

ERIVALDO RIBEIRO SANTOS JUNIOR

**O EFEITO DO DIABETES INDUZIDO PELA
ESTREPTOZOTOCINA EM RATAS WISTAR NA FASE
PRÉ- GESTACIONAL E GESTACIONAL E SUAS
CONSEQUÊNCIAS NO CONCEPTO.**

CAMPINAS

2006

ERIVALDO RIBEIRO SANTOS JUNIOR

**O EFEITO DO DIABETES INDUZIDO PELA
ESTREPTOZOTOCINA EM RATAS WISTAR NA FASE
PRÉ-GESTACIONAL E GESTACIONAL E SUAS
CONSEQÜÊNCIAS NO CONCEPTO.**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Mestre em Saúde da
Criança e do Adolescente, área de concentração em Saúde da
Criança e do Adolescente*

ORIENTADOR: PROF. DR. SÉRGIO TADEU MARTINS MARBA

CAMPINAS

2006

Este trabalho teve apoio e financiamento da CAPES.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Erivaldo e Sueli, aos meus sobrinhos Jéssica e Lucas e a Alzira Gismonte Prado (In memorian) que sempre me incentivaram e me apoiaram por todos esses anos com muita paciência, amor e respeito.

Dedico também esse trabalho a todas mães carentes do Instituto da Gestante Socorristas Cristãs de Americana-SP, o qual pude acompanhar suas principais dificuldades e que foram fonte de inspiração para este projeto, pensando no bem-estar e numa melhor qualidade de vida neste período tão importante, que é a gravidez.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sérgio Marba que sempre acreditou e se dedicou a este trabalho.

Ao Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto pela cessão do seu laboratório de cirurgia fetal.

Aos colegas do laboratório de Investigação e cirurgia do trauma, principalmente à Dra Rosana Morandin que não poupou esforços para realização deste projeto e ao Prof. Dr. Mário Mantovani.

Aos Professores Doutores Mário José Abdalla Saad e Kleber Gomes Franchini pela colaboração.

Ao apoio e incentivo do Doutor Daniel Ianni Filho e do Dr. Belmiro Pereira Gonçalves Dias.

Às secretarias Simone Cristina Ferreira, Walquíria Barbosa e Andréia Cristina Oliveira pelo constante auxílio.

*“A meta de qualquer pesquisa não é a objetividade,
mas a verdade”*

Helene Deütsch

	<i>PÁG.</i>
RESUMO	<i>x</i>
ABSTRACT	<i>xii</i>
INTRODUÇÃO	14
OBJETIVOS	24
MATERIAL E MÉTODOS	26
RESULTADOS	32
DISCUSSÃO	43
CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ANEXOS	56

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

% Porcentagem

≥ Maior ou igual

Et al. e outros (as)

C Controle

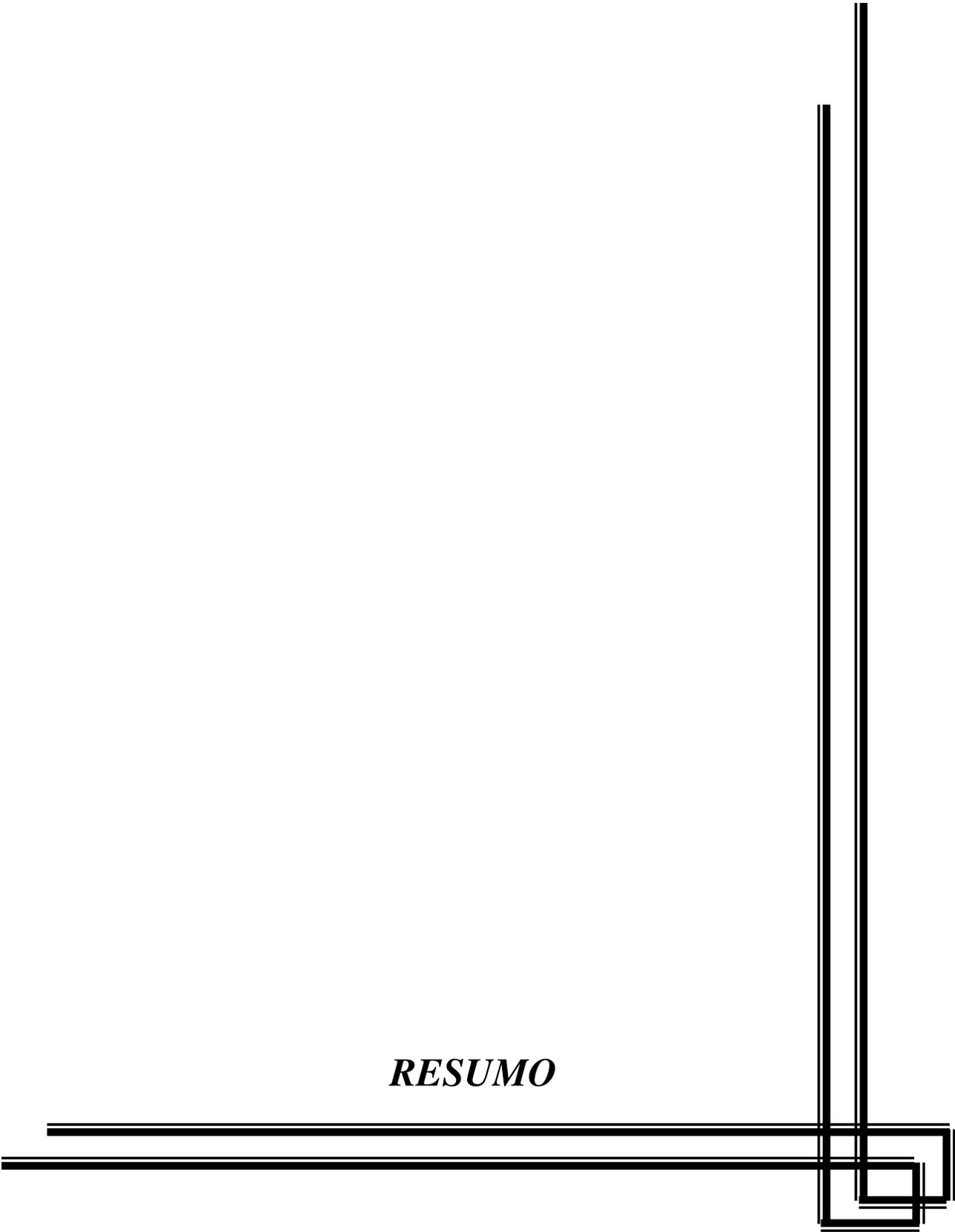
PG pré-gestacional

G Gestacional

RNPB Recém-nascido de baixo peso

MF malformações

RESUMO



O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do Diabetes mellitus induzido na fase pré-gestacional e gestacional em ratas Wistar e seus conceptos. Foi realizado um estudo de diabetes experimental utilizando 16 ratas da linhagem Wistar, sendo seis induzidos na fase pré-gestacional, seis durante a gestação e 4 como controle. Os dados foram coletados no laboratório de cirurgia do trauma da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Foram avaliadas as variáveis, glicemia, tempo de acasalamento, peso materno, número de filhotes, peso corporal e cardíaco dos filhotes. Para análise estatística foi realizada análise descritiva, a evolutiva através da ANOVA e teste de tukey e para comparar as variáveis numéricas foi utilizado a coeficiência de correlação de Pearson sendo o nível de significância adotado de $p < 0.05$. Foi observado que em todas as ratas induzidas foi possível reproduzir a doença. Quanto ao tempo de acasalamento o grupo que mais ocorreu dificuldades foi o pré-gestacional com 20 dias para que a fêmea aceitasse a cópula. O ganho de peso gestacional foi estatisticamente menor quando comparado com o grupo controle e um menor número de filhotes encontrado foi no grupo pré-gestacional.

Nos neonatos do grupo gestacional encontramos maior peso corporal e menor peso corporal no pré-gestacional. Os neonatos do grupo gestacional apresentaram aumento médio do coração quando comparados ao controle.

Foi possível estabelecer o Diabetes em todas as ratas induzidas e se utilizar esse modelo para investigar e prevenir possíveis anormalidades causadas pela Diabete gestacional nos recém-nascidos através da intervenção e profilaxia de malformações nos conceptos de mães diabéticas

Palavras-chaves: diabetes gestacional, ratos, modelo experimental.

ABSTRACT



The objective of study has establish effects of diabetes induced by streptozotocin in Wistar rats (phase advance pregnancy and pregnancy) and your newborns. Had been used 16 rats of lineage wistar, six rats per group (6 rats induced during pregnancy, 6 rats induced before pregnancy and 4 rats as control. The data had been collected in the laboratory of surgical inquiry of College of Medicine of the UNICAMP, during the period of October of 2004 at June of 2005.They had been measured: the glucose, time of copulation, the weight maternal, size of offspring, weight of offspring and weight cardiac of offspring. For analyze statics adopted ANOVA, test of tukey and correlacion of Pearson, the level of significant adopted was of $p < 0.05$. They was perceived which in all rats induced was possible reproduce the patology . While the mate, the group which more had hardness is the before pregnancy which 20 days for female let male. The gain of wight pregnancy was less which the expectation in group before pregnancy which mean of $195 \pm 38g$ and as less number of offspring find in group before pregnancy which mean of 3.5.

In offspring finds larger weight in group pregnancy which mean of 6.01g and less weight in group before pregnancy which mean of 2.23g compared control which is of 3.96g. While the heart hipertrofy finds in group pregnancy which mean of 0.055g compared group control of 0.037g.

Conclusions : An established time the gestational model diabetes in rats is possible now to use of this method to leave investigative space in neonatology e to future prevent the appearance of discomforts and anomaly in mother e in the children.

Keywords: diabetes pregnancy, rats, experimental model.

INTRODUÇÃO



Há mil e quinhentos anos antes de Cristo um documento médico egípcio chamado papiro Ebers já fazia referência à patologia Diabetes. A nomenclatura da doença foi datada no ano 80 da era cristã por Aretaeus, um médico romano que relatou uma doença cujos principais sintomas eram eliminação copiosa de urina, sede incontrollável e emagrecimento e criou o termo diabetes, palavra de origem grega, que significa passar através de, pelo fato da poliúria, um dos sintomas mais aparentes da doença se assemelhar à drenagem de uma água. (ARDUINO, 1980; LAUN, 1993).

No ano 1020, o médico árabe Avicena forneceu uma menção sobre a associação de açúcar na urina, pelo fato de ao redor da cama de seus pacientes se aglomerarem muitas formigas. Em 1869 o cientista Langherans descobriu as ilhotas do tecido pancreático que mais tarde seria a base para pesquisas da insulina (ARDUINO, 1980).

O marco histórico dos conhecimentos sobre a doença e principalmente sobre a terapia desta moléstia foi dada pelo cientista Banting que permitiu que em janeiro de 1922 fosse aplicada no homem a primeira injeção de insulina com finalidade terapêutica. Nos anos 60, importantes aquisições foram feitas ao processo da síntese da insulina e a descoberta dos efeitos metabólicos do glucagon e outros hormônios.

Nos anos 70, foi realizada a purificação da insulina extraída de animais, que aliviou problemas de alergia e resistência à insulina. No início da década de 80, chegou-se à conclusão de que o diabetes é fator de risco isolado para infartos e derrames. Pela observação dos doentes, constatou-se que a probabilidade de um diabético ser vítima de um evento desse tipo é até três vezes maior que a verificada em não-diabéticos (BERTINI, 1984; BAKER, 1979).

Nos tempos atuais, no entanto, maior conhecimento sobre a doença e medicamentos mais potentes e eficazes promete mudanças drásticas na vida dos pacientes. Na última associação européia no estudo do diabetes realizada em setembro de 2005 em Atenas, foram apresentados novos tratamentos a base de insulina de ação rápida, ultrarrápida e via oral (EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF DIABETES, 2005; BURT, 1985)

O Diabetes é uma doença crônica grave e em franca ascensão. Em 2025, os 170 milhões de doentes que existem hoje devem chegar a 300 milhões. Apesar da alta taxa de mortalidade em decorrência do problema, a adesão ao tratamento é baixíssima. No Brasil, por exemplo, apenas 20% dos pacientes diagnosticados seguem rigorosamente as orientações médicas. A doença é classificada como uma síndrome de alterações metabólicas e hiperglicemia devido à uma deficiência absoluta ou relativa da secreção de insulina ou redução de sua eficácia biológica(EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF DIABETES,2005;THAMOTHARAN,2003)

O Diabetes está alcançando proporções epidêmicas mundialmente. Somente na Europa, existem mais de vinte e cinco milhões de pessoas com diabetes. Na maioria dos países, a doença é agora uma das principais causas de morte em virtude dos seus efeitos em doenças cardiovasculares, que corresponde a 75% de óbitos. É ainda uma das principais causas de cegueira, insuficiência renal e amputação de membro inferior (EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF DIABETES, 2005; UTSOMIYA, 2005).

Quando durante a gravidez surge um descontrole metabólico, chamamos de Diabetes Gestacional. Uma situação que pode alterar de maneira marcante o meio ambiente onde se desenvolve o concepto.

Foi demonstrado que quando há controle do diabetes durante a gestação e se faz uso de sistemas de monitorização sobre o feto e cuidados intensivos ao nascimento isso determina uma queda da mortalidade perinatal(FELIG, 1981; PHILIPIS, 1985)

O Diabetes gestacional é definido como intolerância aos carboidratos, de grau variável de gravidade, que se inicia ou é reconhecido pela primeira vez durante a gravidez. O diabetes mellitus está associado à desnutrição e tem recebido maior atenção nos últimos anos devido ao aumento da sua incidência em populações vítimas da fome. As evidências de que a desnutrição pode ser diabetogênica vêm de estudos que mostram a intolerância à glicose em animais (HEARD, 1967; TURNER, 1967) e em seres humanos (BECKER, 1971, ELSNER, 2000)

Em 1882 já se fazia referência à existência de um tipo de diabetes que ocorre somente na gravidez, ausente em outros períodos, acarretando importantes alterações maternas na constituição quantitativa de sangue e ossos, pele e anexos, coração e glândulas e muito provável, que cada constituinte sólido e líquido do organismo (Ó SULLIVAN, 1991; NATIONAL DIABETES GROUP, 1979).

O NATIONAL DIABETES DATA GROUP – NDDG (1979) alerta para a necessidade de vigilância na gestação atual e a necessidade de follow-up pós-parto, de prevenção da obesidade e outros fatores de risco entre as gestações subsequentes. O NDDG ainda considerou fatores de risco para o Diabetes gestacional, tais como: idade materna, obesidade, ganho ponderal excessivo durante a gravidez, hipertensão arterial crônica ou induzida pela gestação, malformações em gestações anteriores, história familiar de diabetes, obesidade e a hipertensão.

O desenvolvimento do diabetes é controlado por, no mínimo, 2 fatores, o primeiro fator está nos genes. Um dos genes recessivos diabetogênicos mais ativos é o que está ligado ao cromossomo 17. Quanto ao outro fator é meio ambiente, tanto quanto a ação de vírus, uma aplicação de anticorpo, restrição proteica e distúrbios hormonais podem influenciar no aparecimento do diabetes (LANG; BELLGRAU, 2004)

A gravidez determina alterações importantes na homeostase de carboidratos, proteínas e lipídeos, no sentido de fornecer energia e material de crescimento para dois organismos. Porém o descontrole desse metabolismo na fase gestacional e mais precisamente na primeira metade da gestação, pode acarretar complicações hipertensivas e obstétricas na gestante diabética podendo até mesmo levar a morte materna ou acarretando sérias complicações fetais e neonatais, como por exemplo, macrosomia fetal, síndrome da angústia respiratória e hipoglicemia (FEIG; PALDA, 2002; HEINIGER, 2001)

ARDUINO (1980), em seu trabalho de revisão, descreveu que uma das complicações graves que ocorrem nas gestantes diabéticas é a hipertensão crônica, tendo uma incidência maior que a da população obstétrica geral. Já em relação a toxemia e ao polidrâmnio costumam estar associados e ocorrem com maior probabilidade quando o controle diabético não é bom.

Em relação aos problemas e alterações do metabolismo que podem acontecer nos filhos de diabéticas, citamos a hipoglicemia neonatal, a síndrome do desconforto respiratório idiopático, macrossomia fetal, hipocalcemia, policitemia que sem dúvida são mais freqüentes, e que tem associação com o mau controle glicêmico (HOSOKAWA, 1996; ERIKSON, 1984; MILSS, 1988, LAUN, 1993).

Nas primeiras horas de vida, os recém-nascidos de mães diabéticas são mais hipoglicêmicos que os de mães não-diabéticas. A resposta insulínica dos primeiros é mais intensa e mais rápida e o nível mais baixo de ácidos graxos não esterificados sugere rápida utilização do mesmo, para a conservação dos depósitos de glicogênio para o uso de sistemas dependentes de insulina. O hiperinsulismo fetal, pode estar associado com a hipoxia fetal embora isto ainda não seja comprovado, podendo levar a policitemia e hiperviscosidade sanguínea. Quando existe macrossomia, distócia e dificuldade de extração do feto podem contribuir também para a asfixia neonatal (PINTER; REECE, 1988, LEITER, 2005).

Quanto à síndrome da angústia respiratória, inúmeros estudos demonstram que há um retardo na maturação pulmonar dos filhos de mães diabéticas e que hiperglicemia e hiperinsulina fetal parecem estar implicados neste mecanismo patogênico (WHITE, 1965; BERTINI, 1984).

A avaliação do bem estar fetal é assim, uma das principais prioridades dos centros de assistência às gestantes com diabetes, ainda que se conheça pouco da fisiopatologia do sofrimento fetal em tais pacientes. (DRISCOLL, 1965; CHO, 2000; BOUCINHAS, 1987).

Quanto a macrossomia, é mais comum em pacientes com diabetes de curta evolução, ou como chamamos de “diabetes durante a gestação”, sem complicações vasculares importantes. PEDERSEN (1965) estabeleceu que a hiperglicemia materna, levando à hiperglicemia e ao hiperinsulinismo fetal, resultava em excessivo crescimento do feto e ao acúmulo de gordura no mesmo; e mais, concluiu que o filho de mãe diabética, macrossômico, apresentava menor quantidade de água orgânica total e que o aumento de peso era devido aos depósitos de gordura. Além da glicose, outros substratos podem

modificar a resposta secretora da insulina fetal e é provável que também os aminoácidos sejam importante regulador de secreção de insulina fetal (MILLS, 1988; MERSOUK, 2000)

Com a descrição de DRISCOLL (1965) considera-se macrossômico o recém-nascido que, a termo, pesa 4.000 g ou, segundo alguns autores (países nórdicos), 4.500 g. Outros não consideram valores absolutos, mas sim recém-nascidos grandes para a idade gestacional (GIG) , quando o peso ao nascer se encontra acima do 90 percentil de curva de referência.(NATIONAL DIABETES DATA GROUP, 1979).

Em relação a anomalias congênitas ocorrem mais freqüentemente em filhos de mães diabéticas. Isso ainda continua a contribuir para a mortalidade perinatal e, à medida que outras causas diminuem em freqüência, parecem representar uma causa progressivamente mais importante de mortalidade, assim como contribuir de forma significativa para a morbidade dos que sobrevivem (XIANG, 1999; PETERS, 1999).

São considerados fatores teratogênicos, entre outros, o meio hiperglicêmico, o possível efeito sinérgico dos corpos cetônicos, inibidores de somatomedinas e, possivelmente, a relaxina, e uma série de mecanismos pelos quais causam malformações (COSMI, 1997; PINTER, 1988; REECE, 1988).

As malformações causadas pelo diabetes são do tipo poligênico, multifatorial e sua causa exata continua desconhecida. Todos os órgãos e sistemas podem ser comprometidos, entretanto o sistema cardiovascular e o tubo neural são os sítios mais freqüentes de anomalias encontradas em filhos de mães diabéticas (PEDERSEN, 1965; CHO, 2001;; HOSOKAWA, 1996).

Em neonatos é possível que haja uma hipertrofia cardíaca quando submetidos a uma gestação hiperglicêmica e um defeito no septo ventricular pode ser um dos sinais mais visíveis da ação diabetogênica na gestação (AERTS, 1990).

Em trabalhos experimentais essas alterações também foram observadas onde crias de mães diabéticas apresentam pesos diferenciados de acordo com a fase em o diabetes se manifesta, ou seja, quando ele se manifesta no início da prenhez geralmente

nascem ratos de baixo peso e quando há um diabetes de curta duração é possível que nasça animais denominados acima do peso. (AERTS, 1990) Em humanos, a macrossomia pode constituir risco de obesidade na vida futura reforçando assim, a importância de cuidadoso controle pré-natal do metabolismo glicídico materno, já que não existem malformações características nestas crianças, mas defeitos do septo ventricular, uma hipertrofia cardíaca e também provável na coluna sacrococcígia são mais comuns do que em filhos de mães não diabéticas. Também relacionadas como anomalias comuns temos anencefalia, meningomielocèle e colo esquerdo curto. (MADSEN, 1992, WALD, 1982).

FELIG (1981) demonstrou que embriões de rato, mantidos em altas concentrações de D-glicose, apresentavam defeitos do tubo neural e foi observado que a insulina não tinha potencial teratogênico em embriões de camundongo expostos a elevadas concentrações desse hormônio. Em camundongos foi demonstrado que o ácido hidroxibutírico retarda o fechamento do tubo neural e, finalmente, foram demonstrados os inibidores de somatostatina.

Existe acentuada redução da incidência de malformações nos conceptos de mães diabéticas que participam de programas de contracepção antes de engravidarem. Atualmente, com o controle metabólico razoável durante a fase pré-gestacional, resta avaliar as causas de sofrimento fetal, que é a principal indicação de interrupção prematura da gestação em mulheres com diabetes mellitus (PHILIPPS, AF, 1985).

Como já dissemos a associação entre Diabetes melitus e gestação é conhecida tanto na área clínica quanto na área experimental. Na área clínica, alguns estudos sugerem que a ocorrência das malformações seja na fase pré-gestacional ou na fase de embriogênese precoce (PEDERSEN, 1965). Outros estudos indicam que este fato esteja relacionado com o estado metabólico, com um mau controle independente da fase do ciclo gestacional (BOUCINHAS, 1987).

Em estudos clínicos, mesmo bem controlados, a avaliação e correlação da fase da gravidez com a ocorrência de malformações (MF) são bastante difícil, pois de um modo geral, as mulheres iniciam o pré-natal sem que tenham uma boa avaliação prévia de seu estado metabólico. Em animais de laboratório é possível simular situações para este tipo de

avaliação com a indução diabete mellitus através de Aloxano ou Streptozocin (FUJISAWA, 2004, YANG, 2002).

Todo o empenho científico em estabelecer modelos de estudo, tanto quanto técnicas são desenvolvidas com o intuito de buscar caminhos em erradicar ou amenizar o problema de uma das doenças mais graves do nosso século. (EUROPEAN ASSOCIATION DIABETES, 2005; LEITER, 2005; BERTRAN, 2001).

O conhecimento sobre modelos de estudo em animais para fins de pesquisa teve início desde os primórdios e ao longo de centenas de anos, muitos registros históricos apontavam experimentos realizados na Alemanha e na França. Rapidamente esse conhecimento avançou a compreensão em fisiologia animal e comparada sobre todo o mundo. (COOK, 1965; BLOOMGARDEN, 2005).

Há 150 anos atrás, a maioria dos modelos era desenvolvida e usada para somente estudar a causa e natureza das doenças humanas. No entanto, hoje sua utilidade é vasta e é descrito na literatura no mínimo quatro grupo de modelo os quais são classificados da seguinte forma: Modelo espontâneo, negativo, modelos órfãos e modelo induzido (SVENDSEN, 1994; AUGSTEEN, 2000).

Alguns modelos utilizam naturalmente a ocorrência de variantes genéticas juntamente com a interferência do meio ambiente. O Diabetes, por exemplo, também pode aparecer em ratos como resultado de uma destruição auto-imune das células beta na composição da pré-disposição genética, em outras palavras, chamamos isso de modelo espontâneo de diabetes. (UTSUNOMIYA YAMAKAWA, KAMEI, TANAKA, 2005)

Quase o oposto do espontâneo e do modelo induzido, são os modelos chamados de negativos, são aqueles os quais uma doença não desenvolveria naturalmente na espécie. O terceiro termo categoriza modelo órfão, que descreve uma condição que acontece naturalmente em uma espécie, mas que não têm relação íntima e nem foi descrita ainda em humanos, Exemplos são doença de Marek, Papillomatosis, e encefalopatia espongioforme bovina (BSE), a denominada “doença da vaca louca” (SVENDSEN, 1994).

Os modelos induzidos são imagens na qual a condição a ser investigada é induzida experimentalmente. (Por exemplo, a indução do Diabetes mellitus com aloxano ou a estreptozotocina). A Estreptozotocina é uma droga de nitrosoamido que têm sido usada para produzir diabetes em modelos experimentais. Em ratos a estreptozotocina é citotóxica para as células beta pancreáticas e uma única dosagem corporal de 20 a 250mg/kg intraperitoneal é capaz de induzir diabetes em ratos, pois ela é capaz de cessar a função da ilhota pancreática, eventualmente morte celular e diabetes. Dentro do estudo do Diabetes experimental é um dos modelos mais usados, mas não o único como já foi abordado.(SVENDSEN, 1994; AUGHSTEEN, 2000; LUCA, KOWALSKI, ZHANG, ELMQUIST, 2005).

Se falarmos sobre modelos espontâneos que sofrem influência do meio onde vivem, podemos citar, por exemplo, animais que crescem em cativeiro dentro de uma alimentação rica em carboidratos e que podem se tornar obesos. Muitas vezes, a suscetibilidade genética contribui também para o desenvolvimento a intolerância aos carboidratos e ao diabetes. A Hiperglicemia é o resultado de uma disparidade entre a resistência à insulina e a capacidade que a célula beta tem de secretar insulina. Na maior parte dos modelos descritos, a obesidade e a resistência a insulina são primeiramente fatores determinantes para o desenvolvimento da hiperglicemia. (KYLE, 1963; MORAN, 2004; BERTRAN, 2001; HALES, BARKER, 2001).

Assim, para acompanhar o desenvolvimento fetal associado ao diabetes, diversos animais de laboratório vêm sendo estabelecidos. Eles precisam reproduzir adequadamente todas as fases da doença, à semelhança do que acontece com as formas anatomoclínicas humanas. Até o momento, a linhagem Wistar tem-se mostrado como um bom modelo para o estudo da história natural do diabetes. Os modelos adequados são aqueles em que a indução do estado hiperglicêmico é feita com a administração de Aloxano ou estreptozocina. Em relação ao diabetes em fêmeas prenhes, a literatura também se utiliza essa forma de indução.(KHRAIBI, TANG, 2004; ELSNER, 2001).

Não existem mais dúvidas que a assistência reprodutiva da mulher com diabetes deve ter início na fase em que a gestação está sendo planejada. Para tanto, são necessários programas de assistência que incluam o planejamento familiar sob controle estrito,

aconselhamento reprodutivo e talvez, principalmente um trabalho profilático para evitar a manifestação diabetogênica. Para esse fim, novas diretrizes vêm sendo estabelecidas no mundo a fim de garantir um melhor tratamento e profilaxia da doença. A Associação Européia para o estudo de Diabetes, A Federação Internacional (IDF) e especialistas de todo mundo, incluindo representantes em diferentes conjunturas, lançou em setembro de 2005 a primeira diretriz global para novos padrões ao atendimento, objetivando reduzir as complicações que ameaçam à vida. Segundo a Global Guideline, a manutenção dos níveis de glicose sanguínea (HbA1c) deve estar abaixo de 65% para minimizar o risco do desenvolvimento das complicações, e o suporte base desta diretriz é através da educação do paciente, automonitoração dos níveis de glicose e utilização constante de comprimidos e insulina para que os níveis almejados sejam alcançados (BLOOMGARDEN, 2005).

Tanto em nosso país como em centros de referência no exterior, equipes se especializam neste tipo de atendimento e mostram bons resultados, tais como redução acentuada das patologias fetais e neonatais, além de diminuição das complicações maternas atribuíveis ao diabetes (BERTINI, CAMANO, DELASCIO, 1984).

OBJETIVOS



Objetivo geral

Avaliar o efeito do Diabetes Mellitus nas fase pré-gestacional e gestacional em ratas da linhagem Wistar e seus conceptos

Objetivos específicos

- 1-Comparar as diferenças na glicemia de ratas da linhagem Wistar com Diabetes Mellitus induzidas nas fases pré-gestacional e gestacional com controles sem a doença.
- 2- Comparar o tempo de acasalamento de ratas da linhagem Wistar com Diabetes Mellitus induzidas nas fases pré-gestacional e gestacional com controles sem a doença
- 3-Comparar as diferenças no peso corpóreo de ratas da linhagem Wistar com Diabetes Mellitus induzidas nas fases pré-gestacional e gestacional com controles sem a doença
- 4-Comparar o tamanho das ninhadas de ratas da linhagem Wistar com Diabetes Mellitus induzidas nas fases pré-gestacional e gestacional com controles sem a doença
- 5-Comparar as diferenças no peso corporal total dos conceptos de ratas da linhagem Wistar com Diabetes Mellitus induzidas nas fases pré-gestacional e gestacional com controles sem a doença
- 6-Comparar as diferenças no peso do coração dos conceptos de ratas da linhagem Wistar com Diabetes Mellitus induzidas nas fases pré-gestacional e gestacional com ratas controles sem a doença
- 7- Avaliar a correlação do valor glicêmico de ratas da linhagem Wistar com Diabetes Mellitus induzidas nas fases pré-gestacional e gestacional com o tempo de acasalamento , peso das ratas, tamanho da ninhada e peso corpóreo total e do coração dos conceptos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo analítico longitudinal e foi medido os tempos distintos entre os grupos através da comparação transversal com base nos experimentos com ratas da linhagem Wistar para avaliar o efeito do Diabetes Mellitus nas fase pré-gestacional e gestacional e nos seus conceptos.

Cálculo amostral

Para fins de calculo amostral foi utilizado as diferenças entre médias do peso do corpo dos conceptos e do coração nos grupos para estudo analítico com variável quantitativa. Foi fixado o nível de significância em 5% e o poder do teste por 90% ($\sigma = 10\%$) e o valor do desvio padrão do grupo controle. Considerando uma diferença de 0,8 para o tamanho do conceito e 0,008 para o tamanho do coração ao e o cálculo mostrou a necessidade de 3 ratos em cada grupo.

Casuística e critérios e procedimentos para seleção de sujeitos:

O trabalho foi realizado no Laboratório de Investigação Cirúrgica do Trauma pertencente ao Núcleo de Cirurgia e Medicina Experimental e no Laboratório de Cirurgia Fetal pertencente à Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP durante o período de outubro de 2004 à julho de 2005.

Foram utilizadas 16 ratas férteis da linhagem Wistar provenientes do Biotério central da UNICAMP acompanhadas antes e durante o processo gestacional e distribuídas em 3 grupos experimentais:

- a) Grupo 1(Controle): Ratas mães sem diabetes com 60 dias de vida (n=04)
- b) Grupo 2: Ratas mães com Diabetes induzido na fase pré- gestacional (n=06)
- c) Grupo 3: Ratas mães com Diabetes induzidas durante a gestação (n=06)

As ratas foram alimentadas com ração comercial para ratas adultas suplementada para gestação sob a condição padronizada de iluminação (ciclo claro/escuro 12 horas) e temperatura de 22±2°C. Durante todo o período experimental tiveram livre acesso à água e as respectivas dietas. Todas ratas foram mantidas por 2 semanas no biotério para adaptação às condições climáticas e dietéticas, bem como, até completarem idade adequada para o experimento (60 dias)

Variáveis:

Variável independente

Glicemia materna: definido através da dosagem da glicemia no sangue das ratas mãe após indução pela estreptozotocina. A variável foi considerada contínua.

Variáveis dependentes

- Tempo de acasalamento: definido como tempo médio de acasalamento e fertilização após contato com o macho. Considerado como categoria contínua.
- Peso materno: definido como o peso corporal materno realizado em balança analítica Screen de 5g de aproximação, no início e ao término da prenhez. Considerado como categoria contínua.
- Número da ninhada: definido como o número de filhotes nascidos vivos de cada prenhez. Considerado como categoria contínua.
- Peso corporal total do concepto: definido como peso corporal dos conceptos em balança analítica screen ao término da prenhez. Considerado como categoria contínua.
- Peso do coração do concepto: definido como peso cardíaco dos conceptos em balança analítica screen de 5g de aproximação ao término da prenhez. Considerado como categoria contínua.

Procedimentos do experimento

Para a indução do Diabetes foi usado uma solução de estreptozotocina (STZ) na dose de 65 mg/kg dissolvido em solução de citrato de sódio 1M com PH 4,4 diluindo na hora de inocular (Laboratório Simiens –SP) e aplicado intraperitonealmente. A aplicações foram feitas em até três vezes dependente do diagnóstico.

No grupo 1 (controle) foi aplicado três doses de solução tampão em forma de placebo. No grupo 2 foi aplicado o STZ antes da cópula, pois, somente depois de detectado o diabetes, é que elas eram colocadas com o macho para o cruzamento. Já no grupo 3 as ratas foram cruzadas primeiramente e somente 24 horas depois receberam a dosagem de STZ. Se acaso na segunda semana o grupo ainda não fosse identificado como diabético, esse teria uma terceira indução até alcançar a hiperglicemia.

A avaliação da glicemia foi realizada nas ratas adultas para se ter o diagnóstico Diabetes Gestacional durante o período das manhãs (entre 7 e 8 horas da manhã) 24 horas depois de cada indução, onde coletamos o sangue via caudal e sua leitura foi feita pelo Glicosímetro Clia-Screen onde a fita fornecia o percentual doente/sadio. Adaptando o método de Somogyi-Nelson com intervalo de confiança de $91,5 \pm 21,5$ mg/100ml e usando o grupo controle como referência, eram consideradas diabéticas as ratas cuja glicemia pós-prandial de 3 horas era de ≥ 140 mg/dl. A glicose do sangue materno também foi determinado nos dias 7, 14, e 20 de prenhez.

Em relação a prenhez, o ciclo de reprodução (Estral) das fêmeas foi induzido através da urina do macho Wistar, ou seja, coletamos um pouco de maravalha úmida com urina do macho e colocamos na gaiola das fêmeas até 72 horas antes da cópula. O sistema de cruzamento utilizado foi o tipo harém (1 macho para 3 fêmeas) e posteriormente foi realizado o “esfregaço vaginal”, que foi realizado em tempos diferentes, dependente do grupo.

- Grupo pré-gestacional: confirmado o diabetes, as ratas eram alocadas com o macho. A fêmea foi testada para a presença de espermatozoides na vagina no próximo dia depois de estar aproximadamente de 12 a 16 h na mesma caixa com o rato procriador macho Wistar.

- Grupo gestacional: após o estro induzido, as ratas eram alocadas com o macho. A fêmea foi testada para a presença de esperma na vagina no próximo dia depois de estar aproximadamente de 12 a 16 h na mesma caixa com o rato procriador macho Wistar e só depois de 24 horas era aplicada a injeção de STZ.

Dessa forma, as ratas eram manualmente seguradas e era inserida uma pipeta com uma solução fisiológica em forma de sucção na vagina delas, com o intuito de coletar o muco vaginal. Feito isso era preparado a lâmina para observar as células espermáticas do macho através do microscópio óptico. A presença de espermatozóides indicou o primeiro dia de gravidez (dia zero). Confirmado a gravidez, foi observado o comportamento das ratas.

Quanto ao peso, foi acompanhado sua curva desde o primeiro dia de experimento até o dia da cesárea, no entanto, escolhemos 2 intervalos para sua análise final, o primeiro dia após a indução da droga e o peso medido no dia da cesárea.

Foi escolhida a cesárea no dia que antecede o parto das ratas wistar (20^o dia) (pelo fato de evitar o canibalismo por parte das ratas mães diabéticas), e então as ratas prenhes foram anestesiadas com Ketamina (50 mg/kg) e Xylazine (10mg/kg) e foram colocados em tábua cirúrgicas para retirada dos filhotes. Todas as ratas foram eutanaziadas por decapitação ao término da experiência enquanto estavam mantidas pela anestesia. Este método de eutanásia é consistente com as recomendações do Painel em eutanásia da Associação de pesquisa e ética animal.

Após o nascimento dos ratos, estes foram separados em cubas e identificados por etiquetas. Após a identificação, foi medido o peso corporal total em balança analítica e posteriormente foram eutanaziados por decapitação e foi realizadas abertura torácica para retirada do coração. O coração foi condicionado em placas de petri e pesamos na balança analítica.

As ratas que evoluíam para o óbito, quando não conseguíamos induzir diabetes, prenhez ou quando desrespeitavam os critérios em cada grupo ao qual foi inicialmente alocada foi retirado do estudo.

Todas as informações necessárias ao estudo foram anotadas em planilha específicas e foram inseridos em banco de dados construído para serem processados.

Análise dos dados

Para descrever o perfil da amostra segundo as variáveis em estudo, foram feitas estatísticas descritivas das variáveis contínuas com valores de média, desvio padrão, valores mínimo, máximo e mediana.

Para analisar a evolução dos pesos e das glicemias entre os tempos e entre os grupos foi utilizada a Análise de Variância para medidas repetidas (*ANOVA for repeated measures*). Na comparação entre os grupos em cada tempo foi utilizado o teste de Tukey, e na comparação das medidas entre os tempos para cada grupo foi utilizado o teste de perfil por contraste. Para comparar as variáveis medidas num único tempo foi utilizada a Análise de Variância simples (*ANOVA One-Way*), com teste post-hoc de Tukey.

Para analisar a relação entre as variáveis numéricas foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson. As variáveis sem distribuição Normal foram transformadas em logaritmo (\log_{10}) para os testes estatísticos.

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja, $p < 0.05$.

Aspectos Éticos

Como preconiza o título 1 da seção 1 da UNESCO (1978), do COBEA – Colégio Brasileiro de experimentação animal e sob as normas de ética desta Universidade, este projeto foi aprovado sob protocolo 608-1 da Comissão de ética e experimentação animal do CEEA-IB da UNICAMP.

RESULTADOS



ANÁLISE DESCRITIVA

Glicemia

Foi observado que em todas as ratas induzidas foi possível reproduzir a doença sendo que a glicemia no grupo controle teve uma média de 92 ± 6 mg/dl, o grupo pré-gestacional com 396 ± 142 mg/dl e o grupo gestacional com valores médios de 387 ± 131 mg/dl. (TABELA 1, GRÁFICO 1).

Para análise da glicemia foi dividido o período estudado em dois intervalos: o primeiro medido foi a glicemia 24 horas após a primeira indução da estreptozotocina ou solução tampão, como foi o caso do grupo controle e o segundo intervalo foi a glicemia coletada no dia da cesárea.

Tabela 1- Acompanhamento da glicemia(mg/dl) de ratas prenhes da linhagem Wistar nos grupos controle, pré-gestacional e gestacional

Grupos	N	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
Controle Inicial	4	75.00	7.66	65.00	77.00	81.00
Controle Final	4	92.75	6.18	85.00	93.00	100.00
PG Inicial	6	316.00	38.57	266.00	314.00	375.00
PG Final	6	396.83	142.01	243.00	385.50	600.00
G Inicial	6	78.50	5.72	71.00	77.50	87.00
G Final	6	387.00	131.14	200.00	441.00	500.00

DP= desvio padrão G=gestacional PG=pré-gestacional

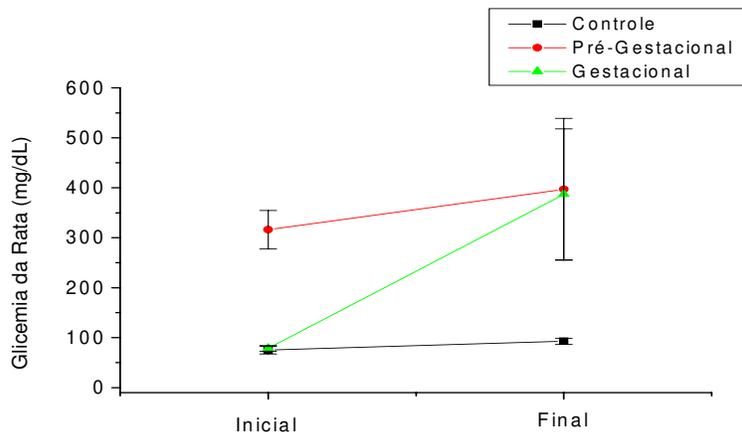


Gráfico 1- Acompanhamento da glicemia(mg/dl) de ratas prenhes da linhagem Wistar nos grupos controle, pré-gestacional e gestacional.

Tempo de acasalamento

O tempo de acasalamento foi maior grupo pré-gestacional com 20 dias para que a fêmea aceitasse a cópula ou implante.(TABELA 2, GRAFICO 2).

Tabela 2- Tempo de acasalamento (dias) das ratas da linhagem Wistar nos grupos controle, pré-gestacional e gestacional

Grupos	N	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
Controle	4	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
PG	6	20.83	10.48	1.00	24.00	28.00
G	1.67	0.52	1.00	1.00	2.00	2.00

DP= desvio padrão

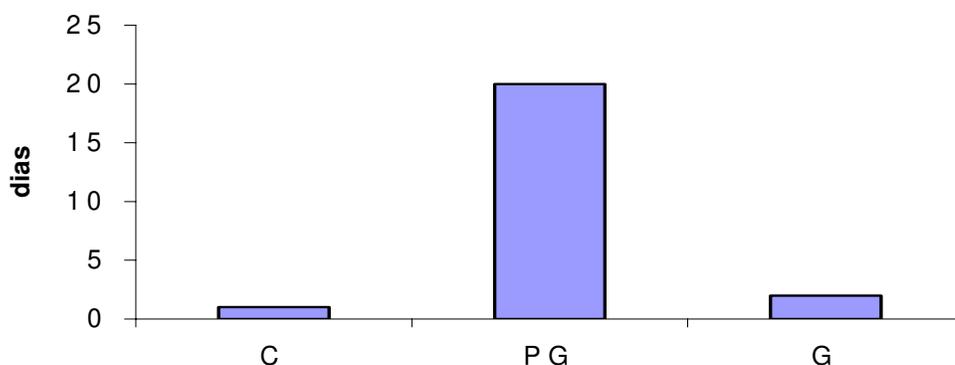


Gráfico 2- Tempo de Acasalamento (dias) das ratas da linhagem Wistar nos grupos controle, pré-gestacional e gestacional

Peso corporal das ratas

As ratas diabéticas induzidas antes da gestação não tiveram um ganho de peso esperado com sinais visíveis de desidratação e aumento no consumo de água. Foi observado que a evolução do peso materno do grupo controle e do grupo gestacional foram semelhantes e que o grupo pré-gestacional não ganhou peso significativo durante a gestação. (TABELA 3, GRAFICO 3).

Tabela 3- Acompanhamento do ganho de peso gestacional (g/kg) das ratas Wistar nos grupos controle, pré-gestacional e gestacional

Grupos	N	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
Controle Inicial	4	198.25	9.17	190.20	195.85	211.10
Controle Final	4	251.25	15.20	238.00	247.00	273.00
PG Inicial	6	189.93	38.51	136.00	188.05	240.00
PG Final	6	195.32	35.73	141.00	194.70	248.00
G Inicial	6	194.02	11.42	175.30	199.50	204.00
G Final	6	251.50	25.74	230.00	243.00	297.00

DP= desvio padrão

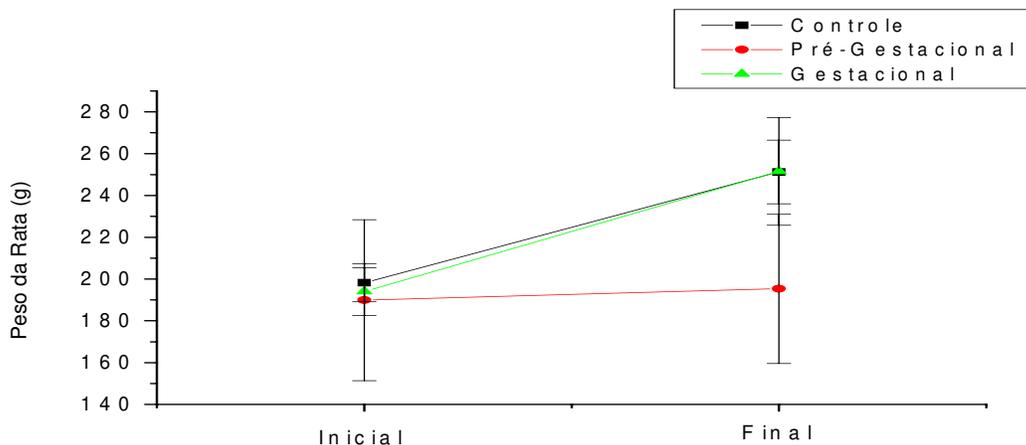


Gráfico 3- Acompanhamento do ganho de Peso Gestacional (g/kg) das ratas Wistar nos grupos controle, pré-gestacional e gestacional

Tamanho da ninhada (Número de conceitos por rata)

Quanto ao número de conceitos por parto, o menor encontrado foi no grupo pré-gestacional com uma média de 3.50 ± 3.39 sendo que o controle teve uma média de 7.25 ± 2.63 . Estes dados indicam que os neonatos de mães pré-diabéticas tiveram uma média menor da ninhada quando comparado ao grupo controle e também ao grupo gestacional (TABELA 4, GRAFICO 4).

Tabela 4- Número de filhotes nascidos vivos das ratas induzidas pela estreptozotocina nos grupos controle, pré-gestacional e gestacional

Grupos	N	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
Controle	4	7.25	2.63	5.00	6.50	11.00
PG	6	3.50	3.39	0.00	3.00	8.00
G	6	4.33	4.18	1.00	2.50	11.00

DP= Desvio padrão

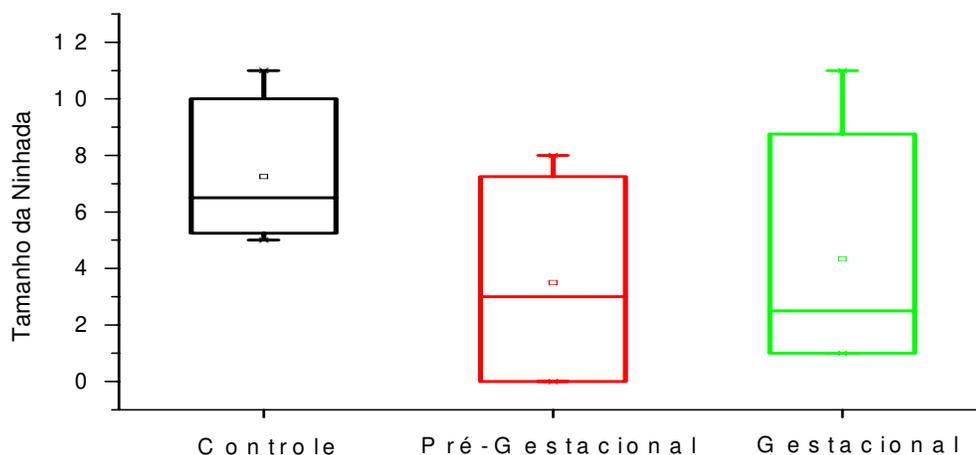


Gráfico 4- Número de filhotes nascidos vivos das ratas induzidas pela estreptozotocina nos grupos controle, pré-gestacional e gestacional.

Peso dos conceitos

Os neonatos do grupo gestacional foram os ratos com maior peso corporal encontrado e os neonatos do grupo pré-gestacional foram os ratos com menor peso corporal. A base da normalidade em relação a medida peso ao nascer foi evidenciada pelo grupo controle (TABELA 5, GRÁFICO 5).

Tabela 5- Peso corporal total dos neonatos(g/kg) de ratas induzidas pela estreptozotocina nos grupos controle, pré-gestacional e gestacional

Grupos	N	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
Controle	4	3.96	0.30	3.65	3.97	4.22
PG Final	6	2.23	0.39	1.83	2.23	2.65
G Final	6	6.01	1.42	4.04	6.09	7.75

DP= desvio padrão

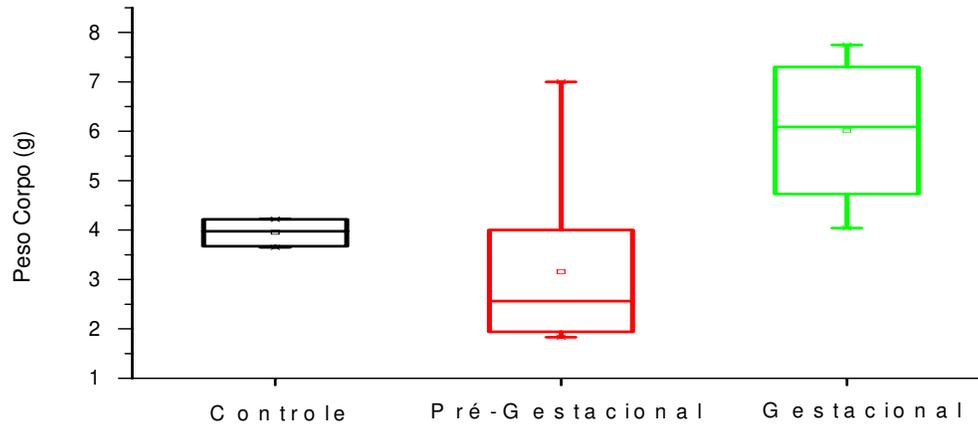


Gráfico 5- Peso corporal total dos neonatos(g/kg) de ratas induzidas pela estreptozotocina nos grupos controle, pré-gestacional gestacional.

Peso do coração

Os neonatos do grupo gestacional foram os ratos com maior peso cardíaco encontrado e os neonatos do grupo pré-gestacional foram os ratos com menor peso cardíaco. A base da normalidade em relação a medida peso cardíaco ao nascer foi evidenciada pelo grupo controle (TABELA 6, GRAFICO 6).

Tabela 6- Peso do coração total dos neonatos(g/kg)de ratas induzidas pela estreptozotocina nos grupos controle, pré-gestacional e gestacional

Grupos	N	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
Controle	4	0.037	0.003	0.034	0.037	0.042
PG	6	0.018	0.007	0.012	0.018	0.025
G	6	0.055	0.013	0.037	0.057	0.068

DP= desvio padrão

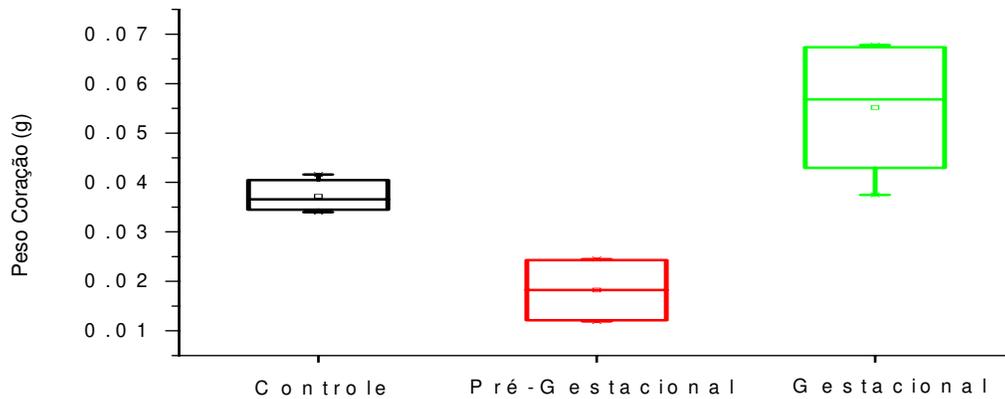


Gráfico 6- Peso do coração total dos neonatos (g/kg) de ratas induzidas pela estreptozotocina nos grupos controle, pré-gestacional e gestacional.

ANÁLISE COMPARATIVA E EVOLUTIVA

A avaliação estatística da glicemia e peso da rata foi realizada levando-se em consideração os três grupos de maneira transversal e os dois tempos de forma longitudinal, antes e no final do experimento. O efeito da interação entre os grupos em relação ao tempo foi estatisticamente significativo tanto para glicemia quanto para o peso da rata, o mesmo ocorrendo para a comparação entre os tempos. Na comparação com entre os grupos apenas a glicemia foi estatisticamente significativa (TABELA 7).

Tabela 7- Comparação entre grupos controle, pré-gestacional e gestacional e entre os tempos, início da gestação e dia da cesárea.

Variável Dependente	Comparação entre Grupos	Comparação entre Tempos	Efeito da Interação Grupo x Tempo
Glicemia Rata (\log_{10})	$F_{(2,13)}=58.69$; $p<0.001$ ^b	$F_{(1,13)}=82.35$; $p<0.001$ ^b	$F_{(2,13)}=43.68$; $p<0.001$ ^b
Peso Rata	$F_{(2,13)}=3.17$; $p=0.076$	$F_{(1,13)}=37.87$; $p<0.001$ ^a	$F_{(2,13)}=7.85$; $p=0.006$ ^a

Na comparação entre os grupos foram significativas as diferenças do tempo de acasalamento, para peso do corpo do concepto e peso do coração (TABELA 8).

Tabela 8- Comparação entre grupos controle, pré-gestacional e gestacional e para as variáveis estudadas

Variável Dependente	Comparação entre Grupos
Tempo de acasalamento (log10)	$F_{2,13}=15.30$ p<0,001
Ninhada	$F_{(2,13)}=1.39$; p=0. 284
Peso Corpo concepto	$F_{(2,11)}=17.82$; p<0. 001 ^c
Peso Coração concepto	$F_{(2,13)}=17.08$; p<0. 001 ^d

ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE A GLICEMIA FINAL E AS VARIÁVEIS ESTUDADAS

Tempo de acasalamento

Para análise de correlação entre Tempo de acasalamento e glicemia final estudadas, observou-se não ter havido diferença significativa no grupo gestacional e no controle, já no grupo pré-gestacional foi observado um tempo significativo para que as fêmeas desse grupo aceitassem a cópula (TABELA 9).

Tabela 9- Correlação entre a glicemia final (mg/dl) das ratas prenhes e o tempo do acasalamento(d) da rata nos diferentes grupos estudados

Grupos	N	r	p
Controle	4	0.00000	1.0000
PG Inicial	6	0.96382	0.0019
G Final	6	-0.50632	0.3054

Peso da rata

Para análise de correlação entre peso(g/kg) e glicemia final(mg/dl) estudadas, observou-se não ter havido diferença significativa no grupo pré-gestacional, ou seja não foi observado ganho de peso quando comparado ao ganho de peso significativo que o grupo gestacional teve (TABELA 10).

Tabela 10- Correlação entre a glicemia final das ratas prenhes e o peso da rata nos diferentes grupos estudados.

Grupos	N	r	p
Controle	4	0.73861	0.2614
PG Inicial	6	0.28261	0.5874
G Final	6	-0.92821	0.0075

r=coeficiente de correlação de Pearson; p=p-valor; n=número de animais. PG=pré gestacional
G=gestacional

Tamanho da Ninhada

Quanto a análise entre número de filhotes e a influência que a glicemia exerceu sobre a ninhada somente houve correlação significativa no grupo pré-gestacional, ou seja, menor número de filhotes conforme a glicemia materna $p < 0,05$ (TABELA 11).

Tabela 11- Correlação entre número de filhotes e glicemia final das ratas prenhes induzidas

Grupos	N	r	p
Controle	4	0.91664	0.0834
PG	6	-0,96082	0.0023
G Final	6	-0,99121	0.0001

* r=coeficiente de correlação de Pearson; p=p-valor; n=número de animais.

Peso do concepto

Quanto a análise entre peso corporal dos filhotes e a influência que a glicemia exerceu sobre eles houve correlação significativa apenas no grupo gestacional, ou seja, menor número de filhotes conforme o aumento da glicemia materna neste grupo (TABELA 12).

Tabela 12- Correlação entre Peso corporal neonatal e glicemia final das ratas prenhes induzidas

Grupos	N	r	p
Controle	4	0,7385	0,2614
PG	6	-0,06820	0,9318
G Final	6	0,92684	0,0078

* r=coeficiente de correlação de Pearson; p=p-valor; n=número de animais.

Peso do coração

Quanto a análise entre peso cardíaco dos filhotes e a influência que a glicemia materna exerceu sobre o aumento neonatal (hipertrofia cardíaca) houve somente correlação significativa no grupo gestacional, ou seja, maior peso cardíaco dos neonatos conforme o aumento da glicemia materna (TABELA 13)

Tabela 13- Correlação entre Peso cardíaco neonatal e glicemia final das ratas prenhes induzidas

Grupos	N	r	p
Controle	4	0,53717	0,4628
PG	6	0,15202	0,8480
G Final	6	0,92048	0,0092

* r=coeficiente de correlação de Pearson; p=p-valor; n=número de animais.

DISCUSSÃO

Em ratos a estreptozotocina é citotóxica para as células beta pancreáticas e uma única dosagem corporal de 200 a 250mg/kg intraperitoneal é capaz de induzir diabetes em ratos sendo capaz de cessar a função das ilhotas pancreáticas, eventualmente morte celular e diabetes.(LEITER,2005;LEE,2005).

A literatura alerta que múltiplas e baixas doses da droga pode se mostrar mais eficaz e que até 4 dosagens de 40mg/kg de forma intraperitoneal causa um estado hiperglicêmico (AUGSTEEN,2000). No início do estudo montamos um projeto piloto no qual testamos 3 diferentes dosagens para confirmar qual seria mais adequada para nosso objetivo. Na primeira indução usamos a dosagem que a literatura recomenda que é de 40mg/kg em até 4 injeções e não tivemos resposta até a 3ª dose. Esse fato se tornou limitante para nosso modelo de estudo já que pretendíamos estudar o efeito do diabetes durante a gestação da linhagem Wistar que é de 22 dias aproximadamente. Desta forma, a gestação das ratas já estaria no final do ciclo e o diabetes ainda não seria induzido, em outras palavras, esse protocolo não foi adequado para nosso trabalho. Dessa forma aumentamos a dosagem até obter o efeito desejado.

A dosagem aplicada no nosso protocolo foi de 65mg/kg sendo essa diluída em uma solução tampão com pH 4.4, sendo esse fator ácido importante na eficácia e potencialização da droga. Uma vez induzido a doença, acompanhamos o estado glicêmico das ratas e constatamos as características típicas do diabetes gestacional em ratas Wistar . Em relação à glicemia inicial observamos maior hiperglicemia no grupo que foi induzido na fase pré-gestacional, já que nesse grupo o efeito da droga estreptozotocina que causa o diabetes não sofre interferência de alterações metabólicas da gravidez como ocorre no outro grupo gestacional. Isso significa que não é somente o diabetes que interfere na gestação, mas que a gestação também interfere no estado diabético(LAUN,1993).

Segundo a literatura a suscetibilidade para um animal desenvolver o diabetes induzido depende do sexo, da linhagem e principalmente do seu estado metabólico, que como sabemos, na gestação esse mecanismo é alterado, os hormônios sofrem modificações bem como a ação das células beta pancreáticas da mãe que tem maior atividade insulínica para promover maior atividade metabólica fetal e no caso de uma mãe diabética as

flutuações glicêmicas demonstraram ser mais freqüentes no grupo pré-gestacional que no grupo gestacional. (MERZOUK, 2000).

Embora não seja o objetivo deste estudo, acompanhamos por 70 dias as características que o diabetes causou em 3 das ratas diabéticas não prenhes e que não foram incluídas em nenhum grupo deste estudo. No entanto, observamos a manifestação dos sintomas do diabetes. Uma das características mais aparentes da doença foram as alterações da epiderme, atrofia na produção de pêlos, alterações cutâneas com manchas vermelhas no corpo, opacificação do globo ocular acompanhada por uma suposta perda gradual da acuidade visual.

Provavelmente essa opacificação foi causada por alterações osmóticas conseqüente às flutuações freqüentes da glicemia.(BAKER, 1979) Os pêlos tornaram-se mais finos, descamados e fracos. A diminuição progressiva da irrigação sanguínea da pele pode levar a um grau variável de alterações que modificam a estrutura do tecido epitelial e conjuntivo, sendo esse fato observado quando fazíamos a coleta de sangue e as veias caudais das ratas se tornavam difíceis de ser visualizadas. (ELSNER, 2000).

Uma vez estabelecido o protocolo de indução do diabetes tínhamos como objetivo secundário induzir a prenhez nas ratas diabéticas, que segundo a literatura parece estar reduzida a fertilidade da fêmea em estado hiperglicêmico (FUSISAWA,2004) De fato, em nosso grupo pré-gestacional pudemos evidenciar através da análise descritiva o que diz a literatura a respeito da fertilidade das fêmeas, isso porque em 3 ratas do grupo pré-gestacional não conseguimos induzir a prenhez, sendo estas, desta forma, excluídas do grupo. Já nas 6 ratas do grupo pré-gestacional deste estudo evidenciamos um atraso no acasalamento num tempo médio de até 20 dias para que encontramos zoóide positivo no muco vaginal das ratas, isso quando comparado ao controle que normalmente acontece a cópula 24 horas após a indução do ciclo estral. Na análise comparativa a diferença foi significativa no grupo pré-gestacional e para a correlação com a glicemia houve maior tempo de acasalamento nas ratas com maior glicemia, ou seja, no pré-gestacional. Este achado está de acordo com a literatura onde estudos demonstram que existe uma dificuldade de prenhez em certos animais diabéticos, pois o estado hiperglicêmico pode diminuir a fertilidade e/ou o aceite da cópula por parte da fêmea. Da mesma forma, é

observado que a função sexual das mulheres pode ser afetada pelo Diabetes não tratado. Nesse caso a fertilidade também está reduzida (FUSIJAWA, 2004).

Em relação ao peso corporal, o efeito da interação entre os grupos em relação ao tempo de foi significativa, pois as ratas do grupo se comportaram de maneira distinta. No entanto a comparação entre os grupos não foi significativa pois as ratas do grupo pré-gestacional não estiveram passando da media de 189g para 195 g ao fim da gestação. Nesse grupo observamos sinais visíveis de desidratação. No grupo gestacional ocorreu um maior ganho de peso, semelhante ao controle. No entanto a glicemia influenciou esse ganho de maneira significativa, ou seja, quanto maior ganho maior a glicemia.

Em relação ao tamanho da ninhada não houve diferença entre os grupos embora fosse observado que o grupo pré-gestacional foi o que apresentou em media o menor numero de filhotes. Esse fato ainda que não significativo foi influenciado pela glicemia e quanto maior era a glicemia, menor era o numero de filhotes como foi observado na análise descritiva. Foi observado ainda nesse grupo sinal visível de desidratação e aumento no consumo de água. Estes resultados apóiam a proposta previamente introduzida que em organismos diabéticos antes da prenhez a perda de peso pode estar relacionado com a desidratação diabética associada a descompensação de reserva. O Inverso foi observado no grupo gestacional que frente ao aumento da glicemia era observado ganho de peso tanto quanto normal o peso do grupo controle.

Foi observado através da análise descritiva e comparativa que mudanças no valor glicêmico a partir da fase gestacional produzem efeitos significantes no peso corporal dos neonatos, quando comparado com filhos de ratas sem diabetes. Os resultados do presente estudo demonstrou que há um aumento do peso corporal no grupo gestacional de forma significativa, o qual é classificado na literatura como macrossômico. O Inverso foi observado nos neonatos do grupo pré-gestacional que nasceram com baixo peso corporal, também conhecido com RNBPN, porém nesse grupo e no grupo controle não apresentaram valores significativos na análise comparativa e na correlação com glicemia. Em resumo, o nível de glicemia alterou o resultado de maneira significativa apenas no grupo gestacional.

Estes dados sugerem que os neonatos de mães pré-diabéticas no que diz respeito a etiopatogenia e a etiologia é devido ao hiperinsulinismo fetal secundário aos prolongados estímulos pré-natais às ilhotas de Langherans, como resultado da hiperglicemia materna, que facilmente atravessa a placenta. É bom lembrar que mesmo uma diabética bem controlada pode, intermitentemente, atuar como uma bomba de altos níveis de glicose para o feto (COWETT, 1981). Uma vez ligado ao cordão e conseqüentemente, deixando de receber passivamente glicose através dos vasos funiculares, há uma diminuição de estímulos às células beta das ilhotas de Langherans. Contudo, a normalização da produção de insulina não é tão imediata. Segundo alguns autores, leva aproximadamente de 8 a 24 horas em humanos. (COWETT, 1981; WALD, 1982)

Assim, mesmo nas primeiras horas de vida há uma desproporção entre insulina produzida e glicose sangüínea. A insulina está em níveis mais altos do que nos RN de grávidas não diabéticas: a glicose, além de ser facilmente consumida por aquela tem oferta nula, pela supressão de fonte materna e pelo jejum inicial e rotineiro a que se costuma deixar os RN. No entanto, o que foi observado nos RN pequenos para a idade gestacional é que possivelmente eles não têm armazenamento de glicogênio adequado, outros o têm e que talvez aí estivesse em jogo apenas em defeito enzimático: um retardo desenvolvimento de uma enzima reguladora da gliconeogênese. Uma outra hipótese aventada é um relativo hiperinsulinismo decorrente de uma desproporção entre pancreático adequadamente desenvolvido e tecido muscular e adiposo pobremente desenvolvido ou já consumido pela desnutrição crônica. Há ainda a possibilidade de que o RN desnutrido que encontramos tenha uma certa inabilidade para utilizar o armazenamento miocárdio de glicogênio, durante e imediatamente após o parto. Isso explicaria a maior incidência de baixo peso quando comparados a RN do grupo controle com peso superior.(WALD, 1982)

Em relação ao Peso cardíaco dos neonatos observamos que mudanças no valor glicêmico a partir da fase gestacional produzem efeitos significantes no peso do coração, tanto na análise descritiva, comparativa e correlação foi observado significância apenas no grupo gestacional. Os resultados do presente estudo demonstraram que há um aumento do peso cardíaco neonatal no grupo gestacional, o qual é classificado na literatura como hipertrofia cardíaca ou miocardiopatia do recém-nascido.

De maneira geral, conseguimos mais respostas no grupo gestacional e não no grupo pré-gestacional. A hipótese aventada para esse fato é que no diabetes de curta duração (diabetes gestacional), o recém nascido apresenta um aspecto peculiar, em geral são grandes, acima do peso, é observado hepatoesplenomegalia e cardiomegalia, muitas vezes acompanhado de miocardiopatia cardíaca. Já no recém nascido de longa duração (pré-gestacional) é observado malformações cardíacas difíceis de serem diagnosticadas no início da vida, principalmente defeitos do septo ventricular e no sistema nervoso. O objetivo posterior deste estudo é analisarmos a histologia cardíaca desses grupos e investigarmos a presença e ausência dessas malformações nesses indivíduos.

Em resumo, o rato poderá vir a ser o modelo ideal para o estudo de mecanismos fisiológicos íntimos responsáveis pelas reações locais e gerais, frente ao aumento da glicemia, quer sejam aquele induzido na fase pré-gestacional, quer sejam aqueles induzidos na fase gestacional. . Ainda mais, a partir desses estudos, será possível compreender os mecanismos que levam a macrossomia fetal, hiperinsulinismo e mesmo o número crescente de abortos. A hiperglicemia observada nas ratas pré-gestantes talvez seja o fator patogênético mais importante para entender melhor a patofisiologia da doença. Suas modificações são constantes dinâmicas e dependem de vários estímulos fisiológicos, homeostáticos e da variação glicêmica. É fácil perceber as alterações do volume do coração e do peso corporal dos filhos de mães diabéticas em consequência da expressão quantitativa e qualitativa alterada da matriz extracelular com o aumento de reserva glicêmica por parte da mãe. Até o momento, no entanto, os mecanismos que regulam esse mecanismo fetal são pouco compreendidos.

Tendo em vista o transtorno que o diabetes gestacional pode causar às mulheres e aos seus filhos, principalmente aquelas que tem história pregressa familiar ou sofrem de obesidade, este trabalho visou entender os mecanismos fisiológicos de modo que possa não só contribuir a literatura científica , bem como incentivar novos trabalhos e propostas de tratamento a partir do modelo proposto.

CONCLUSÕES



- 1- Houve diferenças significativas da glicemia entre os grupos, sendo o grupo pré-gestacional com maior glicemia.
- 2- Quanto ao tempo de acasalamento foi observado maior tempo no grupo pré-gestacional frente ao aumento da glicemia
- 3- O Ganho de peso materno foi significativamente maior no grupo gestacional
- 4- O tamanho da ninhada foi menor no grupo pré-gestacional quando comparados ao controle e com o grupo gestacional.
- 5- O peso corporal dos neonatos foi maior no grupo gestacional e menor no grupo pré-gestacional
- 6- Em relação ao peso cardíaco foi maior no grupo gestacional, sendo que esse aumento não foi observado em outro grupo do estudo.
- 7- A correlação da glicemia final foi significativa no grupo gestacional quanto ao peso, tamanho da ninhada, peso corporal neonatal (macrossomia) e hipertrofia cardíaca.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AERTS, L.; HOLEMANS, K.; VAN, A. F.A. Maternal diabetes during pregnancy:consequences for the offspring. **Diabetes Metab Rev**, 6:147-146, 1990.

ARDUINO, F. **Diabetes Mellitus e suas complicações**. Ed. Rio de Janeiro, 1980. p.249-341.v.1

ABSTRACTS OF THE 41ST ANNUAL MEETING OF THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR STUDY OF DIABETES(EASD),10.,2005, Athens. **Diabetology** . Athens,September 2005.15p.

AUGHSTEEN, A.A. An ultrastructural study on the effect of streptozotocin on the islets of langerhans in mice. **J Electron microsc**,49(1):681-90,2000.

BLOOMGARDEN,Z.T.The European Association for the Study of Diabetes.**Diabetes Care**, 28(5):1250-7, 2005.

BAKER,H.J; WEISBROTH,S.H. Taxonomy and genetics. In: Robinson,R. **The laboratory rat**. San Diego :Academic Press editors,1979.p.42.

BECKER,D.J.;PIMSTONE, B.L.; HANSEN,J.D.L.;HENDRICKS,S. Insulin secretion in protein-calorie malnutrition.**Diabetes**,20(1):542-551,1971.

BERTINI, O; CAMANO, A.M; DELASCIO, D. **Diabetes e gravidez**. São Paulo: Sarvier Editora de livros médicos Ltda, 1984.p.89-125.v.1.

BERTRAN, C.; TROWERN, A.R. The maternal diet during pregnancy programs altered expression of the guccorticoid receptor . **Endocrinology**, 142(1)2841-2853,2001.

BOUCINHAS, J.C. **Diabetes e Prenhez – Interações**. Rio de Janeiro, 1987. (Tese – Doutorado-Universidade Federal do Rio de Janeiro).

BURT,R.L. Peripheral utilization of glucose in pregnancy insulin tolerance. **Obstetric Gynecol**, 1:658,1985.

COOK,M.J. **The anatomy of the laboratory mouse**. New York: Ed.Academic Press,1965. p.98-143.v.1

COSMI,E.V. 3-d Utrassound for the diagnostic of fetal growth .**Diab Nutr Metab**, (2): 56,1997.

Centers for disease control and prevention.Rates of cesarean –United states: CDC, 1993.285p.

CHO,N.H.;SILVERMAN,BL. Correlations between the intrauterine metabolic environment and blood pressure in adolescent offspring of diabetes mothers. **The Journal of pediatrics**, 136(1): 587-592,2000.

DRISCOLL,S.C.; WALD,M.K. The pathology of pregnancy complicated by diabetes mellitus .**Med Clin North Amer**,(2):1053- 49,1965.

ERIKSSON,U.J.Diabetes in pregnancy :retard fetal growth, congenital malformations and feto-maternal concentrations of zinc, copper and manganese in the rat. **J Nutr**, (1):447-114,1984.

ELSNER,M.;GULDBAKKE,B. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. **Diabetology**,49(1):1528-33,2000.

FELIG,P.Phisiopatology Diabetes. In:Burrow,G.N. **Medical complications during pregnancy**.Philadelphia: WB Saunders,1981.p.176.

FUJISAWA,Y.;NAKAGAWA,Y.;REN-SHAN,L.;OHZEKI,T.Streptozotocin-induced diabetes in the pregnant rat reduces 11 beta-hydroxysteroid deshydrogenase type 2 expression in placenta and fetal kidney. **Life Sciences**, 75(1):2805-2797,2004.

FEIG,D.S.; PALDA,V.A. Type 2 diabetes in pregnancy: a growing concern. **Lancet**, 18(1):1029-83,2002.

HEINIGER,C.D.;ROCHAT,M.K. Alfa enhances intracellular glucocorticoid availability. **Febs letters**, 507(1): 351-356,2001.

HOSOKAWA,Y.A.; LEAHY, J.L. Mechanism of impaired glucose-potentiated insulin secretion in diabetic 90% pancreatectomy rats. Study using glucagonlike peptide-1.**JClinInvest**,97(1):180-6,1996.

HALES ,C.N. ; BARKER D.J.P. The thrifty phenotype hypothesis.**Br Med Bull**, 60(1):5-20,2001.

HEARD, C.R.;TURNER, M.R. Glucose tolerance and related factors in dogs fed diets of suboptimal protein value.**Diabetes**, 16(2):96-107, 1967.

- KYLE, O.C. Diabetes and pregnancy . **Rev End Supplement Med** ,(1):359-1. 1963.
- KHAIBI, A.; Tang, D. Cardiovascular and renal characteristics responses to acute volume expansion of a rat model of diabetic pregnancy. **Journal of Physiology**, 74(1):2918-2909,2004.
- LAUN, I.C. **Diabetes Gestacional**. Rio de Janeiro: Revinter, 1993.p.05-55.v.1
- LANG,J.;BELLGRAU,D. Animal models of type 1 diabetes: genetics and immunological function. **Adv Exp Med Biol**, 558(1):91-116, 2004.
- LEITER,E.H.; Lee, C.H. Mouse models and the genetics of diabetes: is there evidence for genetic overlap between type 1 and type 2 diabetes. **Diabetes**,(2):151-8,2005.
- LUCA,C.; KOWALSKI,T.J.; ZHANG,Y.;ELMQUIST,J.K.Complete rescue of obesity, diabetes, and infertility in db/db mice by neuron-specific LEPR-B transgenes. **J ClinInvest**,1(12):3484-3493,2005.
- MADSEN,H.;DIZEL,B.Changes in red bloodcel oxygen transport in diabetic pregnancy. **American J Obstetric Gynec**;1: 421-42,1992.
- MERZOUK,H.;MADAMI,S. Time course of changes in serum glucose, insulin, lipids and tissue lipase activities in macrossomic offspring of rats with streptozotocin-induced diabetes. **Clin Sci**, 98(1):21-30,2000.
- MORAN,M. The evolution of the nutritional management of diabetes.**Proc Nutr Soc**. 63(4):615-20, 2004.
- MILLS,J.L, Koop R, Simpson JL, Jovanovic L, Peterson L. Diabetes in early pregnancy study. **N Engl J Med**,318:676-671,1988.
- NATIONAL DIABETES DATA GROUP. Classification and diagnosis diabetes Mellitus and other categories of glucose intolerance. **Diabetes**,28:1057-1039. 1979.
- Ò SULLIVAN,J.B. Gestational diabetes unsuspected , asymptotic diabetes in Pregnancy . **The New England J. Med** ,1:1021-264,1991.
- PINTER, E.; REECE, E.A. Diabetes associated congenital malformations. In:Reece E.A;Donald,R. **Diabetes Mellitus in Pregnancy**. New York, Livingstone;1988. p.205.

PEDERSEN,J.; MOLSTED, P. Prognosis of the outcome of pregnancy in diabetes. **Acta Endoc**, 1:70-50,1965.

PHILIPPS, A.F. Consequence of perturbation of fetal fuels in ovine pregnancy. **Diabetes**,1:35-32,1985.

SVENDSEN,P. Model experimental. In:Arbor,A .**Handbook of laboratory animal science**.London: Academic CRC Press,1994.p.321-17.

THAMOTHARAN,M. Aberrant insulin-induced GLUT4 translocation predicts glucose intolerance in the offspring of a diabetic mother. **American Journal of physiology, endocrinology and metabolism**, 1(4):284,2003.

UTSUNOMIYA,H.;YAMAKAWA,T.;KAMEI,J.;TANAKA,S. Anti-hyperglycemic effects of plum in a rat model of obesity and type 2 diabetes, Wistar fatty rat.**BiomedRes**,26(5):193-200,2005.

XIANG, A.H.; PETERS, R.K. Multiplic metabolic defects during late pregnancy in women at high risk for type diabetes.**Diabetes**.48(1):848-54,1999.

WALD, M.K. Problemas de adaptação metabólica. In: Klaus, A.A. **Alto risco em neonatologia**. Rio de Janeiro: Ed. Interamericana, 1982. p.143.

WHITE,P. Pregnancy and diabetes. **Medical Aspects**. 49:1-1015,1965.

YANG, H.; Wright, J.R. Human B cells are exceedingly resistant to streptozotocin in vivo. **Endocrinology**, 143(1): 2491-5,2002.

ANEXOS



Anexo 1- Dados amostrais e acompanhamento das ratas Wistar durante o período de indução até o dia da cesárea.

Grupo	Rata	Pré Acasalamento		Tempo de acasalamento	Hiperglicemia (Gestação)		Peso/glicemia Cesárea (g-mg/dL)	Ninhada
		Peso (g)	Glicemia (mg/dL)		Valor (mg/dL)	Tempo Gestacional* (dia)		
Gestacional	1	174	75	01	229	16°	269/210	08
	2	185	71	0	253	16°	277/240	11
	3	201	87	02	450	12°	239/420	03
	4	204	78	02	479	12°	231/510	01
	5	198	77	02	467	12°	230/480	01
	6	201	83	02	502	11°	238/500	02
	1	190	330	01	483	0°	210/510	0
	2	240	335	20	415	0°	208/476	3
	3	225	375	20	545	0°	238/600	0
	4	185	292	15	370	0°	289/257	08
	5	136	298	25	394	0°	261/345	03
	6	163	266	28	309	0°	273/243	07
Controle	1	199	65	01	76	10°	299/84	11
	2	191	73	01	90	10°	278/72	07
	3	202	100	01	110	10°	264/100	05
	4	194	86	01	94	10°	274/110	06

Anexo 1- Dados amostrais dos ratos neonatos Wistar no dia da cesárea.

GRUPO	RATA MÃE	PESO CORPO	PESO CORAÇÃO	DIST CORNO
PG	1	-----	-----	0
		Filhote		
	2	F1 2,4904g	0,0244g	E
		F 2 2,3348g	0,0218g	E
		F 3 2,6071g	0,0249g	D
	3	-----	-----	0
	4	F1 1,5829g	0,0095g	D
		F2 2,0456g	0,0100g	D
		F3 1,9873g	0,0159g	D
		F4 2,1500g	0,0119g	D
		F5 2,0072g	0,0136g	D
		F6 2,3297g	0,0124g	E
		F7 2,3297g	0,0127g	E
		F8 1,4718g	0,0092g	E
	5	F1 1,4718g	0,0093g	E
		F2 2,1346g	0,0143g	E
		F3 1,8937g	0,0148g	D
	6			
		F1 2,49048g	0,0245g	D
		F2 2,3348g	0,0231g	D
		F3 2,6071g	0,0248g	D
		F4 2,2975g	0,01798g	D
		F5 2,2337g	0,0199g	E
		F6 3,1763g	0,0301g	E
		F7 3,4323g	0,0312g	E

GRUPO	RATA MÃE	PESO CORPO	PESO CORAÇÃO	DIST CORNO
C	1			
		F1 3,5413g	0,0321g	D
		F2 3,6522g	0,0332g	D
		F3 4,5424g	0,0327g	D
		F4 4,421g	0,0312g	D
		F5 4,218g	0,0314g	D
		F6 5,210g	0,0405g	E
		F7 5,4951g	0,0425g	E
		F8 5,2001g	0,0420g	E
		F9 5,2213g	0,0410g	E
		F10 5,5052g	0,0406g	E
		F11 5,4951g	0,0422g	E
	2	F1 6,7522g	0,0471g	E
		F2 6,5450g	0,0532g	E
		F3 6,4230g	0,0501g	E
		F4 5,203g	0,0410g	D
		F5 4,123g	0,0360g	D
		F6 4,321g	0,0310g	D
		F7 4,436g	0,0326g	D
	3	F1 5,4052g	0,0411g	D
		F2 5,3941g	0,0415g	D
		F3 4,321g	0,0312g	E
		F4 4,215g	0,0321g	E
		F5 3,567g	0,0243g	E
	4	F1 3,1763g	0,0301g	D
		F2 3,4323g	0,0312g	D
		F3 4,4115g	0,0385g	D
		F4 5,4232g	0,0401g	D
		F5 5,2343g	0,0432g	E
		F6 4,2553g	0,0326g	E

GRUPO	RATA MÃE	PESO CORPO	PESO CORAÇÃO	DIST CORNO
GD	1			
		F1 5,4072g	0,0499g	E
		F2 5,5669g	0,0482g	E
		F3 5,3081g	0,0388g	E
		F4 5,6620g	0,0401g	E
		F5 4,2810g	0,0328g	E
		F6 4,1890g	0,0317g	D
		F7 4,7420g	0,0320g	D
		F8 4,5684g	0,0315g	D
	2			
		F1 4,8545g	0,0371g	D
		F2 4,0622g	0,0356g	D
		F3 4,3130g	0,0419g	D
		F4 4,1970g	0,0472g	D
		F5 3,3611g	0,0300g	D
		F6 3,8605g	0,0308g	D
		F7 3,1834g	0,0322g	D
		F8 3,3830g	0,0338g	D
		F9 4,3629	0,0366g	E
		F10 4,0624	0,0373g	E
		F11 4,8360	0,0458g	E
	3			
		F1 5,5052g	0,0434g	D
		F2 5,4012g	0,0389g	D
		F3 5,4951g	0,0420g	E
	4	F1 7,752g	0,0478g	D
	5	F1 6,7223g	0,0454g	D
	6	F1 7,8391g	0,0467g	E
		F2 6,4540g	0,0449g	E