

Insulinoterapia na Prenhez de Ratas Diabéticas: Repercussões Fetais e Placentárias

Effect of Insulin Therapy in on Pregnancy of Diabetic Rats: Fetal and Placental Repercussions

Marilza V.C.Rudge, Iracema M.P.Calderon, Izildinha Maestá,
Maria D. Ramos, José C. Peraçoli, Paulo Curi

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar as repercussões feto-placentárias da insulinoterapia na prenhez de ratas diabéticas. A droga diabetogênica foi aloxana na dose de 42 mg/kg de peso por via intravenosa. Formaram-se cinco grupos experimentais: controle (G1, n=12); diabetes moderado não-tratado (G2, n=10); diabetes moderado tratado com insulina (G3, n=11); diabetes grave não-tratado (G4, n=12) e diabetes grave tratado com insulina (G5, n=10). Foram obtidos 634 recém-nascidos e respectivas placentas. O resultado perinatal do tratamento com insulina teve relação direta com a qualidade do controle glicêmico. O tratamento inadequado do diabetes moderado determinou níveis de hiperglicemia moderada nos recém-nascidos, não interferiu com o peso corporal dos filhotes e diminuiu a proporção de recém-nascidos grandes para a idade da prenhez (GIP). O controle adequado do diabetes grave normalizou a glicemia dos recém-nascidos, aumentou o peso dos filhotes e diminuiu a proporção de recém-nascidos pequenos para a idade da prenhez (PIP). A administração de doses adequadas de insulina no grupo de ratas diabéticas grave diminuiu o peso das placentas mas sem modificar o índice placentário.

PALAVRAS-CHAVE: *Complicações da gravidez. Diabetes. Diabetes experimental. Placenta. Feto. Crescimento e desenvolvimento.*

Introdução

O uso da insulina, no tratamento de gestantes diabéticas, diminuiu a mortalidade perinatal de cerca de 15 a 20%, em 1960, para menos de 3% nos dias atuais. O fator crítico contributivo foi o controle glicêmico estrito^{12,16}.

Modelos experimentais em ratas diabéticas confirmam a eficiência da insulinoterapia em promover melhores resultados perinatais, desde a embriogênese até o desenvolvimento fetal. A hiperglicemia acentuada em ratas, tem relação

inversa com o peso e a atividade pancreática fetal⁴ e o tratamento com insulina impede o aparecimento das lesões hemodinâmicas útero-placentárias.⁶

O controle da qualidade do tratamento em animais é feito através de determinações frequentes da glicemia^{2,10,17}. As dificuldades das colheitas repetidas são contornadas usando glicemias em dias alternados em animais selecionados¹³. Para o controle glicêmico recomenda-se, também, o de glicosúria, cetonúria e ganho de peso⁹. Há ainda, os que utilizam uma única dosagem de glicose na prenhez para confirmar a qualidade do controle, mas são contestados pelo fato de que a normoglicemia, obtida no termo, pode não significar controle adequado durante a prenhez¹¹.

A correção da hiperglicemia com insulinoterapia promove não só o ganho de peso fetal, como também normaliza a liberação de insulina *in vitro* pelas ilhotas dos pâncreas dos

Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP
Correspondência:
Marilza Vieira Cunha Rudge
Rua General Telles, 1396 - ap. 81
CEP 18602-120 - Botucatu

fetos¹¹. Robinson et al.¹⁵, tratando ratas prenhes diabéticas com insulina conseguiu a normalização da glicemia materna, porém o resultado foi parcial na prevenção do aumento placentário. Eriksson et al.⁸ observaram elevada incidência de nódulos de reabsorção e malformação em ratas diabéticas quando a insulinoterapia foi suspensa do 1º ao 12º dia (primeira metade) da prenhez. Em especial, a teratogênese foi mais evidenciada nos grupos de ratas não-tratadas entre o 6º e 10º dias, correspondentes ao período entre 2ª e 4ª semanas pós-concepção em gestações humanas. O tratamento com insulina tem papel preventivo nas malformações e nas alterações do desenvolvimento fetal¹⁷.

O presente trabalho tem como objetivo estudar a repercussão da insulinoterapia sobre o recém-nascido e a placenta de ratas diabéticas. Em especial, verificar a influência do controle glicêmico materno sobre a glicemia e o peso corporal dos filhotes e nas alterações placentárias.

Material e métodos

Foram estudadas 55 ratas virgens da linhagem Wistar, fêmeas, em idade reprodutiva de três meses, pesando entre 180 e 250 g. Os animais foram sorteados para compor os grupos controle e diabéticos e entre os diabéticos os que seriam ou não tratados com insulina.

Para a constituição dos grupos experimentais considerou-se o valor da glicemia no primeiro dia da prenhez e a introdução ou não da insulinoterapia. Formaram-se cinco grupos experimentais: G1 - Grupo controle (12 ratas); G2 - Grupo diabético moderado, sem insulinoterapia (10 ratas); G3 - Grupo diabético moderado, com insulinoterapia (11 ratas); G4 - Grupo diabético grave, sem insulinoterapia (12 ratas) e G5 - grupo diabético grave, com insulinoterapia (10 ratas).

A seqüência experimental de 58 dias foi dividida em quatro períodos: adaptação, diabetogênico, acasalamento e prenhez³ e a droga utilizada para a indução do diabetes foi a aloxana, na dose de 42 mg/kg de peso, por via intravenosa, em dose única. Os animais sorteados para compor o grupo controle receberam solução fisiológica a 0,9% em volume igual ao de rata de mesmo peso tratada com aloxana. Após 15 dias do período diabetogênico as ratas foram colocadas para acasalamento. A presença de espermatozóide na vagina confirmou o dia zero da prenhez. A glicemia do primeiro dia da prenhez foi usada para

classificar o diabetes em de intensidade moderada ou grave. Considerou-se diabetes moderado quando o valor da glicemia ficou entre 120 e 199 mg/dl e o diabetes grave foi caracterizado por glicemia igual ou superior a 200 mg/dl³. As glicemias maternas foram determinadas, por fitas reagentes, no 1º, 7º, 14º e 21º dias de prenhez. A média glicêmica materna foi calculada com todos os valores glicêmicos obtidos durante a prenhez.

Na manhã do 21º dia as ratas de todos os grupos foram submetidas à cesárea sob anestesia inalatória com éter, sendo retirados os recém-nascidos e respectivas placentas. Os recém-nascidos foram separados das placentas, pesados e classificados, em peso pequeno (PIP), adequado (AIP) e grande (GIP) para a idade de prenhez, em relação à média mais ou menos um desvio-padrão do grupo controle³.

Após a pesagem, os recém-nascidos foram decapitados, o sangue colhido e reunido em *pool* para a determinação da glicemia da ninhada por método enzimático. A mãe foi sacrificada por esgotamento da volemia. As placentas foram identificadas e pesadas individualmente. O índice placentário foi determinado pela relação entre o peso da placenta e o peso fetal.

O esquema de insulinoterapia na prenhez dos grupos diabéticos, foi realizado utilizando-se insulina NPH₁₀₀, de origem suína, aplicada em dose única diária, às 16 horas, por via subcutânea no abdome das ratas. A curva de ganho de peso materno foi o parâmetro utilizado para o ajuste da dose: no aumento de peso, a dose de insulina foi mantida e a perda de peso determinou o aumento da dose de insulina³.

O resultado terapêutico do controle glicêmico na prenhez (grupos G3 e G5) foi classificado em excelente, adequado e inadequado de acordo com a média glicêmica da prenhez. O controle foi considerado excelente quando a média glicêmica teve valores iguais aos do grupo controle (G1). Foi adequado nos grupos diabéticos tratados, quando a média glicêmica foi inferior à média menos um desvio padrão do seu respectivo grupo não tratado e foi inadequado quando os grupos diabéticos, G3 e G5, mantiveram as médias glicêmicas durante a prenhez iguais aos seus respectivos grupos não-tratados, G2 e G4.

O método estatístico utilizado para as variáveis dos filhotes e das placentas foi a análise de variância¹⁸. A análise foi complementada com o teste de Tukey para contrastes entre pares de médias (com $\chi = 0,05$). O teste F calculado foi

considerado significativo quando $p < 0,05$.

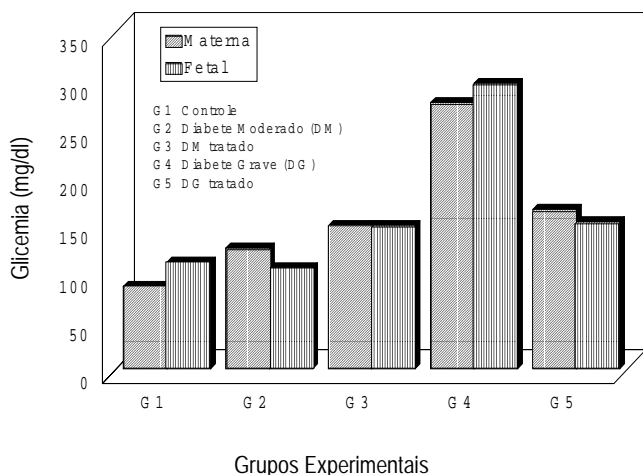
Para a classificação do peso dos filhotes em GIP, AIP ou PIP em cada um dos grupos foi utilizado o teste do qui quadrado (χ^2).

Resultados

Das 55 ratas do experimento obtiveram-se 634 recém-nascidos e suas respectivas placentas.

A insulinoterapia usada para tratar ratas prenhes com diabetes moderado (G3) não controlou a glicemia materna e por conseguinte não controlou a glicemia do *pool* (Figura 1), os pesos do feto e da placenta e não influenciou o índice placentário (Tabela 1). A análise da classificação do peso dos recém-nascidos mostrou diminuição dos recém-nascidos GIP e aumento dos recém-nascidos PIP numa tendência de aproximação da distribuição observada no grupo controle (Figura 2).

O tratamento das ratas prenhes com diabetes



Teste F: 13,95 $p < 0,001$ $G4 > (G3 = G5) > G2 > G1$ (Glicemia materna)

Teste F: 20,48 $p < 0,001$ $G4 >$ demais (glicemia *pool* recém-nascidos)

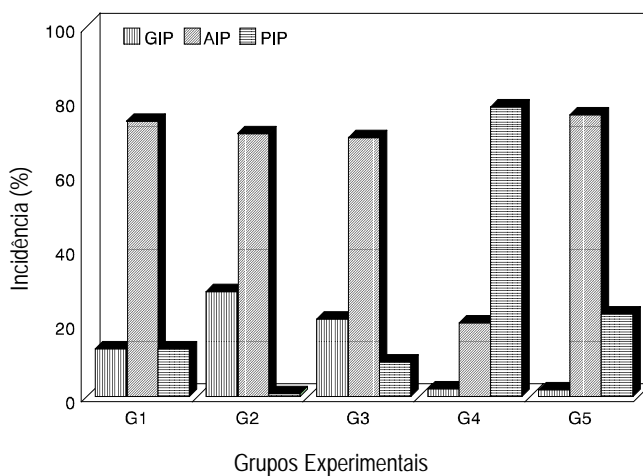
Figura 1 - Glicemia materna no 21º dia da prenhez e *pool* dos filhotes segundo os grupos experimentais.

grave com insulina (G5) diminuiu a glicemia materna do 21º dia da prenhez, a glicemia do *pool* dos filhotes (Figura 1), e a média glicêmica materna da prenhez (Tabela 1), aumentou o peso fetal mas não influenciou o peso e índice placentário (Tabela 1). No grupo G5 houve acentuada diminuição dos recém-nascidos pequenos para idade de prenhez (PIP) com aumento dos de peso adequado (AIP) - (Figura 2).

A excelência no tratamento com insulina não

Tabela 1 - Média (m) e desvio padrão (s) dos pesos dos filhotes, placentas, e do índice placentário (IP) nos cinco grupos experimentais

Grupos Experimentais	Nº recém-nascidos	Peso (g) recém-nascido	Peso Placentário	IP (peso placentário/feto)	Média glicêmica da prenhez (mg/dl)
G1	132	4,83 ± 0,5	0,439 ± 0,10	0,09 ± 0,03	82,3 ± 7,4
G2	120	5,17 ± 0,3	0,468 ± 0,07	0,09 ± 0,01	132,1 ± 23,6
G3	129	4,90 ± 0,4	0,479 ± 0,07	0,10 ± 0,20	147,0 ± 36,5
G4	141	4,00 ± 0,6	0,541 ± 0,11	0,14 ± 0,04	280,4 ± 64,0
G5	112	4,60 ± 0,3	0,485 ± 0,07	0,11 ± 0,02	201,5 ± 42,3
Teste F		11,03 $p < 0,001$	1,97 $p > 0,10$	0,58 $p > 0,50$	41,92 $p < 0,001$



$\chi^2 = 291,712$; $p < 0,001$ Coef. Pearson: $c = 0,57$

Comentários: $G4 = G5 < G1 < G3 < G2$ para recém-nascidos GIP

$G1 = G2 = G3 = G5 > G4$ para recém-nascidos AIP

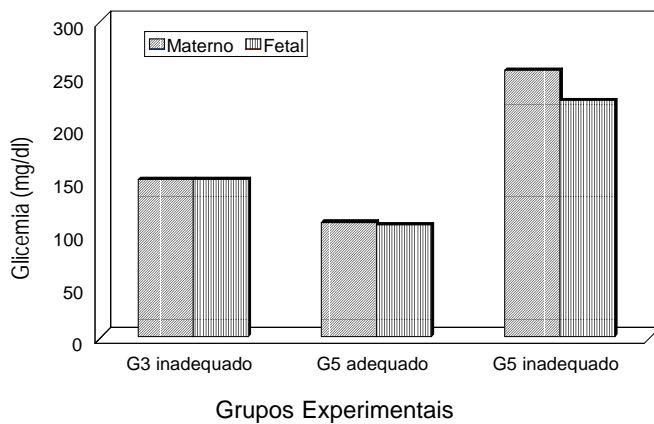
$G4 > (G1 = G3 = G5) > G2$ para recém-nascidos PIP

Figura 2 - Incidência (%) de recém-nascidos de peso grande (GIP), adequado (AIP) e pequeno (PIP) para a idade de prenhez nos grupos experimentais.

foi conseguida em nenhuma rata; a adequação ocorreu em apenas 60% das ratas diabéticas graves e a inadequação em todas as ratas com diabetes moderado e em 40% das ratas com diabetes grave. Apesar desses resultados, a qualidade do controle glicêmico materno influenciou os resultados perinatais.

O adequado controle glicêmico no diabetes grave diminuiu significativamente a glicemia materna e normalizou a glicemia dos recém-nascidos (Figura 3). Em decorrência, aumentou o peso dos recém-nascidos que alcançou valores próximos do grupo controle (Tabelas 1 e 2), diminuiu o peso placentário, mas não influenciou o índice placentário (Tabela 2). O tratamento adequado da glicemia materna diminuiu a incidência de recém-nascidos PIP às custas de aumento dos AIP e GIP (Figura 4).

No controle inadequado do diabetes tanto no



* Teste F: 6,32 $p < 0,01$ G5 ad < G5 inad, restante não diferem (glicemia *pool* recém-nascidos)
 Teste F: 7,58 $p < 0,05$ G3 = G5ad; G3 < G5 inad; G5 ad < G5inad (glicemia materna)

Figura 3 - Glicemia materna no 21º dia da prenhez e do *pool* de filhotes ao nascimento nos grupos tratados, considerando a qualidade adequada e inadequada do tratamento.

Tabela 2 - Média (m) e desvio padrão (s) dos pesos fetal e placentário e índice placentário (IP) nos grupos tratados, considerando a qualidade adequada e inadequada do tratamento.

Grupos Experimentais	Peso corpóreo (g) m + s	Peso Placentário (g)	IP (peso placenta/feto)	Média glicêmica da prenhez (mg/dl)
G3 inadequado	4,940 ± 0,45	0,479 ± 0,07	0,10 ± 0,20	147,0 ± 36,5
G5 adequado	4,710 ± 0,31	0,461 ± 0,60	0,10 ± 0,01	172,9 ± 14,8
G5 inadequado	4,486 ± 0,30	0,520 ± 0,08	0,12 ± 0,02	244,4 ± 30,6
Teste F	25,11	9,30	0,34	14,54
Comentários	$p < 0,01$ G3 > G5ad > G5 inad	$p < 0,01$ G3 = G5 ad G3 < G5 inad G5 ad < G5 inad	$p > 0,05$ ns	$p < 0,01$ G3 < G5 inad G5 ad < G5 inad G3 = G5 ad

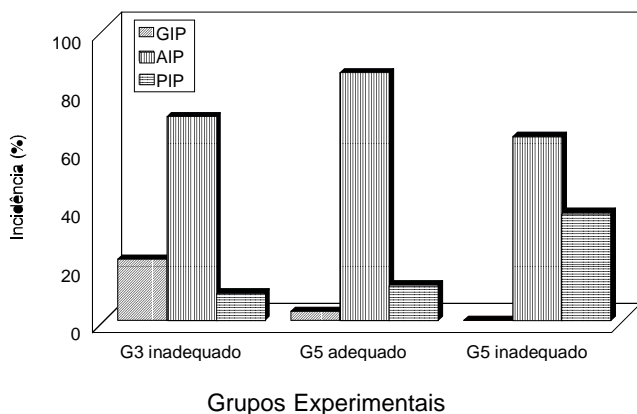


Figura 4 - Incidência (%) de recém-nascidos de peso grande (GIP), adequado (AIP) e pequeno (PIP) para a idade de prenhez nos grupos tratados, considerando a qualidade adequada e inadequada do tratamento.

grupo com diabetes grave como no moderado a glicemia dos recém-nascidos manteve-se elevada, proporcional aos níveis glicêmicos maternos (Figura 3). Esse tratamento de qualidade inadequada manteve a influência do nível de glicemia materna sobre o feto e a placenta. No diabetes grave persistiu o menor peso fetal, o maior peso placentário, a tendência ao maior índice placentário (Tabela 2) e maior incidência de recém-nascidos PIP (Figura 4). O diabetes moderado não controlado manteve o peso fetal e placentário e não influenciou o índice placentário (Tabela 2), porém diminuiu a incidência de GIP aumentando a de PIP (Figuras 2 e 4).

Discussão

A insulinoterapia na prenhez de ratas diabéticas tem como objetivo a obtenção de normoglicemia materna para evitar as consequências desastrosas feto-placentárias do diabetes não controlado². Neste trabalho, tal objetivo não foi alcançado, pois, mesmo com o tratamento, a média glicêmica materna continuou elevada (Tabela 1).

Os conceitos das ratas com diabetes moderado tratadas (G3) se desenvolveram em meio hiperglicêmico semelhante ao das ratas não-tratadas (G2) e, em decorrência, o tratamento não influenciou os pesos fetal e placentário, o índice placentário (Tabela 1) e a glicemia do "pool" dos filhotes (Figura 1). Apesar do mau resultado no controle glicêmico materno das ratas com diabetes moderado, o tratamento com insulina diminuiu a incidência de recém-nascidos macrossômicos (Figura 2).

No grupo com diabetes grave tratado (G5) houve queda da média glicêmica na prenhez levando à diminuição da glicemia do *pool* dos filhotes, aumento do peso fetal e menor incidência de retardo de crescimento intra-uterino (Figuras 1 e 2 - Tabela 1). Esses resultados são mais exuberantes quando se analisa em relação à qualidade do tratamento, visto que 60% das ratas com diabetes grave tiveram a média glicêmica materna semelhante ao das ratas com diabetes moderado (Tabela 2). O controle adequado do diabetes grave aumentou o peso fetal e determinou diminuição do peso placentário (Tabela 2), da glicemia do *pool* dos recém-nascidos (Figura 3) e da incidência de recém-nascidos PIP (Figura 4). Apesar da interferência no peso placentário, o tratamento insulínico não melhorou a função

placentária avaliada pelo índice placentário. Tais observações reforçam a ação da hiperglicemia de intensidade variada, na estrutura e função placentárias⁵.

As explicações para esses resultados decepcionantes no controle da glicemia materna podem estar relacionadas ao esquema de insulina em dose única e no jejum, ao método utilizado para ajustar a dose de insulina e ao número de vezes em que foi avaliada a glicemia na prenhez. A dificuldade em manter normal a glicemia em animais diabéticos foi bem documentada por Patel¹⁴ e trabalhos experimentais mais recentes têm conseguido o controle da glicemia materna com o fracionamento da dose de insulina⁷ e avaliação diária da glicemia para orientar a insulinoterapia¹³.

Esses resultados reforçam o conceito clínico de que o tratamento com insulina sempre deve ser sempre realizado, mesmo que não se atinja o controle excelente da glicemia materna.

Conclusões

Considerando-se o objetivo deste trabalho de avaliar a repercussão da insulinoterapia na prenhez de ratas diabéticas, e a influência da qualidade do controle glicêmico sobre o recém-nascido e a placenta, os resultados obtidos possibilitaram as seguintes conclusões:

a) O resultado perinatal teve relação direta com a qualidade do controle glicêmico. O controle adequado do diabetes grave normalizou a glicemia dos recém-nascidos, aumentou o peso dos filhotes e diminuiu a proporção de recém-nascidos de peso pequeno para idade de prenhez. O controle inadequado do diabetes moderado determinou níveis de hiperglicemia moderada nos recém-nascidos e não interferiu com o peso dos filhotes. Apesar disto, diminuiu a proporção de recém-nascidos de peso grande para idade de prenhez.

b) A insulinoterapia adequada diminuiu o peso das placentas no diabetes grave, mas não interferiu com o índice placentário.

SUMMARY

Fetal and placental effects of insulin therapy on pregnancy of diabetic rats were studied. Alloxan was administered intravenously at the dose of 42 mg/kg of body weight. Five experimental groups were formed: control (G1, n=12), non-treated rats with

moderate diabetes (G2, n=10), insulin-treated rats with moderate diabetes (G3, n=11), non-treated rats with severe diabetes (G4, n=12) and insulin-treated rats with severe diabetes (G5, n=10). Six hundred and thirty-four newborn rats and placentas were procured. The perinatal result of insulin therapy was directly related to the quality of glycemia control. Thus, inadequate control of moderate diabetes produced levels of moderate hyperglycemia, did not interfere with the newborn rats' body weight and decreased the proportion of LGA newborn rats. Adequate control of severe diabetes brought the newborn rat glycemia to normal levels, increased the newborn rats' body weight and decreased the proportion of SGA newborn rats. Adequate insulin therapy for severe diabetes diminished the weight of the placentas, but did not change the placental index.

KEY WORDS: *Pregnancy complications. Diabetes; Fetal growth and development. Experimental diabetes. Placenta*

Referências bibliográficas

1. Akashi M, Akazawa A, Akazawa M, Trocino R, Hashimoto M, Maeda Y, Yamamoto H, Kawasaki E, Takino H, Yokota A, Nagataki S. Effects of insulin and myo-inositol on embryo growth and development during early organogenesis in streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetes** 1991; 40: 1574-9.
2. Beebe LFS, Kaye PL. Maternal diabetes and retarded preimplantation development of mice. **Diabetes** 1991; 40: 457-61.
3. Calderon IMP. Modelo experimental em ratas para estudo do binômio diabetes e gravidez. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 1988.
4. Calderon IMP. Influência do binômio diabetes e gravidez na atividade endócrina do pâncreas materno e fetal - estudo experimental em ratas. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 1994.
5. Calderon IMP., Rudge MVC., Ramos MD, Peraçoli JC, Michelassi LM. Alterações placentárias relacionadas aos desvios do crescimento fetal na prenhez de ratas diabéticas. In: 45º Congresso Brasileiro de Ginecologia e Obstetrícia, Salvador. 1993. Anais. FEBRASGO.

6. Chartrel NC, Clabaut MT, Boismare FA, Schrub JC. Uteroplacental hemodynamic disturbances in establishment of fetal growth retardation in streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetes** **1990**; **39**: 743-6.
7. De Hertogh R, Vanderheyden I, Pampfer S, Robin D, Delcourt J. Maternal insulin treatment improves pre-implantation embryo development in diabetic rats. **Diabetologia** **1992**; **35**: 406-8.
8. Eriksson RS, Thunberg L, Eriksson UJ. Effects of interrupted insulin treatment on fetal outcome of pregnant diabetic rats. **Diabetes** **1989**; **38**: 764-72.
9. Eriksson UJ, Bone AJ, Turnbull DM, Baird JD. Timed interruption of insulin therapy in diabetic BB/E rat pregnancy: effect on maternal metabolism and fetal outcome. **Acta Endocrinol** **1989**; **120**: 800-10.
10. Eriksson UJ, Dahlström VE, Lithell HO. Diabetes in pregnancy: influence of genetic background and maternal diabetic state on the incidence of skeletal malformations in the fetal rat. **Acta Endocrinol (Suppl)** **1986**; **277**: 66-73.
11. Hayek A, Barela TD, Wogenrich FJ, Guardian CM. Fetal rat islet insulin deficiency following maternal administration of streptozotocin. **Proc Soc Exp Biol Med** **1985**; **180**: 209-13.
12. Homko CJ, Khandelwal M. Glucose monitoring and insulin therapy during pregnancy. **Obstet Gynecol North Am** **1996**; **23**: 47-74.
13. Padmanabhan R, Al-Zuhair GH. Congenital malformations and intrauterine growth retardation in streptozotocin induced diabetes during gestation in the rat. **Reprod Toxicol** **1987**; **1**: 117-25.
14. Patel DG. Rate of insulin infusion with a minipump required to maintain normoglycemia in diabetic rats. **Proc Soc Exp Biol Med** **1983**; **172**: 74-8.
15. Robinson J, Canavan JP, El HAY AJ, Goldspink DF. Maternal diabetes in rats I. Effects on placental growth and protein turnover. **Diabetes** **1988**; **37**: 1665-70.
16. Rudge MVC, Calderon IMP, Ramos MD, Maesta I, Souza LMS, Peraçoli JC. Perspectiva perinatal decorrente do rígido controle pré-natal em gestações complicadas pelo diabete. **Rev Bras Ginecol Obstet** **1995**; **17**: 26-32.
17. Veselá J, Reháč P, Baran V, Koppel J. Effects of healthy pseudopregnant milieu on development of two-cell subdiabetic mouse embryos. **J. Reprod Fertil** **1994**; **100**: 561-5.
18. Zar JH. Biostatistical analysis. 2 ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1984. 718p.