



Primer Congreso Virtual de
Ciencias Básicas Biomédicas en Granma.
Manzanillo.



EFFECTO DE LA HIPERGLUCEMIA PREGESTACIONAL EN LA MORFOLÓGIA FETAL EN UN MODELO DE DIABETES EXPERIMENTAL

Autores: Leticia Bequer ¹, Tahiry Gómez ¹, José Luis Molina ¹, Cindy Freire ¹, Alain Álvarez ¹, Maryoil Quintero ², Milagros García ³, Sonia Clapés ⁴.

¹ MSc, Unidad de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, ² Especialista en Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, ³ Especialista en Embriología, Departamento de Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, ⁴ Dr. Ciencias, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, ICBP "Victoria de Girón". Universidad de Ciencias Médicas de La Habana.

Villa Clara, Cuba.

leticiacbm@infomed.sld.cu



Resumen

Introducción: La gestación diabética provoca serias consecuencias para la madre y su descendencia. La utilización de modelos animales es necesaria para el estudio de anomalías durante la gestación.

Objetivo: Evaluar el efecto de la hiperglucemia moderada pregestacional sobre la morfología fetal en un modelo de diabetes experimental.

Materiales y métodos: La diabetes se indujo por inyección subcutánea de estreptozotocina (100mg/Kg-peso-corporal) en ratas Wistar hembras. Se conformaron dos grupos experimentales (GD-GC). En la adultez las ratas se aparearon con machos sanos. Al día 20 de gestación se practicó la cesárea y sacrificio. Se extrajeron los fetos y placentas, y se analizaron individualmente. Los fetos se clasificaron como pequeños, adecuados y grandes para la edad gestacional, y se examinaron buscando anomalías externas.

Resultados y discusión: Las hiperglucemias pregestacionales maternas provocaron en la descendencia restricción del crecimiento intrauterino comprobado por la reducción de las dimensiones fetales, craneofaciales y placentarias, y una mayor proporción de fetos pequeños para la edad gestacional. Sólo un feto presentó diversas malformaciones coincidiendo con la madre diabética de peor control metabólico.

Conclusiones: El modelo experimental empleado reprodujo complicaciones fetales similares a la diabetes pregestacional humana y puede ser útil para identificar los mecanismos implicados en la gestación diabética humana.



Introducción

La Diabetes mellitus (DM) representa uno de los mayores problemas para los sistemas de salud mundiales debido a los altos costes sanitarios y sociales de la enfermedad. Las personas diabéticas presentan elevados riesgos de complicaciones que conllevan a necesidad de atención médica, reducción de la calidad de vida, años de vida potencial perdidos, muertes prematuras y estrés familiar ^{1, 2}. Según la Asociación Latinoamericana de Diabetes (ALAD), el término DM define un desorden metabólico de etiología multifactorial, que se caracteriza por hiperglucemias crónicas con disturbios del metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas, como resultante de alteraciones en la secreción y/o acción de la insulina ^{1, 3}.

La hiperglucemia crónica, propia de la diabetes, condiciona y se asocia a otra serie de factores que causan daño, disfunción o fallo en varios órganos y sistemas. Diversos procesos patogénicos están involucrados en el desarrollo y la progresión de las múltiples lesiones orgánicas de la diabetes (glucotoxicidad, lipotoxicidad, estrés oxidativo, etc.). En su evolución se caracteriza por afectación vascular gradual y progresiva, tanto de los pequeños vasos (microangiopatía) como de los grandes vasos (macroangiopatía) ^{1, 4}.

Particularmente la DM tipo 2 (DM2) es el tipo más prevalente de diabetes, entre un 90-95% de todos los casos, se produce como resultado de mecanismos de resistencia a la insulina asociados con defectos en la secreción de esta hormona. Se caracteriza por presentarse principalmente en el adulto, sin embargo actualmente también se diagnostica en jóvenes, adolescentes y niños correlacionándose con el incremento de la prevalencia de la obesidad en estas edades ^{5, 6}.

A su vez, la Federación Internacional de Diabetes (IDF, por sus siglas en inglés) reporta que uno de cada seis embarazos (16,8 %) está afectado por la diabetes. A pesar de los grandes esfuerzos realizados por los sistemas de salud pública a nivel mundial para disminuir la morbi-mortalidad por la DM, la IDF estima que 223 millones de mujeres entre 20 y 79 años vivían con diabetes en el 2019; se proyecta para el 2045 un incremento a 343 millones de mujeres diabéticas. La IDF reporta además que en ese mismo año 20 millones de nacidos vivos (16 %) presentaron algún tipo de hiperglucemia durante su embarazo.



La prevalencia de la diabetes en mujeres en edad fértil se debe a la presencia de diabetes antes del embarazo, condición conocida como diabetes pregestacional, o a la aparición de la diabetes durante el embarazo, conocida como DMG ^{7, 8}. En dependencia del momento de aparición y el grado de trastorno metabólico de la complicación se generan consecuencias negativas tanto para la madre diabética como para su descendencia. En las complicaciones de la diabetes para la descendencia se distingue la embriopatía diabética (aborto y malformaciones congénitas) en la primera mitad de la gestación, y fetopatía diabética (alteraciones del crecimiento y del metabolismo, retraso de la maduración, especialmente pulmonar, pérdida del bienestar fetal y mortalidad fetal) en la segunda mitad de la gestación ^{9, 10}. Por otra parte, los hijos de madres diabéticas están expuestos a padecer determinadas enfermedades en su vida adulta ¹¹. Debido a las lógicas limitaciones para estudios en humanos, tanto éticas como experimentales, se han desarrollado modelos biológicos que permiten estudiar la diabetes y gestación. Estos modelos ofrecen múltiples posibilidades experimentales para acercarse a la evaluación de los numerosos fenotipos posibles que comprenden el desarrollo humano en la diabetes materna. Tanto el entorno materno como los antecedentes genéticos son importantes en el complejo proceso multifactorial que induce daño al embrión, la placenta, el feto y la descendencia ^{12, 13}. Así, el uso de modelos experimentales de diabetes es crucial en la comprensión de la fisiopatología de los defectos inducidos por la diabetes en la gestación.

Objetivos

Este trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto de la hiperglucemia moderada pregestacional sobre la morfología fetal en un modelo de diabetes experimental.



Materiales y métodos

El estudio se realizó en un modelo biológico de DM moderada producido por inducción química con STZ en la etapa neonatal, en ratas hembras de la línea Wistar adquiridas en el Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), La Habana, Cuba. Los animales de experimentación se mantuvieron en condiciones estrictamente controladas de temperatura (19-25°C), humedad relativa (45-65%) y luz (ciclos 12 h luz/oscuridad). Se alimentaron a libre demanda con dieta completa concentrada para la alimentación de rata convencional todo propósito, fórmula CMO 1000, y con libre acceso al agua. El diseño experimental utilizado en este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Unidad de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, Cuba y se realizó siguiendo las recomendaciones para la experimentación animal del National Institutes of Health.

Se conformaron dos grupos experimentales: Grupo Control (GC) y Grupo Diabético (GD). La diabetes fue inducida al segundo día de nacidas las crías por vía subcutánea de 100 mg de STZ/kg de peso corporal disuelta en buffer citrato 0.1M (pH4,5). El GC recibió solamente buffer citrato en condiciones similares. A los 90 días de nacidos, ambos grupos de experimentación se aparearon con machos sanos aproximadamente durante 3 ciclos estrales (15 días). El día 0 de la gestación se consideró cuando en el frotis vaginal realizado temprano en la mañana (8:00 am) se detectaron espermatozoides. Las ratas no gestadas durante este periodo se consideraron infértiles, excluyéndose del experimento. Todas las ratas gestadas se mantuvieron en cajas individuales.

El día 20 de gestación las ratas se anestesiaron con tiopental sódico (50-60 mg/kg) y se practicó la cesárea extrayendo los cuernos uterinos. Bajo los efectos de la anestesia se colocaron en una tabla operatoria en decúbito supino. Mediante una laparotomía xifopubiana en la línea media abdominal se expusieron ambos cuernos uterinos; posteriormente se extrajeron y colocaron en una placa de Petri con solución salina fisiológica. En ambos cuernos se extirpó la grasa y el tejido periuterino. Posteriormente se realizó la eutanasia por exsanguinación a través de una punción intracardiaca. A continuación de separados los cuernos uterinos se extrajeron los fetos y placentas, que



se pesaron y analizaron individualmente. Un estímulo táctil se aplicó a cada feto para comprobar su viabilidad.

La evaluación morfométrica se realizó en 111 y 118 fetos descendientes de ratas diabéticas (GD) y controles (GC) respectivamente mediante la observación del aspecto externo del feto y mediciones realizadas con pie de rey (Vernier Caliper, China). Se tuvieron en cuenta las variables siguientes: dimensiones corporales (peso, distancia cráneo-caudal y longitud de la cola), dimensiones craneofaciales (presencia de huesos del cráneo, diámetro biparietal, diámetro anteroposterior, diámetros entre poro nasal y pabellón auricular derecho e izquierdo) y dimensiones placentarias (peso, grosor y diámetros mayor y menor).

A partir de los datos anteriores se calculó la eficiencia placentaria según la fórmula:

$$\text{Eficiencia placentaria} = \frac{\text{peso fetal}}{\text{peso de la placenta}}$$

Los fetos se clasificaron acorde a los percentiles del peso fetal determinados en el grupo no diabético. La clasificación consistió en pequeño para la edad gestacional (PEG) cuando el peso fue menor que el percentil 5; apropiado para la edad gestacional (AEG) cuando el peso estaba incluido en los percentiles 5 y 95; y grande para la edad gestacional (GEG) cuando el peso fue superior al percentil 95. La clasificación se llevó a cabo según modificación de Soulimane-Mokhtari et al. ¹⁴.

Para el estudio macroscópico externo de los fetos se registraron, con cámara digital Cannon Power Shot G11 (Japón), imágenes individuales en posición dorsal, ventral y lateral derecho e izquierdo. El análisis de las estructuras craneofaciales incluyó la presencia y tipo de hendiduras faciales (maxilares, mandibulares o ambas), presencia de exoftalmos en ambos lados, ausencia de bigotes en ambos lados, implantación normal o baja de ambas orejas, malformaciones del pabellón auricular, presencia y posición de los apéndices faciales y deformidades nasales, presencia y posición de las estructuras en la cavidad oral (labios, lengua y palatino). El análisis externo incluyó también la observación de las extremidades anteriores y posteriores (ausencia o exceso de dedos, posición y tamaño de los miembros), región torácica, abdominal y dorsal (presencia de hemorragia, hematoma o defecto del cierre del tubo neural), y finalmente presencia, tamaño y forma de la cola.



Los datos se procesaron con el paquete estadístico SPSS Inc. (del inglés: Statistic package for the social science) Versión 20 para Windows. Para la comparación de los resultados obtenidos en el estudio se realizaron pruebas de normalidad por la prueba de Shapiro Wilk y, acorde a los resultados, se llevaron a cabo pruebas no paramétricas (U de Mann Whitney). La prueba de Chi cuadrado se utilizó para la comparación de proporciones. Las diferencias se consideraron significativas con valores de $P < 0,05$. Los datos aparecen reportados como valores de la media \pm error estándar de la media ($M \pm EEM$).

Resultados y discusión

La DM pre-gestacional es una de las complicaciones más comunes en el embarazo con graves consecuencias para la madre y su producto. En este estudio se utilizó un modelo experimental para determinar el efecto de la hiperglucemia moderada durante el embarazo en la morfología de la descendencia.

Los fetos descendientes de madres diabéticas mostraron una reducción significativa en los indicadores de peso y talla, así como en el peso y el tamaño de la placenta, respecto a los fetos descendientes de madres sanas (Tabla 1).

La descendencia de ratas controles mostró 91,50% de los fetos AEG. Los fetos restantes se distribuyeron equitativamente en PEG y GEG. Por su parte, el grupo diabético presentó un aumento significativo en los fetos PEG, y disminución de los APG (Figura 1).

En el crecimiento de la descendencia de madres diabéticas influyen una variedad de factores prenatales y postnatales entre los que se encuentran el inicio y la severidad de la enfermedad, así como el grado de control y tratamiento para la misma. La expresión clínica más frecuente de la fetopatía diabética es la macrosomía (peso al nacer mayor de 4000 gramos, o bien, recién nacido con peso mayor del percentil 90 para su edad gestacional). La macrosomía se ha relacionado con un mal control metabólico durante la gestación. La importancia del excesivo incremento ponderal fetal está en relación con la mayor frecuencia de complicaciones obstétricas y con un aumento de la incidencia de traumatismos fetales y maternos en el momento del parto ⁸.



Por otra parte, aunque con menos frecuencia, la diabetes materna también puede provocar restricción del crecimiento intrauterino (RCIU), resultando en fetos o recién nacidos inmaduros y/o pequeños para su edad gestacional. Esta condición se define cuando los fetos tienen peso igual o menor al percentil 10 del peso esperado para la edad gestacional ^{15, 16}. Generalmente los recién nacidos con RCIU presentan complicaciones metabólicas al nacer como hipoglucemia, hipoinsulinemia, hipocalcemia, hiperbilirrubinemia, niveles elevados de ácidos grasos libres entre otros, dando cuenta de un mayor efecto de insulina sobre el control de glucemia, pero menor sobre el resto de las acciones de insulina en esa etapa ¹⁷.

La hiperglucemia materna estimula el sobrecrecimiento fetal, mientras que la vasculopatía materna puede estar asociada con la insuficiencia placentaria que conduce a la alteración del transporte de nutrientes y posterior RCIU. En la placenta ocurren varios cambios histopatológicos en respuesta a un ambiente diabético: mala perfusión arterial materna, desarrollo de vellosidades distales y vasculitis fetal ¹⁸.

Al analizar la prevalencia de RCIU en la descendencia de ratas con hiperglucemia moderada durante la gestación, es probable que las diferencias entre los hallazgos clínicos en humanos y los resultados experimentales utilizando ratas, se deben al corto tiempo de gestación en la rata y las diferencias en los porcentajes de tejido adiposo en fetos humanos y de rata, además de la ganancia de peso durante la gestación en la especie humana. Además, es evidente que, en este experimento, el medio hiperglucémico moderado materno provocó una disminución significativa de la eficiencia placentaria del GD respecto a la del GC; confirmando la incapacidad de la placenta en el embarazo diabético como órgano de nutrición y oxigenación del feto en desarrollo.

En la diabetes experimental severa, contrario a lo evidenciado en la moderada, se reporta aumento en el peso de la placenta. Esto se interpreta como un mecanismo compensatorio para maximizar los intercambios materno-fetales y el suministro de nutrientes para el feto en desarrollo. De hecho, en la mayoría de los embarazos humanos, los pesos placentarios también son elevados en los casos de nacimientos de fetos GEG. Estos datos sugieren que el control metabólico en el embarazo temprano es un determinante importante para el crecimiento feto-placentario a lo largo de la gestación ^{19, 20}.



Por otra parte, todos los fetos vivos del experimento presentaron simetría axial armónica. No se registraron anomalías externas en los fetos descendientes de madres controles, excepto edema generalizado en los cuatro fetos muertos del GC. A su vez, tres fetos muertos de madres diabéticas mostraron edema generalizado y un solo feto presentó diversas malformaciones: gastrosquisis, acrania y macroglosia (Figura 2). Resulta importante destacar que este feto malformado es descendiente de la madre diabética que presentó a los siete días de gestación la mayor concentración de glucosa de todo el experimento (16,70 mmol/L). Igualmente, el día 20 de gestación, esta rata presentó el mayor porcentaje de HbA1c (8,00 %) de ambos grupos.

A partir de estudios experimentales y en humanos se conoce que las malformaciones congénitas se inducen en la gestación temprana o etapa embrionaria, y el riesgo de ocurrencia aumenta con el incremento del descontrol metabólico materno en el primer trimestre del embarazo. El riesgo de malformaciones en embarazos diabéticos es de 3 a 5 veces superior que en embarazos no diabéticos ²¹ y estas malformaciones pueden afectar múltiples sistemas de órganos, incluyendo el cerebro y la médula espinal, el corazón y los principales vasos, riñones, intestino y estructuras esqueléticas y dar lugar a mortalidad o discapacidad prenatal o posnatal.

Conclusiones

Las hiperglucemias pregestacionales maternas, a pesar de ser moderadas, provocaron en la descendencia restricción del crecimiento intrauterino comprobado por la reducción de las dimensiones fetales, craneofaciales y placentarias, y una mayor proporción de fetos pequeños para la edad gestacional. Las hiperglucemias moderadas de manera general no generaron malformaciones externas; sólo un feto presentó diversas malformaciones coincidiendo con la madre diabética de peor control metabólico.

El modelo experimental de diabetes moderada durante la gestación reprodujo complicaciones fetales similares a la diabetes pregestacional humana controlada y puede ser útil para identificar los mecanismos implicados en las alteraciones encontradas; así como para probar nuevas estrategias de intervención en la gestación diabética humana.



Bibliografía

1. Aguilar C. Guías ALAD sobre el Diagnóstico, Control y Tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2 con Medicina Basada en Evidencia Edición 2019. Revista de la ALAD. 2019;1-125.
2. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. 9 ed. Brussels-Belgium 2019.
3. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes 2019. Diabetes Care 2019;42(Suppl. 1):S1-S2.
4. Sánchez A. Protocolos Diabetes Mellitus Tipo 2. 1 ed. España: Elsevier; 2010. 247 p.
5. Brajkovich I, Aschner P, Taboada L, Camperos P, Gómez-Pérez R, Aure G, et al. Consenso ALAD. Tratamiento del paciente con diabetes mellitus tipo 2 y obesidad. Revista de la ALAD. 2019;9:1-36.
6. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes 2019. Diabetes Care 2019;42(Suppl. 1):S13-S28.
7. Ornoy A, Reece A, Pavlinkova G, Kappen C, Kermit R. Effect of Maternal Diabetes on the Embryo, Fetus, and Children: Congenital Anomalies, Genetic and Epigenetic Changes and Developmental Outcomes. Birth Defects Research. 2015;105:53-72.
8. Cabero L, González NL. Diabetes y embarazo. Embarazo) GGEddy, editor. Madrid 2016.
9. Kelstrup L, Bytoft B, Hjort L, Houshmand-Oeregaard A, Mathiesen E, Damm P, et al. Diabetes in Pregnancy: Long-Term Complications of Offsprings. En: Lapolla A, Metzger BE, editores. Gestational Diabetes A Decade after the HAPO Study Front Diabetes. ed. New York: Basel, Karger; 2020. p. 201-22.
10. Armengaud J, Simeoni U. Offspring of Mothers with Hyperglycemia in Pregnancy: Short-Term Consequences for Newborns and Infants. En: Lapolla A, Metzger BE, editores. Gestational Diabetes A Decade after the HAPO Study Front Diabetes. ed. New York: Basel, Karger; 2020. p. 194-200.
11. Jawerbaum A, White V. Review on intrauterine programming: Consequences in rodent models of mild diabetes and mild fat overfeeding are not mild. Placenta. 2017;52:21-32.
12. Eriksson UJ, Wentzel P. The status of diabetic embryopathy. Upsala Journal of Medical Sciences. 2016;121 (2):96-112.
13. El-Bassiouni EA, Helmy MH, Rawash N, El-Zoghby SM, El-Nabi M, Rayah A. Embryopathy in experimental diabetic gestation: assessment of oxidative stress and antioxidant defence. Brit J Biomed Sci. 2016;62(2):71-6.
14. Soulimane-Moktari N, Guermouche B, Yessoufou A, Saker M, Moutairou K, Hichami A, et al. Modulation of lipid metabolism by n-3 polyunsaturated fatty acids in gestational diabetic rats and their macrosomic offspring. Clinical Science. 2005;109:287-95.
15. Haroun H. Intrauterine Growth Restriction. Anatomy Physiol Biochem Int J. 2017;1(5):1-5.
16. Heshmat SH. Intrauterine Growth Restriction-A Review Article. Anatomy Physiol Biochem Int J. 2017;1(5):1-5.
17. Parodi K, Jose S. Diabetes y embarazo. Rev Fac Cienc Méd. 2016;1:27-35.
18. Gutaj P, Wender-Ozegowska E. Diagnosis and Management of IUGR in Pregnancy Complicated by Type 1 Diabetes Mellitus. Curr Diab Rep. 2016;16(39):1-9.



**Primer Congreso Virtual de
Ciencias Básicas Biomédicas en Granma.
Manzanillo.**



19. Vajnerova O, Kafka P, Kratzerova T, Chalupsky K, Hampl V. Pregestational diabetes increases fetoplacental vascular resistance in rats. *Placenta*. 2018;63:32-8.
20. Kafka P, Hampl OV. Chronic hypoxia increases fetoplacental vascular resistance in rat placenta perfused with blood. *Bratisl Med J*. 2016;117(10):583-6.
21. Wentzel P, Eriksson U. Embryopathy and Diabetes. En: Lapolla A, Metzger BE, editores. *Gestational Diabetes A Decade after the HAPO Study Front Diabetes*. ed. New York: Basel, Karger; 2020. p. 132-44.



Anexos

Tabla 1. Características morfométricas de la descendencia en los grupos estudiados.

Mediciones fetales y placentarias	GD	GC
Dimensiones corporales		
Peso (g)	3,29 ± 0,043*	3,64 ± 0,031
Longitud cráneo-caudal (cm)	3,50 ± 0,019*	3,67 ± 0,014
Longitud de la cola (cm)	1,24 ± 0,011*	1,29 ± 0,010
Dimensiones craneofaciales		
Diámetro anteroposterior (cm)	1,44 ± 0,011*	1,49 ± 0,008
Diámetro biparietal (cm)	0,84 ± 0,009*	0,89 ± 0,007
Diámetro entre los glóbulos oculares (cm)	0,54 ± 0,009	0,56 ± 0,007
Diámetro entre poro nasal y pabellón auricular derecho (cm)	1,34 ± 0,010*	1,38 ± 0,008
Diámetro entre poro nasal y pabellón auricular izquierdo (cm)	1,34 ± 0,010*	1,38 ± 0,008
Dimensiones placentarias		
Diámetro mayor (cm)	1,36 ± 0,013	1,37 ± 0,010
Diámetro menor (cm)	1,16 ± 0,010*	1,20 ± 0,008
Grosor (cm)	0,40 ± 0,009	0,41 ± 0,007
Peso (g)	0,45 ± 0,009*	0,47 ± 0,008
Eficiencia placentaria	7,55 ± 0,140*	7,94 ± 0,126

Los valores están representados como la Media ± EEM. Prueba U de Mann-Whitney (*p<0.05).



Anexos

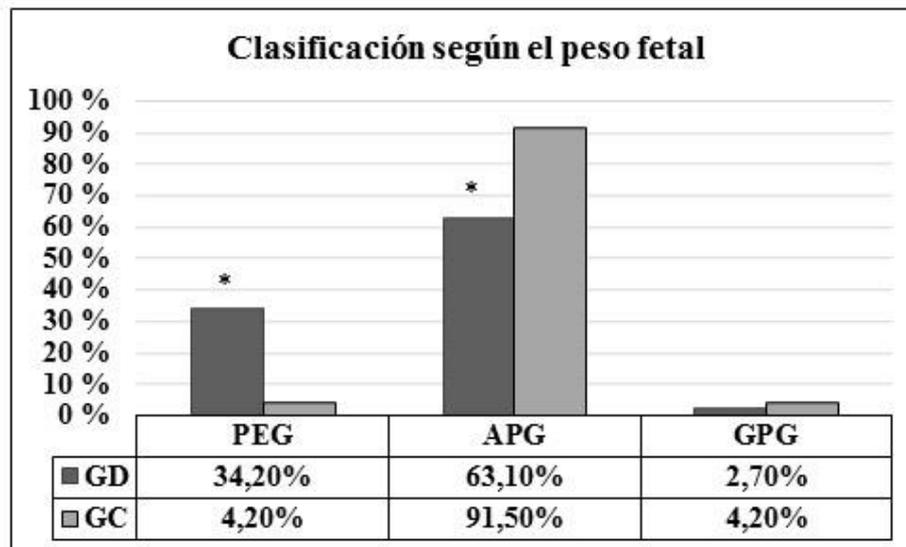


Figura 1. Clasificación de la descendencia según el peso fetal en los grupos estudiados. La clasificación consistió en pequeño para la edad gestacional (PEG) cuando el peso fue menor que el percentil 5; apropiado para la edad gestacional (AEG) cuando el peso estaba incluido en los percentiles 5 y 95; y grande para la edad gestacional (GEG) cuando el peso fue superior al percentil 95.

Prueba de Chi cuadrado para la comparación de proporciones. Estadístico exacto de Fisher (* $p < 0.05$).



Figura 2. Aspecto externo de feto malformado descendiente de madre diabética. A: Acrania, M: Macroglosia; G: Gastrosquisis. Foto tomada con cámara digital Cannon.