infomed
CENCOMED Centro Virtual de Convenciones de Salud
XVIII Congreso de la Sociedad Cubana de Obstetricia y Ginecología | 8-12/mayo/2023
ENTRAR NOTICIAS

Embriopatía diabética y trastornos reproductivos en ratas Wistar

Dr. C. Leticia Bequer [1]
Dra. Elizabeth Fuentes [2]
MSc. Cindy Freyre [3]
MSc. José L. Molina [4]
Dr. C. Tahiry Gómez [5]

[1] Unidad de Investigaciones Biomédicas. Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, Santa Clara, Cuba, leticiacbm@infomed.sld.cu, http://orcid.org/0000-0002-5712-6718

[2] Facultad de Medicina. Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, Santa Clara, Cuba, elizabethfg@infomed.sld.cu, https://orcid.org/0000-0001-6567-3255

[3] Unidad de Investigaciones Biomédicas. Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, Santa Clara, Cuba, cindyfg1994@gmail.com, http://orcid.org/0000-0001-9680-6428

[4] Unidad de Investigaciones Biomédicas. Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, Santa Clara, Cuba, joselmm@infomed.sld.cu, https://orcid.org/0000-0003-4215-5046

[5] Unidad de Investigaciones Biomédicas. Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, Santa Clara, Cuba, tahirygh@infomed.sld.cu, https://orcid.org/0000-0002-3465-5959

Introducción: La diabetes mellitus es uno de los trastornos más frecuentes del embarazo con consecuencias adversas para la madre y elevado riesgo de embriopatía diabética en la descendencia.

Objetivos: El objetivo de la investigación fue determinar el efecto de la diabetes pregestacional con hiperglucemias moderadas sobre el rendimiento reproductivo materno, crecimiento, desarrollo y morfología embrionaria en ratas Wistar.

Métodos: Se utilizó un modelo de diabetes moderada inducida neonatalmente en crías hembras de ratas Wistar de dos días de nacidas, mediante la administración subcutánea de 100 mg/kg de peso corporal de estreptozotocina en una única dosis. A los 120 días de nacidas, las

ratas de ambos grupos de experimentación (diabético y control) se aparearon con machos sanos. Se determinaron peso y glucemia durante la gestación y a los 11,5 días se realizó la cesárea. Se analizaron las variables del rendimiento reproductivo materno y, de crecimiento, desarrollo y morfología externa en los embriones. Acorde a los resultados se utilizaron pruebas no paramétricas para el análisis de las variables cuantitativas y la prueba Chi-cuadrado para las variables cualitativas.

Resultados: La hiperglucemia moderada pregestacional provocó modificaciones en la ganancia de peso materna, el número de reabsorciones, sitios de implantación, pérdidas preimplantación y eficiencia de implantación, así como en la morfología, talla y número de somitas en los embriones.

Conclusiones: La diabetes moderada pregestacional alteró el rendimiento reproductivo materno y el crecimiento y desarrollo intrauterino de la descendencia en etapa embrionaria. La embriopatía diabética se manifestó además por malformaciones del sistema nervioso central.

Palabras claves: diabetes mellitus experimental; ratas; estreptozotocina; hiperglucemia; embrión.

I. INTRODUCCIÓN

La epidemia de Diabetes mellitus representa un gran problema para la salud pública a escala mundial a pesar de los innumerables esfuerzos realizados desde la investigación básica, clínica y social. La Federación Internacional de Diabetes estima que 463 millones de adultos viven actualmente con diabetes y que, de ellos, más de la mitad son mujeres.[1] En el 2020 se reportaron, a nivel global y en Cuba, cifras alarmantes de nacidos vivos afectados por hiperglucemia en el embarazo, ya sean gestacionales o pregestacionales.[1,2] Es de particular preocupación la disminución de la edad de inicio de la diabetes tipo 2 que afecta directamente las mujeres en edad fértil y, por tanto, futuras mujeres embarazadas.[3]

La diabetes materna tiene importantes efectos adversos sobre la embriogénesis y el desarrollo fetal, causa múltiples anomalías congénitas y complicaciones médicas secundarias denominadas colectivamente embriopatía diabética.[4] Pese a los avances en los tratamientos clínicos en las mujeres diabéticas embarazadas, el riesgo de malformaciones congénitas sigue siendo 3-5 veces mayor que en el embarazo no diabético. Las malformaciones ocurren en las primeras 10 semanas durante la organogénesis temprana por lo que puede afectarse cualquier sistema de

órganos. Generalmente se producen anomalías tales como defectos de cierre del tubo neural, médula espinal, síndrome de regresión caudal, defectos cardiacos y vasculares mayores, displasia esquelética y anomalías en los riñones y en el intestino.[5-7]

Se considera que el efecto teratogénico de la diabetes se debe a la exposición del embrión o feto a hiperglucemias, ya sean transitorias o permanentes, moderadas o severas. Las consecuencias del exceso de glucosa se asocian con alteraciones en varias vías de desarrollo en la descendencia, que conducen a condiciones intracelulares negativas como el estrés oxidativo, el estrés nitrosativo, estrés del retículo endoplasmático y estrés de hexosamina. Además, la apoptosis embrionaria acelerada y la autofagia reducida se han sugerido como componentes de la embriopatía diabética.[4,5,7]

En las últimas décadas, muchos investigadores han estudiado la gestación diabética a través de modelos experimentales, pues permiten comprender mecanismos fisiopatológicos y evaluar estrategias diagnósticas y terapéuticas que limiten el desarrollo de las complicaciones materno-feto-placentarias.[8,9] El modelo de inducción neonatal con estreptozotocina (STZ) en ratas Wistar que provoca hiperglucemias moderadas en la adultez ha sido empleado para estudios de diabetes pregestacional y de la descendencia en etapa fetal.[10-12] No obstante, resultan escasas las investigaciones en etapa embrionaria para identificar las alteraciones en este periodo del desarrollo ocasionadas por niveles moderados de hiperglucemias. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de las hiperglucemias moderadas sobre el rendimiento reproductivo materno, crecimiento, desarrollo y morfología embrionaria en ratas Wistar.

II. MÉTODO

A. Animales de experimentación y aspectos éticos.

En la Unidad de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara se realizó una investigación longitudinal, prospectiva, con diseño experimental en un modelo experimental de diabetes moderada por inducción química neonatal con STZ en ratas Wistar adquiridas en el Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), La Habana, Cuba. Los animales se manipularon según recomienda la guía del Instituto Nacional de Salud (National Institutes of Health) para el trabajo con animales de experimentación[13] y el Decreto-Ley No. 31 de Bienestar Animal de la República de Cuba.[14] Se utilizó la menor cantidad de animales posibles y se minimizó su sufrimiento.

Tanto los padres como sus crías se mantuvieron en condiciones estrictamente controladas de temperatura (19-25 °C), humedad relativa (45-65 %) y luz (ciclos 12 h luz/oscuridad). Durante todo el experimento los animales se abastecieron con agua corriente y se alimentaron con dieta concentrada convencional todo propósito. Los animales de experimentación permanecieron con sus madres por 21 días hasta el destete y posteriormente se colocaron en número de cinco por caja. La investigación responde a un proyecto aprobado por el Comité de Ética de la institución.

B. Inducción de la diabetes

En el experimento se utilizaron 20 ratas hembras que se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos experimentales de 10 animales cada uno: grupo diabético (GD) y grupo control (GC). La diabetes se indujo en las crías hembras de dos días de nacidas mediante la administración subcutánea de 100 mg/kg p.c. de STZ (Aplichem) en una única dosis. La STZ se disolvió en tampón citrato 0,1 M (pH 4,5) helado para mantener su estabilidad y se inyectó inmediatamente de preparada la solución para evitar la degradación. Al grupo control se le administró el vehículo tampón citrato en similares condiciones.

C. Período de apareamiento y gestación

A los 120 días de nacidos, ambos grupos de experimentación se aparearon con machos sanos aproximadamente durante tres ciclos estrales (15 días) en proporción de tres ratas hembras por macho. El día cero de la gestación se consideró cuando en el frotis del contenido vaginal, realizado entre las 7-8 h de la mañana, se detectaron espermatozoides. Una vez diagnosticada la preñez todas las ratas se mantuvieron en cajas individuales. Las ratas no preñadas durante este período se consideraron infértiles y se excluyeron del experimento.

En la mañana de los días 0 y 11,5 de gestación, luego de 12 h de ayuno, se midió el peso corporal y se cuantificaron los niveles de glucosa en sangre, a partir de una gota de sangre tomada de la punta de la cola del animal, mediante el método de glucosa oxidasa utilizando Glucómetro y Biosensores SUMA.

D. Eutanasia, colección y procesamiento de muestras

El día 11,5 de gestación se practicó la cesárea bajo anestesia con 50-60 mg/kg de Tiopental sódico (Farmahealth, India). Se extrajeron los ovarios y cuernos uterinos, se colocaron en una

placa con solución salina fisiológica, se eliminó el exceso de grasa y tejido periuterino. El proceso de eutanasia se realizó por exsanguinación a través de una punción intracardiaca.

Ambos ovarios se separaron de los cuernos uterinos y se analizaron con microscopio estereoscópico BMS (Estados Unidos) para contar los cuerpos lúteos gravídicos de los ovarios derecho e izquierdo de forma independiente. Cada cuerpo lúteo (indicador del número de óvulos fecundados) se identificó como una hinchazón discreta, redonda, ligeramente rosada en la superficie del ovario. Inmediatamente los cuernos uterinos se pesaron en Balanza digital YAMATO y se abrieron a lo largo de la curvatura mayor. Los sitios de implantación se numeraron consecutivamente desde el extremo ovárico derecho hacia el cuello uterino y desde este hasta el extremo ovárico izquierdo. Cada sitio de implantación se describió y clasificó de acuerdo a modificaciones realizadas a los criterios establecidos por York y colaboradores[15] como un saco gestacional que contenía un embrión o una reabsorción temprana.

Los embriones fueron extraídos cuidadosamente del saco gestacional y observados al microscopio. Se determinó la longitud cráneo-caudal (talla), el número de somitas, y se identificaron las posibles alteraciones de la morfología. Se tomaron microfotografías de cada embrión con cámara digital Cannon Power Shot G11. Los embriones se clasificaron acorde a los percentiles de la talla y número de somitas determinados en el grupo control según modificación de la clasificación realizada por Soulimane y colaboradores[16] para el peso fetal. La clasificación consistió en talla o número de somitas adecuado para la edad gestacional, talla o número de somitas inferior al percentil 5 y, talla o número de somitas superior al percentil 95.

A partir de los registros obtenidos del estudio del peso materno, los ovarios y cuernos uterinos se determinaron los indicadores del rendimiento reproductivo materno. Se calculó la ganancia de peso durante la gestación a través de la diferencia entre el peso de la rata gestada el día 11,5 y el peso del día 0. Se calcularon los porcentajes de eficiencia de implantación a través de la relación entre el número de sitios de implantación y el número de cuerpos lúteos; de pérdidas preimplantación a través de la relación entre la diferencia entre el número de cuerpos lúteos y el número de sitios de implantación entre el número de cuerpos lúteos; y el porcentaje de reabsorciones a través de la relación entre el número de reabsorciones y numero de sitios de implantación.[17]

E. Análisis estadístico

El procesamiento estadístico de los datos obtenidos se realizó con el paquete estadístico computacional SPSS Inc. versión 20 para Windows. En todos los casos se verificaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza. Acorde a los resultados se realizaron pruebas no paramétricas (U de Mann Whitney) para las comparaciones cuantitativas, en cuyo caso las hipótesis se basan en rangos, mediana y frecuencia de datos. Los resultados se presentaron en tablas y gráficos como la media ± error estándar de la media. La prueba de Chi-cuadrado se utilizó para la comparación de proporciones y los datos se presentaron en valores absolutos y porcientos. Se empleó el Coeficiente de correlación de Spearman para establecer correlaciones entre variables de interés. En todas las pruebas las diferencias se consideran significativas con valores de $p<0,05$.

III. RESULTADOS

Los indicadores del rendimiento reproductivo materno en los grupos estudiados se muestran en el cuadro 1. A pesar que no se comprobó significación estadística en la mayoría de las variables, sí se evidenció significación biológica en relación a la disminución de la ganancia de peso durante la gestación, así como del peso del útero en las ratas diabéticas respecto a las ratas controles. No se detectaron diferencias en los cuerpos lúteos. Por otra parte, el análisis desde el punto de vista biológico de los procesos de implantación demostró que la diabetes moderada afectó la implantación exitosa del ovocito fecundado en el endometrio, y provocó un aumento de las reabsorciones. Las hiperglucemias moderadas disminuyeron la eficiencia de implantación e incrementaron las pérdidas preimplantación en el grupo diabético respecto al grupo control, ambos indicadores con significación estadística.

Cuadro 1. Rendimiento reproductivo materno en los grupos diabético y control.

Indicadores de rendimiento reproductivo	Grupo diabético	Grupo control
Ganancia de peso durante la gestación	7,77 ± 4,291	8,31 ± 3,923
Peso cuernos uterinos (g)	1,98 ± 0,210	2,54 ± 0,226
Cuerpos lúteos	13,70 ± 0,716	13,33 ± 0,707
Sitios de implantación	9,50 ± 1,004	11,11 ± 1,006
Porcentaje de reabsorciones (%)	12,66 ± 5,727	7,16 ± 1,937
Pérdidas preimplantación (%)	32,94 ± 7,865 *	17,01 ± 5,268
Eficiencia de implantación (%)	67,02 ± 7,865 *	82,98 ± 5,268

Los valores están representados como Media ± EEM. Prueba U de Mann-Whitney (*p<0,05).

En el cuadro 2 se presentan los indicadores de crecimiento y desarrollo embrionario. Los embriones descendientes de las ratas con hiperglucemias moderadas mostraron una disminución significativa de la talla respecto a los embriones descendientes de ratas sanas. En el número de somitas no se detectaron diferencias entre los grupos de estudio. Ambos indicadores mostraron una correlación positiva y altamente significativa (Coeficiente de correlación de Spearman (Rho)=0,350; p=0,000).

Cuadro 2. Indicadores de crecimiento y desarrollo embrionario en los grupos diabético y control.

Indicadores de crecimiento y desarrollo	Grupo diabético	Grupo control
Talla (mm)	3,46 ± 0,080 *	3,70 ± 0,085
Número de somitas	21,04 ± 0,221	21,11 ± 0,247

Los valores están representados como Media ± EEM. Prueba U de Mann-Whitney (*p<0,05).

La clasificación de los embriones según la talla y el número de somitas en los grupos estudiados se muestra en la figura 1. En la descendencia de ratas diabéticas se observó casi el doble de embriones clasificados con talla inferior al percentil 5 y un porcentaje menor de embriones clasificados con talla adecuada o superior al percentil 95 respecto al grupo control (figura 1A). En relación a la clasificación según el número de somitas, se detectó más del 50 % de embriones del grupo diabético con un número de somitas inferior al percentil 5 respecto al grupo control. Ningún embrión descendiente de ratas diabéticas presentó número de somitas superior al percentil 95 (figura 1B).

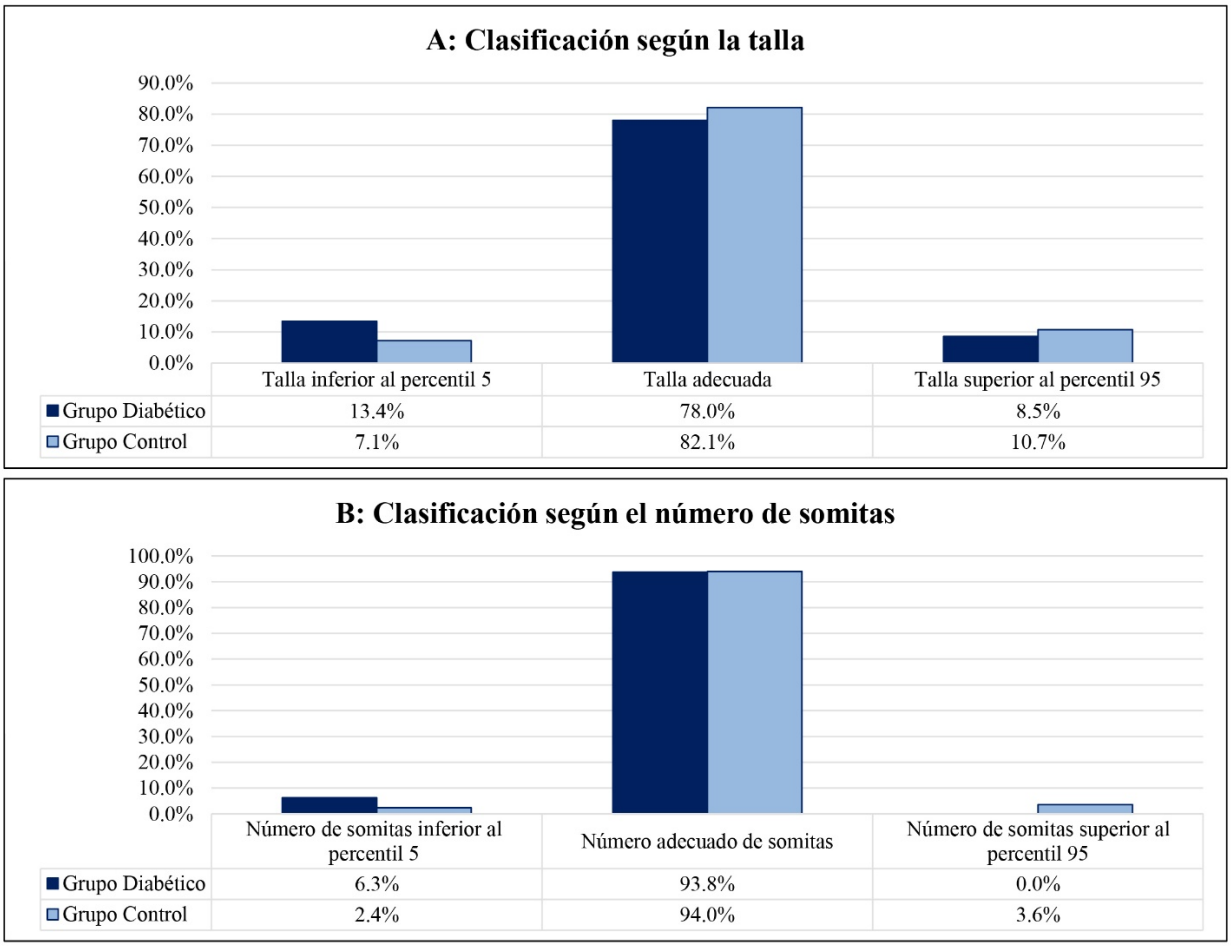

Figura 1. Clasificación de los embriones según la talla (A) y el número de somitas (B) en los grupos diabético y control. Prueba de Chi cuadrado para la comparación de proporciones. Estadístico exacto de Fisher (p>0,05).

En el estudio de la morfología embrionaria correspondiente con la edad gestacional de 11,5 días se encontraron alteraciones morfológicas a nivel del sistema nervioso central en tres embriones descendientes de las ratas del grupo diabético. En el cuadro 3 se muestra el número de embriones malformados según el tipo de malformación, región y sistema afectado. En el grupo control no se detectaron embriones con alteraciones morfológicas externas. En un embrión se observaron dos malformaciones: defecto de cierre del tubo neural en la región caudal y ausencia de la morfología esperada para este tiempo en las vesículas cerebrales. En otros dos embriones también se detectaron alteraciones en la morfología normal a nivel de la curvatura del mesencéfalo.

Cuadro 3. Número de embriones malformados en ratas diabéticas según el tipo de malformación, región y sistema afectado.

Tipo de malformación	Embriones afectados	Región / sistema afectados
Defecto de cierre de tubo neural caudal	1	Caudal / Sistema nervioso
Alteraciones en vesículas cerebrales	1	Cefálica / Sistema nervioso
Alteraciones en curvatura mesencefálica	2	Cefálica / Sistema nervioso

IV. **CONCLUSIONES**

La diabetes moderada pregestacional alteró el rendimiento reproductivo materno y el crecimiento y desarrollo intrauterino de la descendencia en etapa embrionaria. La embriopatía diabética se manifestó además por malformaciones del sistema nervioso central.

REFERENCIAS

1. Federación Internacional de Diabetes. Atlas de la Diabetes de la FID. 9na ed. Bruselas: Federación Internacional de Diabetes; 2019 144 p.
2. Anuario Estadístico de Salud 2020. La Habana: Ministerio de salud Pública. Dirección de Registros Médicos y Estadísticas de Salud; 2021. 193 p.
3. Armengaud J, Simeoni U. Offspring of mothers with hyperglycemia in pregnancy: Short-term consequences for newborns and infants. En: Lapolla A, Metzger B, editores. Gestational Diabetes A Decade after the HAPO Study. New York: Basel, Karger; 2020. p. 194–200.
4. Bhandari J, Thada P, Khattar D. Diabetic Embryopathy. En: editores. StatPearls [Internet]. Treasure Island: StatPearls Publishing; 2021. p. 1-15.
5. Wentzel P, Eriksson U. Embryopathy and diabetes. En: A. Lapolla, Metzger B, editores. Gestational diabetes A decade after the HAPO study. New York: Basel, Karger; 2020. p. 132-44.
6. 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 B, editores. Gestational diabetes A decade after the HAPO study. New York: Basel, Karger; 2020. p. 201-22.
7. Piazza F, Segabinazi E, Ferreira A, Mega F, Dezoti C, Augustin O, et al. Severe uncontrolled maternal hyperglycemia induces microsomia and neurodevelopment delay accompanied by apoptosis, cellular survival, and neuroinflmmatory deregulation in rat offpring hippocampus. Cell Mol Neurobiol. 2019;39(3):401-14. doi:10.1007/s10571-019-00658-8
8. Maqbool M, Dar M, Gani I, Mir S. Animal models in diabetes mellitus: An overview. J Drug Deliv Ther. 2019;9(1-s):472-75. doi:10.22270/jddt.v9i1-s.2351

9. Bueno A, Sinzato Y, Volpato G, Gallego F, Perecin F, Rodrigues T, et al. Severity of prepregnancy diabetes on the fetal malformations and viability associated with early embryos in rats. Biol Reprod. 2020;103(5):938-50. doi:10.1093/biolre/ioaa151
10. Bequer L, Gómez T, Molina J, Álvarez A, Chaviano C, Clapés S. Experimental diabetes impairs maternal reproductive performance in pregnant Wistar rats and their offspring. Syst Biol Reprod Med. 2018;64(1):60-70. doi:10.1080/19396368.2017.1395928
11. Gómez T, García M, Bequer L, Freire C, Vila M, Clapés S. Malformaciones esqueléticas y alteraciones del crecimiento en fetos de ratas con diabetes moderada. 107705/biomedica5736. 2021;41(3):1-7. doi:10.7705/biomedica.5736
12. Castellón D, Garcia M, Bequer L, Freire C, Molina J, Bermudez A, et al. Efecto sobre el peso fetal de la suplementación con zinc a ratas diabeticas gestadas. Medicentro Elecrónica. 2021;(En prensa)
13. Aguilera B, Lecaros J, Valdés E. Ética animal: fundamentos empíricos, teóricos y dimensión práctica. Madrid: Universidad Pontificia Comillas; 2019. 393 p.
14. Decreto-Ley No. 31 de Bienestar Animal. Publicado en la Gaceta Oficial de la República de Cuba. (10 de abril de 2021). p. 37.
15. York R, Parker R, Haber L. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. En: Hayes W, Kruger CL, editores. Hayes' Principles and methods of toxicology. 6 ed. Boca Raton: Taylor & Francis; 2014. p. 1637-722.
16. 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. Clin Sci. 2005;109(3):287–95. doi:10.1042/CS20050028

Conflictos de intereses: los autores declaran que no existen conflictos de intereses en relación con la investigación presentada.

Contribución de los autores:

Leticia Bequer: Diseñó el experimento, realizó procesamiento estadístico y participó en la redacción del informe final

Elizabeth Fuentes: Participó en el desarrollo del experimento y realizó las mediciones a los embriones

Cindy Freyre: Participó en el desarrollo del experimento y realizó las mediciones a los embriones

José L. Molina: Participó en el desarrollo del experimento

Tahiry Gómez: Realizó procesamiento estadístico y participó en la redacción del informe final