sua casa, por ser amiga, mãe, confidente! Obrigada pela caminhada durante esses sete anos, pelos ensinamentos dentro e fora do laboratório, pelas broncas muitas vezes necessárias, por confiar em mim e no meu trabalho! Os ensinamentos que adquiri com você estará ao meu lado por toda a vida! E espero um dia poder retribuir tudo o que você fez e faz por mim! Obrigada!

Á minha coorientadora, Profa. Dra. **Yuri Karen Sinzato**, pelo apoio, ajuda, ensinamentos, amizade! Você faz parte de toda minha caminhada e de tudo que aprendi no laboratório! Obrigada!

As minhas amigas **Aline Netto**, **Isabela Lovizutto Iessi**, **Silvana Barroso corvino**, por fazerem parte dessa caminhada, tanto dentro como fora do laboratório! Deus coloca anjos em nossas vidas, os quais chamamos de amigos! As palavras são insuficientes para dizer o quanto vocês são importantes na minha vida e o quanto eu agradeço por tudo que vocês fizeram e fazem por mim! Amo vocês!

Á minha amiga e parceira de experimentos, **Carolina Abreu Miranda**, por me ajudar, me apoiar e me substituir sempre que necessário! Sem você, esse doutorado não seria possível!

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia **Aline Bueno, Aline Netto, Ana Paula Campos, Carolina Abreu Miranda, Eduardo Klöppel, Fernanda Piculo, Giovana Vesentini, Nathália Macedo, Rafael Bottaro Gelaleti e Verônyca Gonçalves Paula**, pelos anos de convivência! Alguns presenciaram minha jornada mais tempo que outros, mas todos vocês contribuíram para que essa caminhada fosse mais alegre! Obrigada!

Aos assistentes de suporte acadêmico (ASA) da **Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX)** da Faculdade de Medicina de Botucatu, especialmente aos Srs. **Danilo Chaguri, Carlos Roberto Gonçalves de Lima, José Márcio Cândido e Jurandir Antônio**, pela manutenção dos biotérios, limpeza e cuidados com os animais, e **Marta Regina Russo Sarzi** pelo auxílio nas técnicas morfológicas.

Á Profa. Dra. **Noeme Sousa Rocha** por ceder seu laboratório e equipamentos para a realização deste projeto e a técnica do laboratório de rotina de Patologia da FMVZ_Botucatu,

Maria Valéria Dalanezi, pela ajuda no processo de inclusão em parafina dos materiais.

Ao professor **Rogelio Hernandez Pando** pelas discussões imunoistoquímicas das amostras de pâncreas.

Ao professor **Wellerson Rodrigo Scarano** por abrir as portas de sua sala sempre que eu pedi ajuda, por todos os ensinamentos no estágio docência, pelas discussões sobre o trabalho.

À Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, em especial ao **Departamento de Ginecologia e Obstetrícia** e ao **Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia (LAPGO)** pela acolhida e concessão das dependências e aparelhos durante a realização deste trabalho.

À toda a equipe do **Escritório de Apoio à Pesquisa (EAP)** da **Faculdade de Medicina**, especialmente ao **Prof. Dr. José Eduardo Corrente**, pelo auxílio no cálculo do delineamento experimental das análises estatísticas do estudo.

Aos funcionários da Seção de **Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu**, em particular à secretária do

Programa de Pós-graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia, Sra. **Solange Sako**.

Aos funcionários da biblioteca da UNESP, em especial à Sra. **Rosimeire Aparecida Vicente (Rose)** e **Rosângela Aparecida Lobo**, pela confecção da ficha catalográfica.

Aos participantes da banca de qualificação e de defesa da dissertação, Prof. Dr. **Alex Rafacho**, Profa. Dra. **Isabela Lovizutto Iessi**, Prof. Dr. **Wellerson Rodrigo Scarano**, Profa. Dra. **Marcela Marcondes Pinto Rodrigues** pela disponibilidade, críticas e sugestões.

À **CAPES** pela concessão da bolsa, permitindo total dedicação a execução desse estudo.

Aos **animais**, que cederam suas vidas para a realização deste trabalho, contribuindo cada dia mais com a ciência.

Sumário

CAPÍTULO 1 - Análise morfológica das ilhotas pancreáticas de ratas diabéticas durante a janela crítica de desenvolvimento pós-natal

Resumo.....	15
Introdução.....	16
Materiais e Método.....	17
Resultados.....	22
Discussão.....	33
Conclusão.....	34
Referências.....	35

CAPÍTULO 2 - Resposta das ilhotas pancreáticas à associação diabetes e prenhez em ratas

Resumo.....	39
Introdução.....	40
Materiais e Método.....	41
Resultados.....	45
Discussão.....	55
Conclusão.....	57
Referências.....	58

ANEXO.....	62
-------------------	-----------

Capítulo 1

ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS DE RATAS
DIABÉTICAS DURANTE A JANELA CRÍTICA DE DESENVOLVIMENTO PÓS-
NATAL

PANCREATIC ISLETS MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF DIABETIC RATS
DURING POSTNATAL DEVELOPMENT CRITICAL WINDOW

Franciane Quintanilha Gallego ¹, Carolina Abreu Miranda ¹, Yuri Karen Sinzato ¹,
Isabela Lovizutto Iessi ¹, Bruna Dallaqua ²,
Rogelio Hernandez Pando ³, Débora Cristina Damasceno ^{1*}

¹ Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia, Programa de Pós-graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Univ. Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil

² Faculdade DeVry Ruy Barbosa (Grupo DeVry Brasil), Salvador, Bahia, Brasil

³ Departamento de Patología, Instituto Nacional Salvador Zubirán, Cidade do México, México

*Correspondência: Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP
Distrito de Rubião Júnior, s/n
Telefone: 55 14 38801631
CEP: 18.618-970
Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil
Email: damascenofmb@gmail.com

RESUMO

Introdução: Durante o período neonatal de ratos, o pâncreas endócrino sofre remodelamento, com aumento de proliferação e diminuição da secreção de insulina em relação aos animais adultos, sendo considerado uma janela crítica de desenvolvimento que determina a fisiologia do pâncreas no organismo e possíveis doenças na vida adulta, dentre elas o diabetes. Sendo assim, o presente estudo visa compreender os mecanismos envolvidos e a relação existente entre as células α , β e δ durante o período crítico de desenvolvimento do pâncreas em ratas com diabetes de intensidade moderada.

Objetivo: Avaliar temporalmente o padrão de distribuição das células endócrinas pancreáticas bem como de algumas enzimas antioxidantes em ilhotas de ratas com e sem diabetes durante a janela crítica de desenvolvimento pós-natal. **Materiais e método:** Para a indução do diabetes com níveis glicêmicos de menor intensidade, os recém-nascidos fêmeas receberam a *streptozotocin* (STZ) (100 mg/kg de peso corporal via subcutânea) no primeiro dia de vida. As fêmeas controle receberam apenas o tampão de citrato. O critério de inclusão para o grupo diabético foi glicemia ≥ 400 mg/dL no dia 5 de vida (D5) e, para o grupo controle, glicemia < 120 mg/dL. Os animais de ambos os grupos foram mortos em momentos diferentes: D10, D15 e D30. Foi realizado a coleta de sangue (dosagem de insulina sérica e biomarcadores do estresse oxidativo) e do pâncreas (análise morfológica). Os anticorpos utilizados para análise imunoistoquímica foram: anti-insulina, anti-glucagon, anti-somatostatina, anti-superóxido dismutase 1 (SOD1), anti-glutathione peroxidase (GSH-Px). Para todas as comparações foi considerado o limite mínimo de significância de $p < 0,05$. **Resultados:** O peso corpóreo, concentração de insulina sérica e massa de células α , β e δ aumentaram de acordo com a idade em ambos os grupos estudados. Houve correlação negativa entre a porcentagem de células marcadas para insulina e somatostatina em D10, relação inversa entre células α e β em todos os dias estudados e correlação positiva entre as células α e δ em D10 e D15. A intensidade de marcação para SOD1 foi menor nas ilhotas dos animais diabéticos em todos os momentos estudados e no D10 e D30 para GSH-Px. **Conclusão:** O diabetes no primeiro mês de vida de ratas fêmeas Wistar interferiu no ganho de peso corporal fisiológico do animal, afetou a citoarquitetura das ilhotas pancreáticas e com localização alterada das células δ dentro da ilhota, prejudicando a estrutura mantle-core presente em roedores. Além disso, presença de hiperglicemia causou diminuição das enzimas antioxidantes nas ilhotas pancreáticas destes animais. Sendo assim, estas alterações morfológicas pancreáticas decorrentes do diabetes durante a janela crítica do desenvolvimento podem contribuir para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos do diabetes na vida adulta.

Palavras-chave: Insulina, somatostatina, glucagon, enzimas antioxidantes, pâncreas, diabetes, ratas.

INTRODUÇÃO

As ilhotas pancreáticas constituem um micro órgão especializado e correspondem à porção endócrina do pâncreas, sendo compostas pelas células alfa (α), beta (β), epsilon (γ), delta (δ) e PP (Kordowich *et al.*, 2009). Estas células se comunicam via junções *GAP* ou via secreção parácrina (Brereton *et al.*, 2015). As células pancreáticas endócrinas e seus hormônios apresentam função regulatória entre si. As células β -pancreáticas sintetizam e secretam insulina, já as células α e δ (células não- β) secretam glucagon e somatostatina respectivamente (Kordowich *et al.*, 2009). A citoarquitetura das ilhotas de humanos e de roedores são semelhantes entre si e apresentam uma estrutura “*mantle-core*”, na qual as células β são circundadas pelas demais células da ilhota pancreática (células não- β) (Bonner-Weir *et al.*, 2015).

A localização das células pancreáticas α e δ de mamíferos ao lado dos capilares sanguíneos possibilita o reconhecimento de alterações glicêmicas, as quais são transmitidas das células não- β para as células β através do sangue, o que influencia a secreção de insulina (Bonner-Weir & Orci, 1982; Ohtani *et al.*, 1986; Samols *et al.* 1986; Liu *et al.*, 1993; Brunicaardi *et al.*, 1996; Nyman *et al.*, 2008; Pfeifer *et al.*, 2014). Desta forma, a insulina e o glucagon atuam coordenadamente para controlar a homeostase da glicose. Para isso, a insulina diminui os níveis glicêmicos e o glucagon os aumenta quando necessário (Kordowich *et al.*, 2009). Para que haja ajustes finos no controle da secreção de insulina e de glucagon, a somatostatina tem seu papel na regulação da glicemia de forma indireta (Bousquet *et al.*, 2004).

Há evidências que a hiperglicemia induz aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) devido ao aumento da entrada de redutores na cadeia mitocondrial de transporte de elétrons (Giacco & Brownlee, 2010). ERO desempenha um papel importante na patogênese da perda das células β -pancreáticas no *Diabetes mellitus* (DM). A célula β -pancreática necessita de um meio intracelular rico em oxigênio, pois utiliza o catabolismo de glicose para atender suas necessidades energéticas, o que também fornece energia para a síntese e secreção de insulina em resposta ao aumento da glicose sanguínea, permitindo que a glicose seja utilizada pelos tecidos periféricos (Lenzen, 2008). No entanto, as células produtoras de insulina apresentam baixa defesa contra a toxicidade dos radicais livres, com capacidade limitada das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GSH-Px) para inativar ERO (Lenzen *et al.*, 1996; Tiedge *et al.*, 1997). Sendo assim, as células β são mais susceptíveis ao estresse oxidativo, o que possibilita alterações na expressão e secreção de insulina, bem como no aumento de apoptose, agravando ainda mais o quadro hiperglicêmico (Robertson, 2004).

Estudos experimentais demonstram que mudanças ambientais nas janelas críticas do desenvolvimento podem levar o organismo a sofrer alterações estruturais e funcionais, possibilitando o aparecimento de doenças na vida adulta, dentre elas o DM (Lucas, 1998). O período neonatal é considerado uma janela crítica do desenvolvimento do pâncreas em mamíferos. Em roedores, durante o período de lactação, ocorre maior oferta de carboidratos e de lipídios (Scaglia *et al.*, 1997; Aguayo-Mazzucato *et al.*, 2006). Este maior aporte de carboidratos e lipídios faz com que estimule o pâncreas endócrino, levando à alta taxa de proliferação celular das células β -pancreáticas (Scaglia *et al.*, 1997; Aguayo-Mazzucato *et al.*, 2006), baixa sensibilidade à glicose e secreção de insulina (Aguayo-Mazzucato *et al.*, 2006), sendo considerado um período de remodelamento pancreático.

Thyssen *et al.* (2006) administraram droga beta-citotóxica (streptozotocin) em ratos machos no dia 4 de vida pós-natal e os ratos diabéticos apresentaram perda das células β -pancreáticas logo após a indução do diabetes, contudo, houve aumento da proliferação de células α e β e, após 20 dias, houve recuperação na porcentagem das células β -pancreáticas, mostrando que as células não- β participam do processo de recuperação das ilhotas pancreáticas em animais diabéticos.

Considerando os resultados obtidos sobre as alterações estruturais e funcionais das ilhotas pancreáticas no período pós-natal de ratos, fica evidente que a porção endócrina do pâncreas passa por uma janela crítica de desenvolvimento e que determinadas alterações podem possibilitar doenças na vida adulta, como o diabetes. Sendo assim, é relevante compreender os mecanismos envolvidos nestas alterações. Para isso, o presente estudo visa avaliar temporalmente o padrão de distribuição das células endócrinas pancreáticas bem como de enzimas antioxidantes em ilhotas de ratas com e sem diabetes durante a janela crítica de desenvolvimento pós-natal.

MATERIAIS E MÉTODO

1. Animais

Foram utilizadas ratas da linhagem *Wistar* (Apêndice 1) mantidas sob condições controladas de temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade ($50\pm 10\%$) e ciclo claro/escuro (12h) no Biotério do Laboratório de Pesquisa Experimental em Ginecologia e Obstetrícia. Água filtrada e ração foram oferecidas *ad libitum*. Essas ratas foram acasaladas com machos normoglicêmicos (proporção de três fêmeas e um rato macho) para obtenção de recém-nascidos (RN) para composição dos grupos não-diabético (controle) e diabético (indução do diabetes com níveis glicêmicos de menor intensidade). Todos os procedimentos experimentais aplicados nesse

REFERÊNCIAS

- Aguayo-Mazzucato C, Sanchez-Soto C, Godinez-Puig V, Gutiérrez-Ospina G, Hiriart M. Restructuring of pancreatic islets and insulin secretion in a postnatal critical window. *PLoS One*. 2006; 20(1):e35.
- Baron AD, Schaeffer L, Shragg P, Kolterman OG. Role of hyperglucagonemia in maintenance of increased rates of hepatic glucose output in type II diabetics. *Diabetes*. 1987;36:274-283.
- Bonner-Weir S, Orci L. New perspectives on the microvasculature of the islets of Langerhans in the rat. *Diabetes*. 1982; 31:883-889.
- Bonner-Weir S, Sullivan BA, Weir GC. Human Islet Morphology Revisited: Human and Rodent Islets Are Not So Different After All. *J Histochem Cytochem*. 2015;63(8):604-12.
- Bosco D, Armanet M, Morel P, Niclauss N, Sgroi A, Muller YD, Giovannoni L, Parnaud G, Berney T. Unique arrangement of alpha- and beta-cells in human islets of Langerhans. *Diabetes*. 2010; 59:1202-1210.
- Bousquet C, Guillermet J, Vernejoul F, Lahlou H, Buscail L, Susini C. Somatostatin receptors and regulation of cell proliferation. *Dig Liver Dis*. 2004; 36(1): S2-7.
- Brunicardi FC, Stagner J, Bonner-Weir S, Wayland H, Kleinman R, Livingston E, Guth P, Menger M, McCuskey R, Intaglietta M, Charles A, Ashley S, Cheung A, Ipp E, Gilman S, Howard T, Passaro E, Jr. Microcirculation of the islets of Langerhans. Long Beach Veterans Administration Regional Medical Education Center Symposium. *Diabetes*. 1996; 45:385-392.
- Geert AM, Ying C, Simon H, Geert S, Mark VC, Daniel P. Glucose Suppresses Superoxide Generation in Metabolically Responsive Pancreatic β Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280(21):20389–20396.
- Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*. 2010 Oct 29;107(9):1058-70.
- Iki K, Pour PM. Distribution of pancreatic endocrine cells including IAPP-expressing cells in non-diabetic and type 2 diabetic cases. *J Histochem Cytochem*. 2007;55:111-118.
- Kordowich S, Mansouri A, Collombat P. Reprogramming into pancreatic endocrine cells based on developmental cues. *Mol Cell Endocrinol*. 2009; 315(1-2): 11-8.
- Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radical Biology & Medicine*. 1996;20(3):463-466.
- Lenzen S. Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. *Biochem Soc Trans*. 2008 Jun;36(Pt 3):343-7.
- Lucas A. Programming by early nutrition. An experimental approach. *J Nutr*. 1998; 128: 401S–406S.
- Low PA, Nickander KK, Tritschler HJ. The role of oxidative stress and antioxidant treatment in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 1997; 46: 538–542.

Mello MAR, Souza T, Braga LR, Santos W, Ribeiro IA, Gobatto CA (2001). Glucose tolerance and insulin action in monosodium glutamate (MSG) obese exercise-trained rats. *Physiol Chem Phys Med*. 33(1):63-71.

Nyman LR, Wells KS, Head WS, McCaughey M, Ford E, Brissova M, Piston DW, Powers AC. Real-time, multidimensional in vivo imaging used to investigate blood flow in mouse pancreatic islets. *J Clin Invest*. 2008;118:3790-3797.

O'Brien BA, Harmon BV, Cameron DP, Allan DJ. Beta-cell apoptosis is responsible for the development of IDDM in the multiple low-dose streptozotocin models. *J Pathol* 1996; 178: 176–181.

Ohtani O, Ushiki T, Kanazawa H, Fujita T. Microcirculation of the pancreas in the rat and rabbit with special reference to the insulo-acinar portal system and emissary vein of the islet. *Arch Histol Jpn*. 1986;49:45-60.

Pfeifer CR, Shomorony A, Aronova MA, Zhang G, Cai T, Xu H, Notkins AL, Leapman RD. Quantitative analysis of mouse pancreatic islet architecture by serial block-face SEM. *J Struct Biol*. 2004.

Reaven GM, Chen YD, Golay A, Swislocki AL, Jaspan JB. Documentation of hyperglucagonemia throughout the day in non obese and obese patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987;64:106-110.

Robertson RP. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem*. 2004 Oct 8;279(41):42351-4.

Samols E, Bonner-Weir S, Weir GC. Intra-islet insulin glucagon-somatostatin relationships. *Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1986;15:33-58.

Scaglia L, Cahill CJ, Finegood DT, Bonner-Weir S. Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in the neonatal rat. *Endocrinology*. 1997;138(4):1736-41.

Sinzato YK, Damasceno DC, Laufer-Amorim R, Rodrigues MMP, Oshiiwa M, Taylor KN, Rudge MVC. Plasma concentrations and placental immunostaining of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha as predictors of alterations in the embryofetal organism and the placental development of diabetic rats. *Braz J Med Biol Res*. 2011; 44(3), 206-11.

Talchai C, Xuan S, Lin HV, Sussel L, Accili D. Pancreatic β cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic β cell failure. *Cell*. 2012;150(6):1223-34.

Thyssen S, Arany E, Hill DJ. Ontogeny of regeneration of beta-cells in the neonatal rat after treatment with streptozotocin. *Endocrinology*. 2006; 147(5):2346-56.

Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes*. 1997 Nov;46(11):1733-42.