

ANÁLISE QUANTITATIVA DAS CÉLULAS DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS EM RATOS SOB EFEITO DE ALOXANA*

QUANTITATIVE ANALYSIS OF CELLS OF THE PANCREATIC ISLETS IN RATS UNDER EFFECT OF ALLOXAN

Marcus Aurelio de Lima¹, Lilian Margareth Biagioni de Lima², Danielle Patrícia Castanheira Rita³, Fábio Castilho Navarro³, Ranaia Santana Tatsukawa³, Gilberto de Araújo Pereira⁴, Luiz Carlos dos Reis⁵, Marta Elena Araújo de Abreu⁶ & Maria de Fátima Borges⁷

¹Médico patologista e professor de Endocrinologia da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro (FMTM); ²Professora de Patologia Geral da Universidade de Uberaba (UNIUBE); ³Alunos de Iniciação Científica do CNPq e FAPEMIG; ⁴Professor de Bioestatística; ⁵Professor de Fisiologia da FMTM; ⁶Farmacêutica Bioquímica da Fundação de Ensino e Pesquisa de Uberaba (FUNEP) e ⁷Professora de Endocrinologia da FMTM.

CORRESPONDÊNCIA: Dr. Marcus Aurelio de Lima. Disciplina de Endocrinologia – Hospital Escola. Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro. Rua Getúlio Guaritá, 130, Abadia 38025-440. Uberaba- MG. Brasil. Fone: (34)3185258 / 3185628, Fax:(034)3126640, E-mail: lima@mednet.com.br

LIMAMA, LIMALMB, RITADPC, NAVARRO FC, TATSUKAWARS, PEREIRAGA, REISLC, ABREUMEA & BORGES MF. Análise quantitativa das células das ilhotas pancreáticas em ratos sob efeito de aloxana. **Medicina, Ribeirão Preto, 34: 308-314, jul./dez. 2001.**

RESUMO: No presente estudo, avaliamos a influência da aloxana sobre as células das ilhotas pancreáticas de ratos, realizando análise quantitativa das células α , β e δ .

Foram utilizados 20 ratos (*Rattus norvegicus*), machos, da linha Wistar, distribuídos em dois grupos de 10 ratos, sendo um, grupo-controle e outro grupo experimental. Após jejum de 36 horas, foram administrados, por via endovenosa, 40 ml/Kg de monodrato de aloxana e, cerca de 30 minutos após, foi oferecido alimento ao animal. Ao final de 10 dias de observação, os animais foram sacrificados. Foram selecionadas amostras de diferentes regiões do pâncreas e submetidas a processamento histológico, tendo sido coradas com hematoxilina e eosina. Para o estudo imunohistoquímico, foram utilizados anticorpos antiinsulina, antiglucagon e anti-somatostatina. A análise quantitativa foi realizada em oito ilhotas pancreáticas, as mais representativas de cada animal. Os resultados foram considerados significativos, quando $p < 0,05$. Houve redução significativa do número de células β e aumento significativo, do número de células δ . Os resultados reforçam a afirmação de que a aloxana tem ação destrutiva sobre as células e exerce influência significativa sobre as células δ pancreáticas, o que já havia sido observado em outros estudos.

UNITERMOS: Ilhotas de Langerhans. Insulina. Glucagon. Somatostatina. Imuno-histoquímica. Aloxana.

1. INTRODUÇÃO

O pâncreas endócrino é constituído por pequenos grupos circunscritos, as ilhotas de Langerhans ⁽¹⁾,

compostas por células α , produtoras de glucagon, células β , produtoras de insulina, células δ , produtoras de somatostatina e células PP, produtoras de polipeptídeo pancreático ^(2,3). As ilhotas pancreáticas podem

*Suporte Financeiro: CNPq308

sofrer alterações funcionais e morfológicas, decorrentes de vários fatores, dentre os quais, fármacos que produzem radicais livres como aloxana e estreptozotocina⁽⁴⁾.

A aloxana é uma substância que possui, comprovadamente, ação seletiva e destrutiva sobre as células β pancreáticas^(5,6) e que induz ao *Diabetes mellitus*, em animais experimentais^(7,8). Alguns estudos demonstraram que a formação de radicais superóxido e hidroxila, induzidos por aloxana, é responsável pela citotoxicidade desse composto^(1,6,9/15). Outros experimentos sugerem que a inibição da secreção de insulina por aloxana é causada por sua interferência com as proteínas citoplasmáticas que contêm sulfidril e dissulfide^(7,16).

Estudo, utilizando o método imunoistoquímico, observou que os pâncreas dos animais com *Diabetes mellitus*, induzido por aloxana, apresentaram redução de 70% da área da ilhota ocupada pelas células beta, chegando até a ausência delas, enquanto houve aumento da área ocupada por células δ e não houve alteração no conteúdo de células produtoras de glucagon nas ilhotas⁽¹⁷⁾. Outro estudo concluiu que, aparentemente, a aloxana causa não somente a destruição das células β , como, também, de toda a ilhota, com aumento das células α e δ por hiperplasia⁽¹⁸⁾.

Com relação à morfologia das ilhotas pancreáticas, havendo coloração por imunofluorescência e análise morfométrica, e levando-se em consideração a área total de células por ilhota, demonstrou-se que as células α e δ dos pâncreas dos ratos com *Diabetes mellitus*, induzido por aloxana ou estreptozotocina, estão dispersas e com forma distorcida, em contraste com sua localização periférica normal⁽¹⁹⁾.

Alguns trabalhos demonstraram que, a longo prazo (tempo maior que 60 dias), o tratamento de ratos, com doses subdiabetogênicas de aloxana, induz à hipoglicemia somente em aproximadamente 25% dos animais. O mecanismo de melhora do *Diabetes*, nesse caso, parece estar relacionado aos mecanismos de reparo nas células β , iniciados pela própria aloxana ou pela hipoglicemia de longa duração⁽²⁰⁾. Outro estudo demonstrou que há duas formas de regeneração das células β : proliferação e diferenciação⁽¹³⁾.

Em vista de tais observações e contradições, propusemo-nos verificar o efeito, a curto prazo (10 dias), em ratos, da injeção de aloxana sobre a morfologia, das ilhotas pancreáticas, realizando análise quantitativa das células α , β e δ , através do método imunoistoquímico.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Seleção da amostra

Foram utilizados 20 ratos (*Rattus norvegicus*), machos, da linha Wistar, com peso corporal, inicial entre 200 e 300 g, provenientes do biotério da Disciplina de Fisiologia.

2.2 Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos em dois grupos, cada um com 10 ratos, sendo um grupo-controle, denominado N (controle normal) e um grupo experimental, identificado como grupo A (com ratos que receberam injeção de aloxana).

2.3 Injeção de aloxana

Os animais foram mantidos em jejum por 36 horas, recebendo apenas água e, ao final do período, foram administrados 40ml/Kg, por via endovenosa, de monidrato de aloxana (Nutritional Biochemical Corp.) a 2%, diluídos com solução salina fisiológica. A injeção de aloxana foi feita através da veia jugular interna, após anestesia por inalação de éter etílico. Aproximadamente 30 minutos após a administração de aloxana, foi oferecido alimento ao animal. Ao final de dez dias de observação, os animais foram sacrificados para a realização da coleta de sangue e para a retirada de órgãos. O horário de sacrifício, para os grupos estudados, variou, das nove às quinze horas.

2.4 Coleta de órgãos

Sob anestesia inalatória com éter, abriu-se a caixa torácica dos animais, e o coração foi exposto para que se fizesse a perfusão pelo ventrículo esquerdo, que foi iniciada com solução salina fisiológica (NaCl 0,9%) até o clareamento dos órgãos (cerca de 300 ml) e, a seguir, utilizou-se formalina tamponada a 4% pH 7,4 até o enrijecimento do corpo do animal, cerca de 100 ml. Após a perfusão, foi feita a coleta e pesagem do pâncreas, que foi mantido em frascos de vidro, contendo formalina tamponada com pH 7,4, para posterior análise morfológica.

2.5 Processamento histológico do pâncreas

Para análise morfológica, o pâncreas, após a coleta e manutenção em frasco de vidro, contendo formalina tamponada (pH 7,4), durante 3 dias, foi dividido em três segmentos: proximal (A), médio (B) e distal (C) em relação ao duodeno, e submetido ao processamento histológico para preparação das lâmi-

nas. Os fragmentos dos segmentos, fixados em formalina a 3,7%, foram desidratados por uma bateria de álcool etílico com concentração crescente (70%, 80%, 90% e álcool absoluto), diafanizados em xilol, emblocados em parafina e cortados por micrótomo, em cortes com espessura de 5 μ m. As secções obtidas foram secadas em estufa a 37°C e coradas com hematoxilina e eosina.

2.6 Estudo imunoistoquímico

Para a realização do estudo imunoistoquímico, fizeram desparafinização das lâminas, hidratação e aquecimento em forno microondas por dois ciclos de nove minutos. Foram feitos resfriamento e passagem das lâminas em H₂O₂ a 3%, em água destilada, por 15 minutos e em água corrente e PBS (fosfato básico de sódio) por 15 minutos. Para o estudo das células β , foi utilizado anti-soro de porco da Índia com concentração protéica de 6,4 mg/ml (LOWRY, padrão de albumina bovina), com imunogenicidade para insulina pancreática porcina, porém com reações cruzadas com insulina de vários mamíferos, incluindo os ratos analisados e também, humanos, na diluição de 1:500 (DAKO corporation-carpinteria, CA-USA, código número A564, lote número 045C). Para o estudo das células α , foi utilizado anti-soro de coelho com concentração protéica de 18mg/ml (LOWRY, padrão de albumina bovina), com imunogenicidade para glucagon pancreático porcino e reações cruzadas para um grande número de espécies de mamíferos, incluindo ratos e humanos, na diluição de 1:500 (DAKO corporation carpinteria CA-USA, código número A565, lote número 097). Para o estudo das células δ , foi utilizado anti-soro policlonal de coelho com concentração protéica de 20mg/ml (LOWRY, padrão de albumina bovina) e um sintético cíclico (1-14) de somatostatina conjugada a tiroglobulina bovina, com imunogenicidade para somatostatina pancreática humana, porém com reações cruzadas com a somatostatina de um grande número de espécies de mamíferos, incluindo ratos, na diluição de 1:500 (DAKO corporation carpinteria, CA-USA, código número AO566, lote número 037). Foi feita incubação a 4°C por 22 horas.

Após isto, lavamos com tampão PBS pH=7,4 e, para a detecção, usamos o *kit* de estreptavidinabiotina, conjugada com peroxidase (large volume DAKO fos AB Kit peroxidase, código 0676) e a revelação do sistema foi feita, usando-se como substrato, H₂O₂ a 0,0097% em acetato como cromógeno, usamos o AEC (Sigma-A06926) a 0,048%, em formalina de dimetil e

contracorado com hematoxilina de Mayer por cinco minutos e diferenciado com hidróxido de amônia a 1%. Por fim, as lâminas foram lavadas em água corrente e montadas com cola incolor a 50% e *entellan*.

2.7 Análise quantitativa

As lâminas contendo os fragmentos dos três segmentos de pâncreas foram avaliadas quanto à quantidade de células presentes em cada ilhota, sendo selecionadas as ilhotas mais representativas. Estabeleceu-se um número fixo de oito ilhotas, as mais representativas a serem observadas em cada rato. As células positivas das ilhotas pancreáticas eram coradas fortemente de vermelho pelos métodos imunoistoquímicos específicos (insulina, glucagon e somatostatina) e comparadas com lâminas com controles positivos. Em seguida, somamos as células de cada lâmina, separadamente, positivas para insulina, glucagon e somatostatina, em um total de 10 ratos normais e 10 ratos sob efeito de aloxana. As análises foram feitas em microscópio de luz comum (Zeiss), em objetiva de 40x. A contagem das células foi feita com auxílio de contador manual.

2.8 Análise estatística

A partir de uma análise de variância, não paramétrica (Teste de Kruskal-Wallis) e do teste de comparações múltiplas, não paramétrico (LSD – diferença mínima significativa), verificou-se que as diferenças são estatisticamente significativas entre os ratos normais e ratos sob o efeito de aloxana, quando $p < 0,05$ (5% = nível de significância).

3. RESULTADOS

Em relação às células produtoras de insulina, em ratos normais, obtivemos um valor total de 2805 células positivas para 10 ratos (60,89% do total de células), variando do número mínimo de 90 e do máximo de 696 células positivas por rato. Nas lâminas de ratos sob efeito de aloxana, obtivemos o valor total de 528 células positivas (22,62% do total de células), variando do mínimo de 13 e o máximo de 192 células positivas por rato. Em relação às células produtoras de glucagon, em ratos normais, obtivemos o valor total de 1487 células positivas (32,28% do total de células), variando do número mínimo de 67 e do máximo de 294 células positivas por rato. Nas lâminas de ratos sob efeito de aloxana, o número total de células positivas foi de 1181 (50,59% do total de células), va-

riando entre o mínimo de 36 e o máximo de 241 células positivas por rato. Em relação às células produtoras de somatostatina, em ratos normais, obtivemos o valor total de 315 células positivas (6,83% do total de células), variando do mínimo de 12 e do máximo de 61 células positivas por rato. Já em relação às células produtoras de somatostatina, em ratos sob efeito de aloxana, o número total de células positivas foi de 625

(26,77% do total de células), variando o mínimo de 13 e o máximo de 215 células positivas por rato.

Os dados mostram diminuição do número de células positivas para insulina (Figura 1) e aumento no número de células que expressam somatostatina (Figura 2) nos ratos sob efeito de aloxana em relação aos ratos normais. Não houve diferença quanto às células produtoras de glucagon (Figura 3).

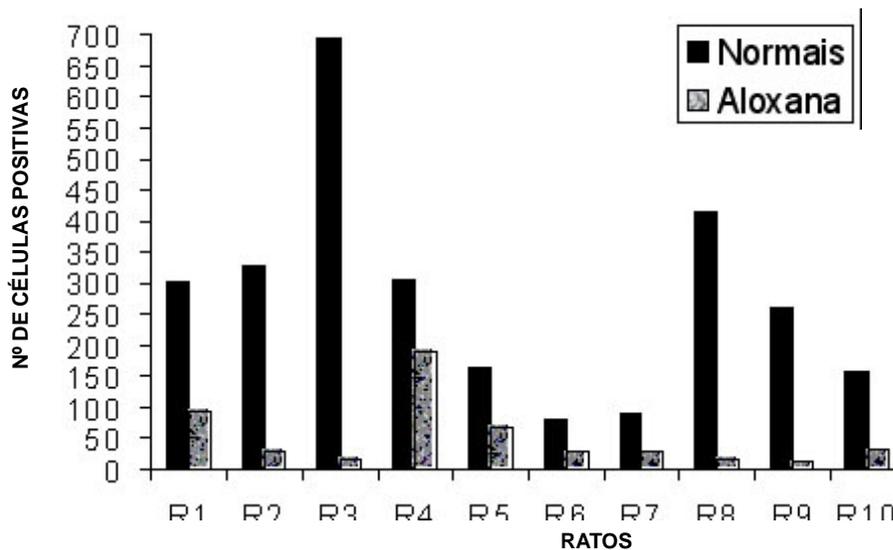


Figura 1: Número de células positivas para insulina, em ratos normais e sob efeito da aloxana.

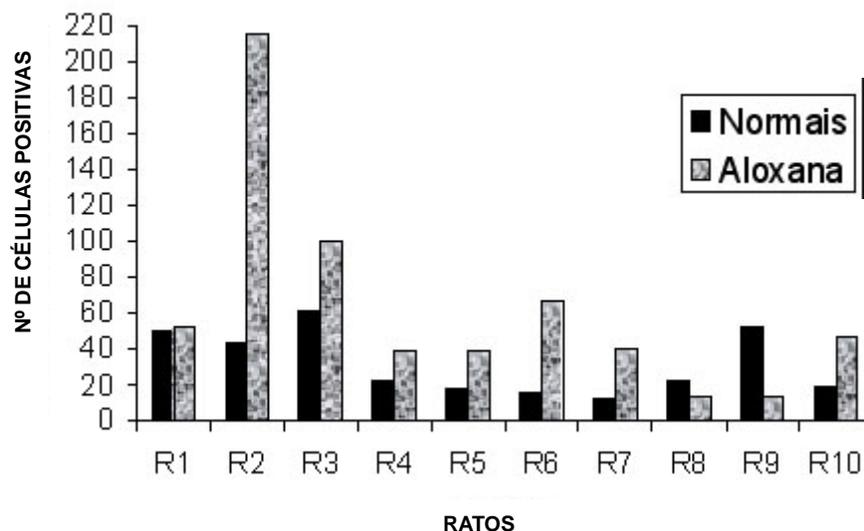


Figura 2: Número de células positivas para somatostatina, em ratos normais e sob o efeito da aloxana.

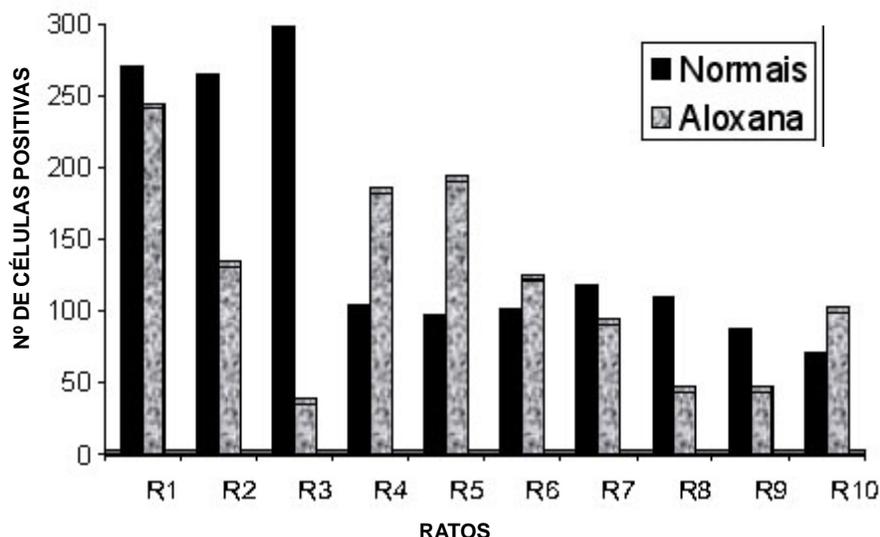


Figura 3: Número de células positivas para glucagon, em ratos normais e sob o efeito da aloxana

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Propusemo-nos verificar a influência da injeção de aloxana em ratos, sobre a morfologia, das ilhotas pancreáticas, realizando análise quantitativa das células α , β e δ , através de estudo imunoistoquímico.

Os nossos resultados demonstram que a aloxana exerce influência sobre o pâncreas endócrino. A afirmativa é baseada no fato de que, quando analisamos ilhotas de ratos sob efeito de aloxana, verificamos haver diferença estatisticamente significativa quanto ao número de células positivas para insulina e somatostatina com relação ao grupo-controle estudado. Nossos achados são semelhantes aos observados por Rastogi et al.⁽¹⁸⁾ que descrevem hiperplasia de células α e δ após a injeção de aloxana. Porém, existem resultados contraditórios. Patel et al.⁽¹⁹⁾ observaram que as células α e as células PP eram preservadas, inicialmente, enquanto as células β sofriam eliminação virtual e as células δ apresentavam severa redução, precocemente, no diabetes. Nossos estudos sugerem que há aumento significativo do número de células δ , aumento não significativo do número de células α e redução significativa do número de células β , contradizendo parcialmente os achados. Em ratos e macacos com diabetes induzido por estreptozotocina e no *Diabetes mellitus*, dependente de insulina, um aumento no número de células α e δ tem sido observado, com mudanças correspondentes nos níveis plas-

máticos de glucagon e somatostatina⁽¹⁸⁾. Níveis basais de somatostatina mais elevados foram também observados em cães com diabetes induzido por aloxana⁽¹⁸⁾. Como glucagon e insulina estimulam e inibem as células δ , respectivamente, poder-se-ia levantar a possibilidade de que os níveis elevados de glucagon e os níveis baixos de insulina, observados em cães diabéticos por efeito de aloxana, poderiam ser responsáveis pela produção aumentada de somatostatina *in vivo*⁽¹⁸⁾. Hipertrófia e hiperplasia de células δ , no diabetes, poderiam ser também causadas por mudanças na glicose, ácidos graxos livres ou cetonas, os quais são conhecidos por aumentar a liberação de somatostatina no rato diabético⁽¹⁸⁾. A formação de peróxido de hidrogênio, induzida por aloxana, causa fragmentação do DNA das células produtoras de insulina e, conseqüentemente, *Diabetes mellitus*^(13,14,21). Estudos demonstraram que o efeito da aloxana sobre a secreção de insulina ocorre em dois estágios; inicialmente, há a ação estimulante com liberação rápida do hormônio, presumivelmente em virtude do influxo de íons de cálcio ao citosol das células β , logo após, a secreção de insulina pára completamente, mesmo durante a estimulação com altas doses de glicose, em decorrência da necrose de células β pancreáticas.

Experimentos com composto de aloxana (marcado com isótopo 14 de C) demonstraram que a captação deste composto pelas células β é maior, em comparação com as demais células das ilhotas pancreáticas⁽²⁰⁾.

Alguns trabalhos demonstraram que, a longo prazo (tempo maior que 60 dias), o tratamento de ratos com doses subdiabetogênicas de aloxana induz à hipoglicemia somente em cerca de 25% dos animais⁽¹²⁾. O mecanismo de melhora, nesse caso, parece estar relacionado aos mecanismos de reparo nas células β , iniciados pela própria aloxana ou pela hipoglicemia de longa duração. Outro estudo⁽⁶⁾, utilizando o método imunoistoquímico, dividiu o pâncreas de rato em áreas onde houve e onde não houve perfusão por aloxana através do clampeamento da artéria mesentérica superior. Esse estudo demonstrou que há duas formas de regeneração das células β : proliferação e diferenciação. No segmento onde houve perfusão por aloxana, observou-se que, a longo prazo, há um aumento no número de células β . Esse aumento ocorre principalmente próximo aos ductos, sugerindo que elas poderiam ter se diferenciado das células do ducto. No segmento onde não houve perfusão por aloxana, sugeriu-se que as células β se regenerariam por prolifera-

ção das células pré-existentes. Esse estudo demonstrou que, após um ano de seu início, a tolerância à glicose estava completamente normal com um aumento concomitante do conteúdo de insulina do pâncreas. Em nosso estudo, a análise do efeito da aloxana foi feita a curto prazo e supõe-se que as ilhotas não tenham sofrido o efeito da regeneração das células β .

Após análise criteriosa dos dados da literatura mundial, correlacionando-os com resultados do presente estudo, que demonstram alterações morfológicas nos pâncreas de ratos sob efeito de aloxana, é possível reforçar a afirmação de que esse composto tem ação destrutiva sobre as células β pancreáticas. Além disso, no presente estudo, observamos que a aloxana também exerce influência significativa sobre as células δ pancreáticas, o que já havia sido observado por outros autores⁽¹⁸⁾. Entretanto, o mecanismo de ação da aloxana sobre as células β e δ pancreáticas não foi completamente demonstrado, existindo várias hipóteses em estudo.

LIMA MA, LIMA LMB, RITA DPC, NAVARRO FC, TATSUKAWARS, PEREIRAGA, REIS LC, ABREU MEA & BORGES MF. Quantitative analysis of cells of the pancreatic islets in rats under effect of alloxan. **Medicina, Ribeirão Preto**, 34: 313-314, july/dec. 2001.

ABSTRACT: In the present study, we verified the influence of alloxan over the cells of pancreatic islet of rats, performing quantitative analysis of α , β and δ cells through immunohistochemical study.

Twenty male rats (*Rattus norvegicus*) were used of Wistar line, disposed in 2 groups of 10 rats on each, being a control group and an experimental one. After fasting of 36 hours, 40 ml/Kg of monohydrated of alloxan was administrated by intravenous via and about 30 minutes after, the animal was offered food. At the end of 10 days of observation, animals were sacrificed. Samples of different regions of pancreas were selected and undergone to a histological process and stained with hematoxilin-eosin. To the immunohistochemical study, anti-insulin, anti-glucagon and anti-somatostatin antibodies were used. Quantitative analysis was performed in eight most representative pancreatic islets of each animal. Results were considered significative when $p < 0.05$. There was a significative reduction in the number of β cells and a significative increase in the number of δ cells. Results reinforce the assertion that alloxan exerts significative influence over the pancreatic β cells, destructing the islets and over the pancreatic δ -cells, which has already been observed in other studies. However, the action mechanism of alloxan over the pancreatic β - and δ -cells was not completely shown, therefore having necessity of more studies to its elucidation.

UNITERMS: Islets of Langerhans. Insulin. Glucagon. Somatostatin. Immunohistochemistry. Alloxan.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 - MATTHEWS DR & CLARK A. Neural control of endocrine pancreas. **Proc Nutr Soc** 46: 89-95, 1987.

2 - GODOY P. Pâncreas endócrino. In: BRASILEIRO FILHO G; PITTELLA JEH; PEREIRA FEL; BAMBIRRA EA & BARBOSAAJA **Bogliolo patologia**, 5ª ed Guanabara Koogan,.: Rio de Janeiro, p. 950-952, 1994.

- 3 - SLACK JMW Developmental biology of pancreas. **Development** **121**: 1569-1580, 1995.
- 4 - MONTILLA PL; VARGAS JF; TUNEZ IF; MUNOZ DE AGUEDA MC; VALDEVIRA ME & CABRERA ES Oxidative stress in diabetic rats induced by streptozotocin: Protective effects of melatonin. **J Pineal Res** **25**: 94-100, 1998.
- 5 - BOWMAN WC & RAND MJ Sistema endocrino y drogas que afectan su función. In: **Farmacología. Bases bioquímicas y patológicas. Aplicaciones clínicas**, 2ª ed. Nueva Editorial Interamericana: México p.19-53, 1984.
- 6 - WAGURI M; YAMAMOTO K; MIYAGAWA JI; TOCHINO Y; YAMAMORI K; KAJIMOTO Y; NAKAJIMA H; WATADA H; YAMASAKI Y; HANAFUSA T & MATSWAZAWA Y Demonstration of two different processes of b-cell regeneration in a new diabetic mouse model induced by selective perfusion of alloxan. **Diabetes** **46**: 1281-90, 1997.
- 7 - JENNISCHE E & HANSON HA Relation between alloxan-induced plasma membrane dysfunction inhibition of insulin secretion in pancreatic B-cells in vivo. **Acta Pathol Microbiol Immunol Scand** **94**: 153-158, 1986.
- 8 - MULDER H; GEBRE-MEDHIN S; BETSHOLTZ C; SUNDLER F & AHREN B Islet amyloid polypeptide (amylin)-deficient mice develop a more severe form of alloxan-induced diabetes. **Am J Physiol Endocrinol Metab** **278**: 684-691, 2000.
- 9 - AHRÉN B & SUNDKVIST G Long-term effects of alloxan in mice. **Int J Pancreatol** **7**: 197-201, 1995.
- 10 - BRÖMME HJ; EBELT H; PESCHKE D & PESCHKE E Alloxan acts as a pro-oxidant only under reducing conditions: influence of melatonin. **Cell Mol Life Sci** **55**: 487-493, 1999.
- 11 - MINAMI T; SHIMIZU M; TANAKA H; OKAZAKI Y; CHERIAN MG Melalothionein does not protect mouse endocrine cells from damage induced by alloxan injection. **Toxicology** **132**: 33-41, 1999.
- 12 - SOTO C; MURIEL P & REYES JL Pancreatic lipid peroxidation in alloxan-induced Diabetes Mellitus. **Arch Med Res** **25**: 377-380, 1994.
- 13 - TAKASU N; ASAWA T; KOMIYA I; NAGASAWA Y & YAMADA T. Alloxan- Induced DNA strand breaks in pancreatic islets. Evidence for H₂O₂ as an Intermediate. **J Biol Chem** **266**: 2112-2114, 1991.
- 14 - TAKASU N; KOMIYA I; ASAWA T; NAGASAWA Y & YAMADA T. Streptozotocin-and- alloxan-induced H₂O₂ generation and DNA fragmentation in Pancreatic Islets. **Diabetes** **40**: 1141-1145, 1991.
- 15 - ZHANG H; ZDOLSEK JM & BRUNK UT Alloxan cytotoxicity involves lysosomal damage. **Acta Pathol Microbiol Immunol Scand** **100**: 309-316, 1992.
- 16 - BILIC N & FELBER MD Diabetogenic action of alloxan following temporary interruption of arterial blood flow to pancreas in rats. **Diabetes** **19**: 81-84, 1970.
- 17 - RASTOGI K S; LICKLEY L; JOKAY M; EFENDIC S & VRANIC M Paradoxical reduction in pancreatic glucagon with normalization of Somatostatin and decrease in insulin in normoglycemic alloxan-diabetic dogs: a putative mechanism of glucagon irresponsiveness to hypoglycemia. **Endocrinology** **126**: 1096-1104, 1990.
- 18 - RASTOGI KS; BRUBAKER PL; KAWASAKI A; EFENDIC S & VRANIC M Increase in somatostatin to glucagon ratio in islets of alloxan-diabetic dogs: effect of insulin-induced euglycemia. **Can J Physiol Pharmacol** **71**: 512-517, 1993.
- 19 - PATEL YC; RUGGERE D; MALAISSE-LAGAE F & ORCI LA Alterations in somatostatin and other islet cell functions in the spontaneously diabetic BB Wistar rat: Biochemical and morphological characterization. **Metabolism** **32**: 7, 1983. Suppl.1.
- 20 - KLIBERA A; SZKUDELSKI T & CHICHOŁWSKA J. Alloxan stimulation and Subsequent inhibition of insulin release from in situ perfused rat pancreas. **J Physiol Pharmacol** **47**: 321-328, 1996.
- 21 - MATKOVICS B; SASVÁRI M; KOTÓRMAN M; VARGA IS; HAI DG & VARG C. Further prove on oxidative stress in alloxan diabetic rat tissues. **Acta Physiol Hung** **85**: 183-192, 1997.

Recebido para publicação em 06/09/2000

Aprovado para publicação em 02/08/2001