



# UNIVERSIDAD POPULAR AUTONOMA DEL ESTADO DE PUEBLA

Centro Interdisciplinario de Posgrados Investigación y Consultoría

Departamento de Maestrías en Ciencias de la Salud

## **Título de la investigación:**

“Alternativa terapéutica para la neuropatía autonómica cardíaca en un modelo experimental de diabetes”

**Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias de la Salud**

Presenta

Victoria De los santos Munive

**Asesor**

DC. José Gustavo López y López

Revisores

MC. José Fausto Atonal Flores

MC. Fernando Morales Salgado

Puebla, Pue. Julio de 2015.



**UPAEP – Secretaría General**

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyła**

**Tesis Digitales Restricciones de uso:**

**DERECHOS RESERVADOS ©**

**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de textos, imágenes, gráficas, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis se realizó en el laboratorio de Farmacia Clínica de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP.

A mis padres, Domingo De los santos y María del Refugio Munive, por acompañarme de forma incondicional a largo de mi formación académica.

## ÍNDICE

1.Introducción.....	1
1.1. <i>Sistema nervioso autónomo</i> .....	3
1.2. Regulacion extrínseca de la frecuencia cardiaca.....	5
1.2.1. <i>Modulación autonómica de la Frecuencia Cardiaca.</i> ...	7
1.2.2. <i>Regulación autonómica cardiaca y la variabilidad de la frecuencia cardiaca</i>	10
1.2.3. <i>Indicadores de la variabilidad de la frecuencia cardiaca.</i> .....	11
1.3. <i>Diabetes Mellitus</i> .....	17
1.3.1. <i>Costo social de la diabetes Mellitus.</i> .....	18
1.3.2. <i>Neuropatía durante la Diabetes Mellitus.</i> .....	20
1.3.3. <i>Neuropatía autonómica diabética.</i> .....	21
1.3.4. <i>Neuropatía autonómica cardiaca.</i> .....	22
1.3.5. <i>Epidemiología.</i> .....	23
1.3.6. <i>Manifestaciones de la NAC.</i> .....	25
1.3.7. <i>Asociación de la NAC con eventos cardiovasculares.</i> .....	26
1.3.8. <i>Patogenia de la neuropatía autonómica cardiaca.</i> .....	27
1.3.9. <i>Alcances terapéuticos de la neuropatía autonómica cardiaca</i> .....	29
2. Antecedentes .....	32
3. Justificación.....	36
4. Hipótesis.....	38
5. Objetivos.....	39
5.1. Generales.....	39
5.2. Particulares.....	39

<b>6. Material y Métodos.....</b>	<b>40</b>
<b>6.1. Generación del modelo experimental.....</b>	<b>40</b>
<b>6.2 Tratamiento antioxidante.....</b>	<b>42</b>
<b>6.3. Registro de electrocardiograma. ....</b>	<b>41</b>
<b>6.4. Obtención de los parámetros electrocardiográficos. ....</b>	<b>41</b>
<b>6.5. Análisis de la Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca.....</b>	<b>41</b>
<b>7. Resultados.....</b>	<b>44</b>
<b>7.1. Características del modelo de diabetes inducida por estreptozotocina. ....</b>	<b>44</b>
<b>7.2. Parámetros electrocardiográficos. ....</b>	<b>44</b>
<b>7.3. Variabilidad de la frecuencia cardíaca. Dominio del tiempo ....</b>	<b>46</b>
<b>7.4. Dominio de la frecuencia. ....</b>	<b>48</b>
<b>7.5. Análisis no lineal. ....</b>	<b>50</b>
<b>8. Discusión.....</b>	<b>52</b>
<b>9. Conclusión.....</b>	<b>60</b>
<b>10. Bibliografía.....</b>	<b>61</b>

## **1.Introducción**

La función del corazón es contraerse y bombear sangre oxigenada hacia la aorta y sangre desoxigenada hacia la arteria pulmonar. Para lograr este objetivo, un corazón humano debe latir de forma regular y continua durante toda la vida. Los latidos del corazón se originan de la descarga rítmica del nodo seno auricular (NSA). En la ausencia de influencias hormonales o nerviosas extrínsecas, el NSA presenta una frecuencia de alrededor de 100 lpm. La frecuencia y el gasto cardiaco, sin embargo, deben variar en respuesta a las necesidades de las células del cuerpo para oxígeno y nutrientes en diferentes condiciones. Con el fin de responder rápidamente a las necesidades cambiantes de los tejidos del cuerpo, la frecuencia y contractilidad cardiaca son reguladas por el sistema nervioso, hormonas y otros factores.

En ausencia de estímulos externos, el corazón cuenta con un sistema eléctrico y de conducción intrínseco especializado capaz de generar y propagar impulsos eléctricos de manera ordenada por todo el miocardio, provocando su despolarización y por ende su contracción. Esta propiedad cardiaca denominada automatismo, la presentan todas las células cardiacas, aunque de forma normal, las células del NSA son capaces de generar oscilaciones periódicas de su potencial de membrana, por lo que se denominan células "marcapasos" (Mangoni y Nargeot, 2008). El NSA determina el ritmo y frecuencia cardiaca intrínseca debido a que su velocidad de generación y disparo del impulso eléctrico es mayor al del resto de las células cardiacas (von Borell y cols., 2007).

En comparación con el resto del sistema de conducción, el NSA genera la automaticidad intrínseca más rápida, inhibiendo la automaticidad del nodo

auriculoventricular (NAV) y la red de fibras de Purkinje. Sin embargo, en caso de falla del NSA, el NAV puede asumir el papel de marcapasos dominante (Dobrzynski y cols., 2013).

La generación del evento eléctrico en las células marcapasos es debida a la despolarización diastólica, una fase lenta de despolarización espontánea del potencial de acción. Durante esta fase el potencial de membrana se vuelve menos negativo progresivamente hasta que alcanza el umbral para la activación de un nuevo potencial de acción. La longitud del periodo del potencial de acción del NSA determina la frecuencia cardíaca (Mesirca y cols., 2015). A nivel celular, diferentes clases de canales iónicos, contribuyen a la generación y regulación de la automaticidad, pero sus respectivos papeles funcionales e interacciones no están en el alcance de esta tesis.

Finalmente, el potencial de acción generado en el NSA es propagado hacia la aurícula derecha, hacia la aurícula izquierda por el haz de Bachman y hacia el NAV por las vías internodales donde se genera un retraso en la conducción. Posteriormente el potencial de acción será transmitido del NAV hacia la masa ventricular a través del sistema His-Purkinje con lo cual se inducirá la contracción ventricular y eyección sanguínea hacia las arterias. El siguiente ciclo cardiaco estará en función de la velocidad de disparo del NSA, hecho que determinará el valor de la frecuencia cardíaca.

La actividad eléctrica cardíaca se visualiza a través del registro del electrocardiograma (ECG). En un registro de ECG normal, la onda P refleja la despolarización auricular, el complejo QRS refleja la despolarización ventricular y la onda T refleja la repolarización ventricular (Gordan y cols., 2015).

En un sujeto sano la FC en reposo presenta valores de 60-90 latidos/minuto, es decir, valores que difieren de los impuestos por el NSA. Esta diferencia se debe a que el NSA se encuentra bajo la regulación del sistema nervioso autónomo (SNA) a través de la acción conjunta del sistema nervioso parasimpático (SNP) y del sistema nervioso simpático (SNS) (Rajendra y cols., 2006, Gordan y cols., 2015). Por lo tanto, la FC de una persona sana bajo condiciones de reposo representa las interacciones netas entre la regulación parasimpática, la cual reduce la FC y la simpática, la cual la aumenta, con un predominio de la influencia parasimpática (Hainsworth y cols., 1995). El proceso mediante el cual el SNA modula la FC se denomina regulación extrínseca de la frecuencia cardíaca y se pone de manifiesto a través del baroreflejo arterial.

### ***1.1 Sistema nervioso autónomo.***

El sistema nervioso simpático es el componente del SNA que se encarga de controlar la respuesta del cuerpo humano a situaciones de estrés o de emergencia (también conocida como la respuesta de "lucha o huida"), mientras que el sistema nervioso parasimpático es generalmente responsable de la función basal del órgano (Gordan y cols., 2015). A diferencia del sistema nervioso somático, donde una sola neurona originada en la médula espinal normalmente conecta al sistema nervioso central y un músculo esquelético mediante una unión neuromuscular, las vías simpáticas y parasimpáticas se componen de una cadena de dos neuronas; una neurona pre ganglionar y una neurona pos ganglionar.

En el sistema simpático, los nervios se originan de la región toracolumbar de la médula espinal (T1-L2) e irradian hacia los órganos diana. En contraste, los nervios

del sistema parasimpático se originan dentro del mesencéfalo, puente y bulbo raquídeo además de la región sacra (nervios espinales sacros S2-S4) de la médula espinal. Mientras que los nervios simpáticos utilizan una neurona pre ganglionar corta seguida de una neurona pos ganglionar relativamente larga, los nervios parasimpáticos (por ejemplo, el nervio vago, que lleva alrededor del 75 por ciento de todas las fibras parasimpáticas) tienen una neurona pre ganglionar larga, seguida de una neurona pos ganglionar corta (Gordan y cols., 2015).

El SNA, controla la contracción del músculo cardíaco, actividades viscerales y las funciones glandulares del cuerpo; específicamente a nivel cardíaco, regula la frecuencia cardíaca y la presión arterial.

En el sistema cardiovascular, la regulación autonómica ejercida por las neuronas simpáticas y parasimpáticas ejerce efectos antagónicos en el corazón. El sistema nervioso simpático libera noradrenalina (NA), mientras que el sistema nervioso parasimpático libera acetilcolina (ACh). La estimulación simpática aumenta la frecuencia cardíaca y la contractilidad del miocardio. En contraste, la estimulación parasimpática disminuye la frecuencia cardíaca. La mayoría de los vasos sanguíneos, carecen de inervación parasimpática, por lo que una disminución de la estimulación simpática permite la vasodilatación. Durante el reposo, al dormir o bajo tranquilidad emocional, el sistema nervioso parasimpático predomina y controla la frecuencia cardíaca en un ritmo de 60-75 lpm. En un momento dado, el efecto del SNA en el corazón es el saldo neto entre las acciones opuestas de los sistemas simpático y parasimpático.

### ***Regulación Extrínseca de la Frecuencia Cardíaca.***

El sistema cardiovascular se encuentra sujeto a una precisa regulación que refleja la cual busca mantener un valor de presión arterial constante para el suministro adecuado de sangre oxigenada al cerebro y a los distintos tejidos bajo un amplio rango de circunstancias (Purves y cols., 2001). Este proceso se consigue mediante una continua modulación de la FC y del tono vascular a través del SNA, el cual integra información mecánica y química aferente y responde modificando la actividad del SNS y del SNP sobre el corazón y los vasos sanguíneos (Albaghdadi, 2007, Gordan y cols., 2015). El reflejo baroreceptor o baroreflejo desempeña un papel vital en la regulación de la función cardiovascular. La información mecánica proviene de los baroreceptores localizados en el cayado aórtico y en el seno carotideo, los cuales detectan variaciones de la presión arterial. Ante algún cambio de presión, los baroreceptores generan descargas aferentes hacia el sistema nervioso central, el cual responde modificando el tono vascular y la FC mediante respuestas eferentes autonómicas.

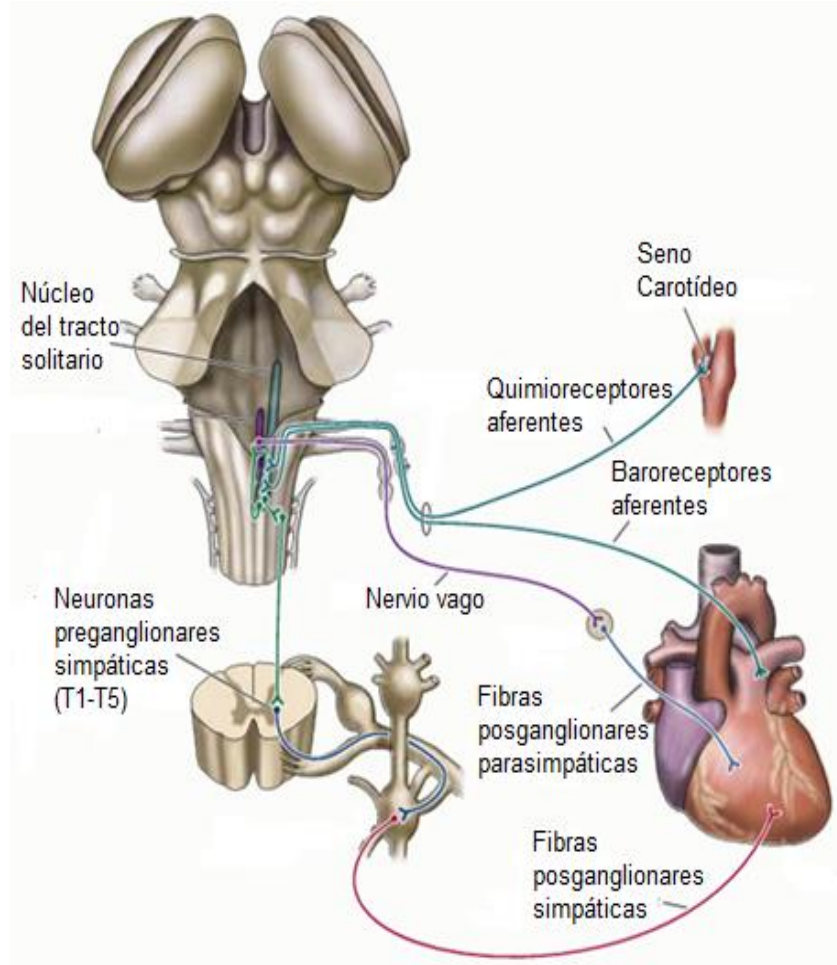
El incremento en la presión arterial sistémica activa a los baroreceptores cuando son distendidos y entonces se incrementa la descarga aferente de potenciales de acción al núcleo ventrolateral rostral del bulbo raquídeo que propaga la señales a través del SNA, ajustando la resistencia periférica total a través de vasodilatación (inhibición simpática) y la reducción de gasto cardíaco mediante regulación inotrópica y cronotrópica negativa del corazón por la activación parasimpática (Gordan y cols., 2015). Caso contrario se presenta ante una caída de la presión arterial, donde los baroreceptores responden reduciendo las descargas aferentes,

a lo cual el SNA responde aumentando la modulación simpática e inhibiendo a la parasimpática con el consiguiente efecto cronotrópico e inotrópico positivo, además del incremento de la resistencia vascular (Lanfranchi y cols., 2002), que dan lugar al retorno de la presión arterial a su valor inicial. Durante una disminución de presión, también se activan baroreceptores localizados dentro de las venas cavas y venas pulmonares. Este sistema de receptores da como resultado la liberación de la hormona antidiurética y la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona. El consiguiente aumento en el volumen de plasma sanguíneo entonces resulta en aumento de la presión arterial. El reflejo también involucra a los receptores de estiramiento situados dentro de las aurículas; como los mecanoreceptores en el arco aórtico y senos carotídeos, los receptores auriculares se activan cuando son distendidos, sin embargo, tras su activación, los receptores en las aurículas aumentan la frecuencia cardíaca a través de mayor activación simpática, por lo tanto aumentando el gasto cardíaco y disminuyendo la presión causada por el volumen de sangre creciente en las aurículas (Hakumaki, 1987).

Por otro lado, los cambios en la  $pO_2$  y en el pH son detectados por los quimiorreceptores localizados principalmente en el seno carotídeo. Ante una situación de hipoxemia, los quimiorreceptores generan descargas aferentes hacia el SNC, el cual responde aumentando el tono simpático en vasos sanguíneos y el tono parasimpático sobre el corazón (Kara y cols., 2003). Entonces, el SNA, en respuesta a la información procedente de los baroreceptores y quimiorreceptores periféricos mantiene la presión sistémica sin fluctuaciones críticas que pudieran resultar en algún evento cardiovascular o cerebrovascular (Lanfranchi y cols., 2002).

En la figura 1, se esquematiza la vía por la cual el SNA regula la FC y la

contractilidad cardiaca en función a la información recaudada a través de los distintos sistemas de receptores.



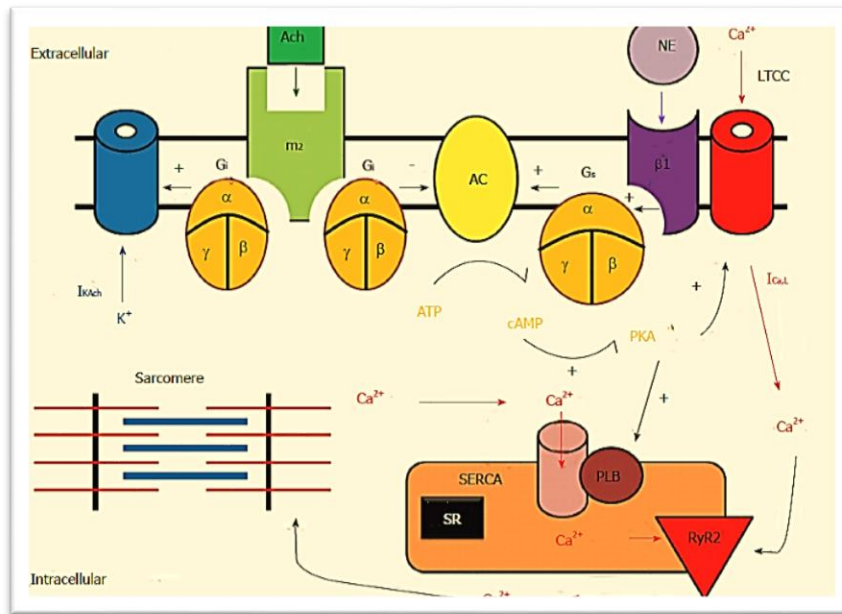
**Figura 1. Regulación extrínseca de la Frecuencia Cardíaca.** La información de los cambios detectados en el sistema de receptores que viaja por vías aferentes, convergen en el núcleo del tracto solitario. La respuesta eferente, alcanza al corazón, determinando los cambios necesarios para mantener la homeostasis del sistema cardiovascular. Modificada de Purves y cols. 2001.

### **1.2.1 Modulación autonómica de la Frecuencia Cardíaca.**

Las fibras del SNS que se dirigen hacia el corazón se originan en el asta intermedio lateral de los segmentos torácicos superiores (T1-T5). Los receptores simpáticos, al igual que los parasimpáticos son conocidos por ser receptores acoplados a

proteínas G (GPCR). En el corazón, la vía de señalización proteína G-AMP<sub>c</sub>-PKA interviene en el control catecolaminérgico sobre la frecuencia y contractilidad cardíaca (Gordan y cols., 2015). La activación eferente del SNS provoca la liberación de NA sobre los receptores  $\beta_1$  localizados en las células marcapasos del NSA. La unión ligando receptor, activa a la proteína G ( $G_s$ ) causando un cambio conformacional en la proteína  $G_s$ , por lo que la subunidad  $\alpha_s$  se une a la adenilato ciclasa. Luego la activación de esta enzima cataliza la conversión de ATP a adenosín monofosfato-3',5'cíclico (AMP<sub>c</sub>). Este segundo mensajero provoca un cambio conformacional de la proteína quinasa A (PKA) con su consiguiente activación, la cual fosforilará canales de  $Ca^{2+}$  tipo L, favoreciendo la corriente entrante en las células marcapaso. Adicionalmente, el AMP<sub>c</sub> se une directamente a canales iónicos responsables de la corriente  $I_f$ , aumentando la frecuencia cardíaca (DiFrancesco y Tortora; Gordan y cols., 2015). Esta serie de eventos aumentan la pendiente de despolarización del potencial de acción del NSA, lo que resulta en el aumento de la velocidad de disparo y por lo tanto de la FC (Triposkiadis y cols., 2009). En la figura 2 se detalla la vía noradrenérgica por la cual se genera un aumento de la FC.

Las fibras del SNP se originan en el núcleo ambiguo, en el núcleo del tracto solitario y en el núcleo dorsal motor. Los efectos inducidos por la estimulación parasimpática sobre el corazón resultan de la activación de los receptores muscarínicos  $M_2$ . La ACh se une a receptores  $M_2$  activando proteínas G inhibitorias ( $G_i$ ) causando un cambio conformacional en la subunidad  $G_i$ , entonces la subunidad  $G_{\alpha i}$  se une e inhibe a la adenilato ciclasa.



**Figura 2. Vía de señalización simpática y parasimpática sobre el NSA.** La activación del receptor  $\beta 1$  por la NA, induce la formación del AMPc a través de la adenilato ciclasa. La activación de la PKA que a su vez fosforila canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L determina el incremento en la corriente entrante de calcio, favoreciendo el aumento de la FC. La activación del receptor M2 por la ACh, disminuye la formación de AMPc; además favorece la activación de la corriente  $I_{K_{Ach}}$ , favoreciendo la hiperpolarización celular; esta vía induce la disminución de la FC. Tomada de Gordan y cols., 2015

La inhibición de la PKA resultante, ejerce un efecto contrario al de la estimulación simpática sobre los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , proteínas y maquinaria contráctil. La activación eferente del nervio vago produce liberación de ACh que al unirse al receptor M2 en el NSA, abre canales de potasio muscarínicos ( $I_{K_{ACh}}$ ) generando una corriente saliente de  $\text{K}^+$  (Krapivinsky y cols., 1995), esta corriente hiperpolarizante se opone a la corriente marcapasos de entrada. Al mismo tiempo se inhibe la vía de señalización del AMP<sub>c</sub>, lo que provoca una disminución de la pendiente de despolarización del potencial de acción del NSA debido al decremento de la entrada

de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. El resultado final es la disminución de la FC (Olshansky y cols., 2008).

### **1.2.2. Regulación autonómica cardíaca y la variabilidad de la frecuencia cardíaca**

En la antigüedad, en la cultura china, se sabía que, cuando un anciano presentaba un pulso muy regular, era inequívoco de que le quedaban pocos días de vida. Hoy en día se consideraría a este cuadro como neuropatía autonómica cardíaca. La frecuencia cardíaca es un evento fisiológico que no presenta un valor fijo o estacionario; más bien, se considera como una señal oscilante dependiente de las interacciones entre las fibras simpáticas y parasimpáticas sobre el marcapasos cardíaco (Kleiger y cols., 2005, Rajendra y cols., 2006). Esta característica se conoce como variabilidad de la frecuencia cardíaca (VFC) y se define como la variación en el intervalo RR entre latidos cardíacos consecutivos. En la época moderna, la relevancia clínica de la VFC fue apreciada por primera vez por Hon y Lee en 1965 al notar que la muerte fetal era precedida por alteraciones en los intervalos entre latidos cardíacos sucesivos. La influencia autónoma sobre la VFC se pone de manifiesto al bloquear tanto la modulación simpática como la parasimpática sobre el marcapaso cardíaco. La administración intravenosa de propanolol seguida por la administración de atropina en sujetos sin ninguna alteración cardíaca, elimina la VFC (Goldberger, 1999). De acuerdo al consenso de Toronto, el análisis de la VFC mediante la variación de los intervalos RR del electrocardiograma es una herramienta no invasiva útil y específica que evalúa el estado general del SNA y es un indicador precoz de la neuropatía autonómica

cardíaca (NAC) con utilidad especial para la identificación de pacientes con riesgo de sufrir eventos cardiovasculares adversos (Billman y cols., 2011).

Para evaluar la presencia de NAC se utilizan al menos 7 parámetros: análisis espectral en bandas de muy baja frecuencia (VLF), de baja frecuencia (LF) y alta frecuencia (HF) y cuatro pruebas propuestas por Ewing, frecuencia cardíaca como respuesta a la maniobra de Valsalva, a la respiración profunda, al cambio de posición a bipedestación y la respuesta de la presión arterial al adquirir la posición de bipedestación (Gutiérrez y cols., 2012; Monteiro y cols., 2014).

El análisis de la VFC se lleva a cabo por diversos métodos, siendo las medidas en el dominio del tiempo y en el dominio de la frecuencia las técnicas más empleadas a nivel clínico y experimental. Asimismo se han venido utilizando medidas no lineales, dada la naturaleza no estacionaria de la FC, entre los que destaca el método no lineal de Poincaré. El análisis espectral y en el dominio del tiempo son muy sensibles ya que los cambios en la VFC pueden ser registrados antes que las alteraciones de los reflejos cardiovasculares sean evidentes.

### **1.2.3. Indicadores de la variabilidad de la frecuencia cardíaca.**

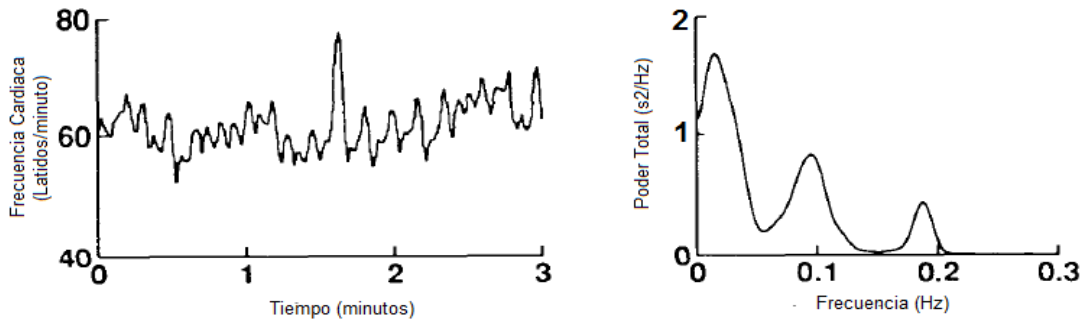
*Análisis en el dominio del tiempo.* A partir de un registro electrocardiográfico continuo con una duración mínima de 5 minutos se obtiene una representación gráfica de la VFC en el dominio del tiempo. En este gráfico denominado tacograma, se grafican los intervalos RR o la FC instantánea en función del tiempo (Figura 3); el gráfico se caracteriza por su dispersión, la cual es directamente proporcional a la VFC (Rodas y cols., 2008). Además del tacograma, se utilizan los índices del dominio del tiempo para la cuantificación de la VFC. Estos indicadores meramente

estadísticos son, la desviación estándar de los intervalos RR (DERR) y la raíz cuadrada de la media de las diferencias entre intervalos RR sucesivos al cuadrado (RMSSD). La DERR refleja todos los componentes responsables de la variabilidad en un periodo, es decir refleja la VFC total; el índice RMSSD, estima las variaciones latido a latido reguladas por la actividad vagal (von Borell et al 2007).

Se debe enfatizar que la varianza se incrementa conforme a la longitud del trazo electrocardiográfico analizado. Por consiguiente, en la práctica, es inapropiado comparar medidas de DERR obtenidas de registros de distinta duración; por ello la duración del registro utilizado para calcular las variables en el dominio del tiempo ha sido estandarizado y dividido en registros de corta duración (5 minutos) y de larga duración (24 horas) (Task Force of The European Society of Cardiology and The North American Society of Pacing and Electrophysiology, 1996).

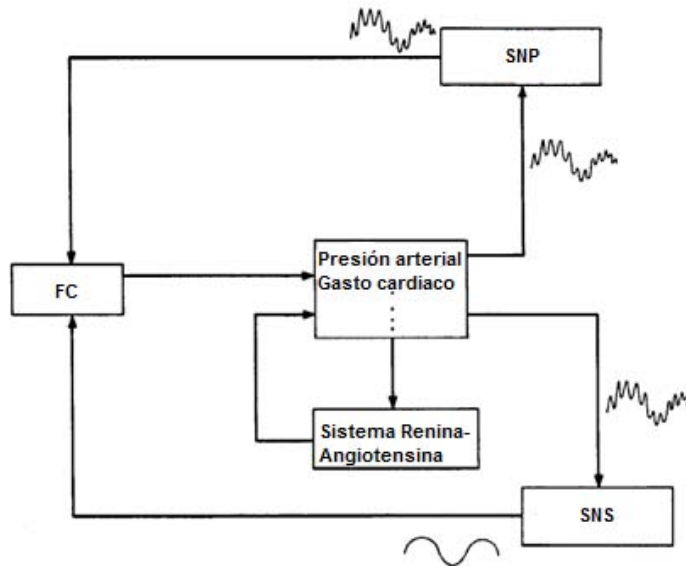
*Análisis en el dominio del tiempo.* El análisis de la VFC en el dominio de la frecuencia consiste en descomponer el tacograma en ondas más simples que lo conforman, las cuales difieren entre sí en cuanto a amplitud y a frecuencia. Con la frecuencia se logra identificar el componente mientras que con la amplitud se cuantifica la contribución de cada componente sobre la FC. Kitney y cols., en 1980 fueron los primeros en utilizar y describir el poder espectral de la FC. Sus estudios fueron llevados al cabo en personas sanas y se lograron identificar tres picos a distintos rangos de frecuencia. El primero se localiza en un rango de frecuencias  $<0.04\text{Hz}$ , el segundo se aprecia cerca de  $0.1\text{Hz}$  y el último se observa en un rango de frecuencias  $>0.15\text{Hz}$  (Figura 3). En el trabajo referido se demuestra además, que

tanto la frecuencia como la amplitud de los picos cambian constantemente en respuesta a perturbaciones hemodinámicas.



**Figura 3. Análisis de la VFC.** A la izquierda, se observa el tacograma de la FC. A la derecha, se observa la descomposición del intervalo RR. Se identifican tres componentes de frecuencia, componente de muy baja frecuencia (0- 0.04Hz), de baja frecuencia (0.05- 0.15Hz) y de alta frecuencia (>0.15Hz). Modificada de Saul y cols., 1990.

La regulación del SNA a través de sus ramas simpáticas y parasimpáticas sobre el NSA determina las fluctuaciones de la FC en distintos rangos de frecuencia. Específicamente, las fluctuaciones de la FC dadas por componentes de alta frecuencia (HF)  $>0.15\text{Hz}$  son mediadas por cambios en la actividad del nervio vago (Akselrod y cols., 1981), mientras que fluctuaciones de la FC dadas por componentes de baja frecuencia (LF)  $<0.15\text{Hz}$  son mediadas por cambios tanto de la actividad simpática como parasimpática, aunque a la fecha aún se discute si este componente representa la influencia simpática exclusivamente (Figura 4). Además las fluctuaciones originadas por componentes de muy baja frecuencia (VLF)  $<0.04\text{Hz}$  son mediadas por cambios en los niveles plasmáticos neurohormonales, como la renina, la angiotensina y hormonas tiroideas (Pagani y cols., 1986).



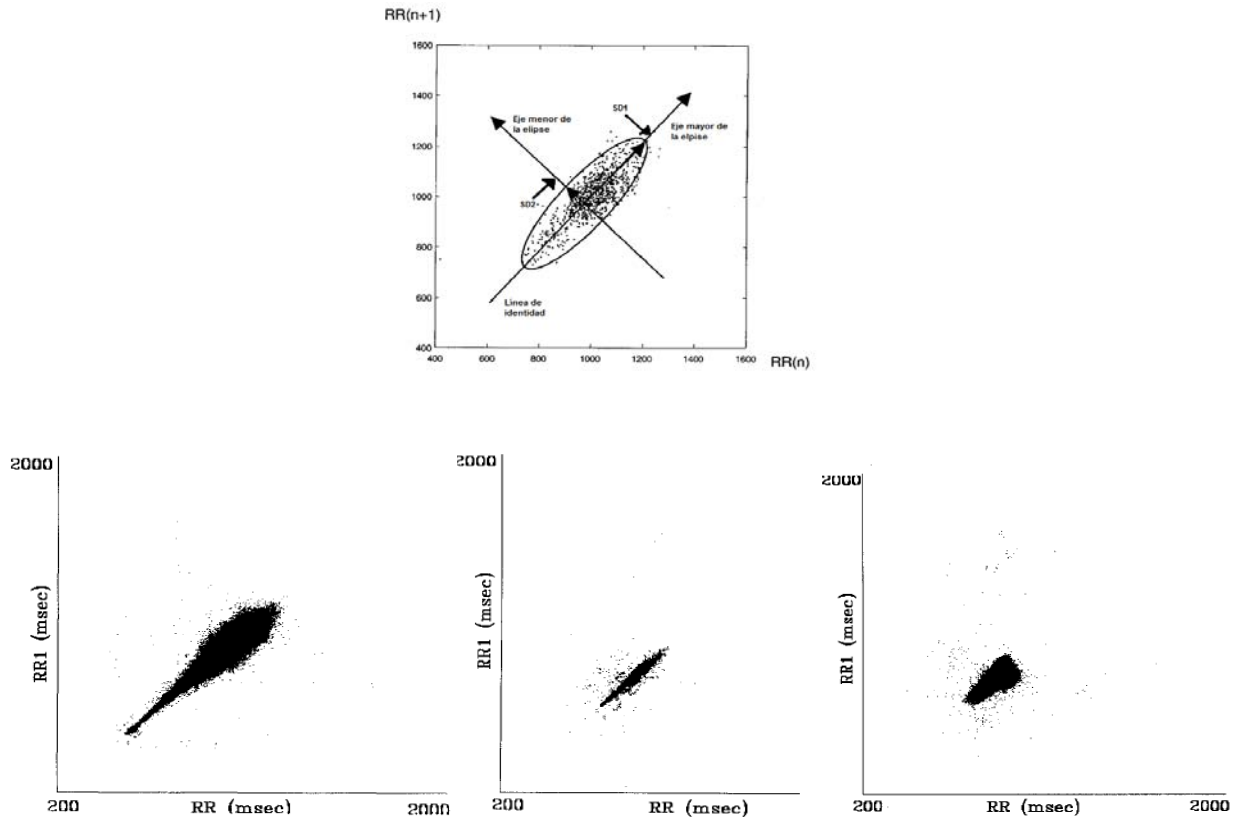
**Figura 4. Regulación autónoma de la Frecuencia Cardíaca.** La información aferente proveniente de los barorreceptores y quimiorreceptores periféricos determina la regulación de la FC a través de componentes de alta frecuencia o mediante ondas de baja frecuencia.

El SNA recibe información de forma constante, a través de una variedad de receptores, de las fluctuaciones en los parámetros cardiovasculares incluyendo la presión arterial, el volumen vascular y la oxigenación. El SNP responde rápidamente mediante componentes dentro de un amplio rango de frecuencias, mientras que la respuesta del SNS se caracteriza por una respuesta tardía y únicamente mediante componentes de baja frecuencia (LF). Por consiguiente, solo el SNP puede mediar la FC por arriba de 0.15Hz, mientras que ambos sistemas pueden mediar fluctuaciones por debajo de 0.15Hz. A pesar que ambos sistemas pueden ser responsables de cambios en LF, si se presenta una disminución de las oscilaciones HF y un aumento de las LF, este aumento se puede atribuir principalmente a la modulación simpática. Los componentes LF y HF son considerados entonces como marcadores de la actividad simpática y parasimpática sobre la función cardíaca

respectivamente (Saul y cols., 1990). Por lo que la relación cuantitativa dada por el cociente LF/HF es un indicador del “balance simpático-vagal” que describe los efectos antagónicos de los sistemas simpático y parasimpático sobre la función cardíaca (Chiou y cols., 1998).

Análisis no lineal de la variabilidad de la frecuencia cardíaca. El método no lineal de Poincaré se grafican cada intervalo RR en función al intervalo RR que le precede. Woo y Zipes, en 1992 fueron los primeros en demostrar la utilidad visual del método no lineal de Poincaré sobre la VFC al notar que la dispersión de los puntos adoptaba patrones distintos entre sujetos sanos y sujetos con insuficiencia cardíaca. En el grupo sano observaron un aumento de la variabilidad latido a latido al tiempo que la dispersión se alargaba, creándose una apariencia característica de un cometa. Mientras que en el grupo con fallo cardíaco avanzado lograron visualizar distintos patrones, principalmente en forma de torpedo y de abanico, los cuales indicaban que para cualquier intervalo RR, el intervalo RR que le sucedía tendía a desviarse mínimamente (Figura 5).

Posteriormente se introdujo la técnica de acoplar una elipse al gráfico de Poincaré con el fin de caracterizar su forma matemáticamente. En referencia al nuevo sistema de ejes que conforman la elipse, la dispersión alrededor del eje mayor se asocia con la VFC a corto plazo, expresada como SD1, mientras que la dispersión alrededor del eje menor de la elipse se asocia a la VFC a largo plazo, expresada como SD2 (Brennan y cols., 2001). Matemáticamente SD1 y SD2 son las desviaciones estándar de la sumatoria de las distancias de todos los puntos con respecto al eje



**Figura 5. Características del análisis no lineal de la VFC.** En los gráficos de Poincaré (A) se observa gura la elipse acoplada al gráfico, donde SD1 representa la VFC a corto plazo y SD2 la VFC a largo plazo. B) Forma de cometa del grafico de Poincaré característico de un sujeto sano. C) y D) se observan gráficos en forma de torpedo y de abanico, respectivamente, ambos de sujetos con insuficiencia cardiaca, se puede observar una variabilidad de la frecuencia cardiaca disminuida en relación a la del sujeto sano. Modificada de Woo y cols.,1992 y Brennan y cols., 2001.

mayor y menor de la elipse respectivamente. También, surgió el concepto de la línea de identidad, la cual corta diagonalmente el gráfico por la mitad y tiene una simple interpretación fisiológica: todos los puntos sobre la línea corresponden a intervalos RR consecutivos de misma duración, todos los puntos por arriba de la línea corresponden a desaceleraciones de la FC y los puntos por debajo de la línea corresponden a aceleraciones de la FC. A partir de la línea de identidad se pueden estimar las contribuciones simpáticas y parasimpáticas para determinar el predominio de alguna de ellas sobre la FC (Piskorski y cols., 2007). Estudios

posteriores demuestran que en sujetos sanos las desaceleraciones de la FC tienen una contribución significativamente mayor que las aceleraciones sobre la VFC a corto plazo (Guzik y cols., 2010). Este hecho se ha definido como asimetría de la frecuencia cardiaca. En la figura 5 se muestra un gráfico de Poincaré característico de un sujeto sano, representándose en el todos los componentes antes mencionados. El gráfico de Poincaré es una herramienta visual y cuantitativa capaz de resumir la VFC latido a latido.

### **1.3 Diabetes Mellitus**

La diabetes mellitus (DM) es un grupo de enfermedades en las cuales una persona presenta un incremento en su glucosa sanguínea debido a que el páncreas no produce suficiente insulina o porque sus células no responden a la insulina que es producida (Chen y cols., 2012). La DM es una epidemia mundial que afecta al menos al 8,3% de la población. Globalmente, más de 366 millones de personas están afectadas por la DM, con una proporción significativa (50%) restante no diagnosticada. Su incidencia incrementa rápidamente y para el 2030, el número estimado es de 522 millones (<http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/the-global-burden>). Adicionalmente, se estima que casi 1 de seis personas se encuentra actualmente en riesgo de desarrollar complicaciones relacionadas con la DM.

En el año 2007, en los EE.UU la población con diabetes diagnosticada oscilaba en aproximadamente 17,5 millones personas, cifra mayor a la estimada en el 2002. El número neto de personas con diabetes diagnosticada en ese país es aproximadamente de 1 millón de personas por año reflejando el aumento de la población que la padece. Un análisis del 2004 al 2006 sugiere que el 5,6% de la

población sin seguridad social ha sido diagnosticado para diabetes, con una tasa de prevalencia de diabetes similar a la población con que cuenta con seguridad social (ADA, 2008). Se estima que la DM es responsable para el 16% de las muertes donde las enfermedades cardiovasculares (excluyendo los eventos cerebro vasculares) son la primera causa de muerte (Kanaya y cols., 2002).

En México, los resultados de la ENSANUT 2012, indican que 6.4 millones de personas refirieron haber sido diagnosticadas con diabetes. La proporción de adultos con diagnóstico previo de diabetes es de 9.2% (ENSA 2000 fue de 4.6%; ENSANUT 2006 fue de 7.3%). Los estados con prevalencias más altas son el Distrito Federal, Nuevo León, Veracruz, Tamaulipas, Durango y San Luis Potosí.

El total de adultos mexicanos con diabetes podría ser el doble (de acuerdo a la evidencia previa sobre el porcentaje de personas con diabetes que no conoce su condición). De la proporción de adultos con diagnóstico previo de diabetes (9.2%), afortunadamente poco más del 80% recibe tratamiento, aunque el 24.7% está en riesgo alto (HbA1c entre 7% y 9%) y 49.8% está en riesgo muy alto (HbA1c > 9%) de padecer las complicaciones propias de la enfermedad (ENSANUT, 2012).

### ***1.3.1. Costo social de la diabetes Mellitus.***

La Organización Mundial de la Salud estima que entre el 4 y 5% de los presupuestos de salud se gastan en las enfermedades relacionadas con la diabetes. Además, se considera que los gastos médicos de una persona con diabetes son de dos a cinco veces más altos que los de una persona sin esta enfermedad.

Los individuos con diabetes presentan mayor número de consultas, ingresos al hospital, ingresos al servicio de urgencias, atención de enfermería, interconsultas y prescripción de medicamentos que los sujetos sin diabetes. Además la población con DM presenta mayor riesgo de presentar síntomas neurológicos, enfermedad vascular periférica, enfermedad cardiovascular, complicaciones renales, oftálmicas y endocrinas (ADA, 2008); entonces, parte de los gastos en la atención de las complicaciones crónicas serán atribuidas a la diabetes. Por otra parte, los costos intangibles, o psicosociales, tienen un gran impacto en la vida de los individuos con diabetes y en sus familias; los cuales incluyen estrés, dolor y ansiedad. La expectativa y calidad de vida pueden resultar muy deterioradas por la diabetes (IDF)

En los Estados Unidos de América, el costo total estimado de la diabetes en el año 2007 fue de 174 billones de dólares, los cuales incluyen 116 billones por sobre costo en gastos médicos y 58 billones en reducción de la productividad nacional. Del total de los gastos, 58 billones de dólares se emplearon para la atención de las complicaciones crónicas atribuidas a la diabetes. En ese país, las personas con diabetes diagnosticada incurren en un gasto promedio de 11744 dólares por año; en general un paciente diabético gasta 2.3 veces más en procesos médicos que lo que gastaría un sujeto sin diabetes. Además el costo se incrementa si se consideran factores relacionados como ausentismo laboral, reducción de la productividad y la discapacidad relacionada con la enfermedad (ADA, 2008).

En nuestro país, la atención de los pacientes con diabetes, representa un gasto de 3,430 millones de dólares al año en su atención y la de sus complicaciones (ENSANUT, 2012).

La mayoría de los pacientes con un curso largo de DM (DM2 principalmente) son diagnosticados con enfermedad coronaria, debido a enfermedad arterial esclerótica. A menudo, el curso de enfermedad coronaria se complica por la combinación de hipertensión, daños a nivel vascular renal, retinopatía y afectación de extremidades inferiores. Las Alteraciones metabólicas en el miocardio están combinadas con la aterosclerosis coronaria precoz; estos cambios en el corazón ocurren por la duración prolongada de la DM entre una edad adulta media y la vejez (afectación de las coronarias, cambios en el miocardio, neuropatía autonómica cardíaca diabética y la enfermedad arterial esclerótica) y son asociados con el término "corazón diabético o cardiomiopatía diabética". Condicionalmente, hay dos formas principales de enfermedad cardíaca en el caso de DM: cardiopatía diabética (génesis no coronaria) y enfermedad isquémica cardíaca. Hay una etapa metabólica (cardiomiopatía); etapa metabólica isquémica; infarto de miocardio; cardioesclerosis coronaria distrófica y neuropatía autonómica cardíaca (NAC) (Serhiyenko y Serhiyenko, 2015).

### ***1.3.2. Neuropatía durante la Diabetes Mellitus.***

Una de las complicaciones crónicas de la DM es la neuropatía. Esta se caracteriza por daño local o difuso sobre fibras nerviosas somáticas y/o autonómicas. Las neuropatías locales son poco comunes, usualmente agudas y auto limitadas, en cambio, las neuropatías difusas son más comunes, crónicas y progresivas. Entre las neuropatías difusas se encuentran la poli neuropatía diabética (PND) y la neuropatía autonómica diabética, las cuales infligen daño progresivo en las

funciones sensitivo-motora y autonómica simpática y/o parasimpática respectivamente (Edwards y cols., 2008).

La PND aparece primeramente en las porciones distales de las extremidades, progresando proximalmente en función a la duración y gravedad de la DM. Los síntomas y signos varían dependiendo del tipo de fibra involucrada. Por ejemplo, la alteración de las fibras largas se relaciona a la incapacidad del sujeto a percibir estímulos ligeros sobre la piel y pierde la capacidad de propiocepción. Mientras que alteraciones en fibras cortas dañan la percepción de temperatura y dolor, llevando al sujeto diabético a parestesias, disestesias y/o dolor neuropático (Edwards y cols., 2008).

### ***1.3.3. Neuropatía autonómica diabética.***

Las manifestaciones tempranas de la neuropatía autonómica diabética tienden a estar asociadas a la amplia disfunción parasimpática y por ende al predominio simpático en los diversos sistemas causando su disfunción. Los sistemas más afectados son el gastrointestinal, el genitourinario y el cardiovascular (Boulton y cols., 2005; Oakley y cols., 2011; Gordan y cols., 2015). Las propiedades más comunes, síntomas y manejo de la disautonomía se muestran en la tabla 1. Los síntomas deben ser explorados cuidadosamente ya que algunos de ellos son potencialmente tratables. Las principales manifestaciones clínicas de la disautonomía incluyen taquicardia en reposo, intolerancia al ejercicio, hipotensión ortostática, estreñimiento, gastroparesia, disfunción eréctil, disfunción sudomotora y deterioro de la función neurovascular. La NAC es la disfunción autonómica más prominente debido a sus consecuencias y la disponibilidad de pruebas directas de

función autonómica cardiovascular (Li y cols., 2014). Una reducida VFC tendiendo a una frecuencia fija es un síntoma inequívoco de NAC.

**Tabla 1. Características de la disautonomía.**

<b>SINTOMAS</b>	<b>TRATAMIENTO</b>
<p><b>CARDIACO</b></p> <p>INTOLERANCIA AL EJERCICIO. HIPOTENSION ORTOSTATICA</p>	<p>IECAS, BETA BLOQUEADORES CLONIDINA, MIDODRINA, OCTREOTIDO</p>
<p><b>GASTROINTESTINAL</b></p> <p>GASTROPARESIS CONSTIPACION DOLOR ABDOMINAL DIARREA</p>	<p>COMIDAS PEQUEÑAS FRECUENTES AGENTES PROCINETICOS FIBRA, RESTRICCION DE GLUTEN Y LACTOSA, ANTIBIOTICOS, CLONIDINA</p>
<p><b>DISFUNCION SEXUAL</b></p> <p>DISFUNCION ERECTIL</p>	<p>TERAPIA SEXUAL, SILDENAFIL,</p>
<p><b>VEJIGA URINARIA</b></p> <p>RETENCION URINARIA INCONTINENCIA</p>	<p>BETANECOL, CATERIZACION INTERMITENTE</p>
<p><b>DISFUNCION SUDOMOTORA</b></p> <p>ANHIDROSIS INTOLERANCIA AL CALOR HIPERHIDROSIS</p>	<p>EMOLIENTES Y LUBRICANTES DE PIEL, ESCOPOLAMINA, TOXINA BOTULINICA, VASODILATADORES</p>

#### **1.3.4. Neuropatía autonómica cardíaca.**

Esta complicación común de la DM es la forma más importante y estudiada de disautonomía diabética que resulta del daño a las fibras nerviosas autónomas que

inervan al corazón y los vasos sanguíneos. De acuerdo a la subcomisión de la NAC del consenso de Toronto sobre la neuropatía diabética (Tesfaye y cols., 2010), la NAC se define como el deterioro del control autonómico cardiovascular de los pacientes con DM establecida tras la exclusión de otras causas (Serhiyenko y Serhiyenko, 2015). Cabe mencionar que esta enfermedad no afecta solo a los pacientes diabéticos sino también a otros grupos de la población como los ancianos, pacientes con hipertensión, síndrome metabólico y desordenes del tejido conectivo. (Garruti y cols., 2012).

La NAC puede limitar la capacidad física y dar origen a anomalías en el control del ritmo cardíaco y dinámica vascular lo que incrementa el riesgo a presentar un evento cardiovascular adverso, ya que es un factor de riesgo independiente para mortalidad cardiovascular tanto en pacientes con DM tipo 1 como en pacientes con DM2; sin embargo, a pesar de que la NAC está asociada al aumento de la morbi-mortalidad cardiovascular, permanece sub diagnosticada.

La presencia de NAC puede estar indicada por taquicardia en reposo, hipotensión ortostática (caída de la presión sistólica mayor a 20 mmHg al ponerse de pie) sin una apropiada respuesta de la frecuencia cardíaca. La NAC en los pacientes con DM2, se caracteriza por lesión de las fibras nerviosas simpáticas y parasimpáticas del SNA y puede ser acompañada de hipotensión postural severa, disminución de la tolerancia al ejercicio y es una de las principales causas de arritmias cardíacas, isquemia coronaria, infarto silente y síndrome de muerte súbita. (Boulton y cols., 2005; Serhiyenko y Serhiyenko, 2015). A la fecha es posible identificar objetivamente etapas tempranas de NAC durante la DM con el uso de indicadores de la función autonómica como la presencia de taquicardia en reposo (Vinik y cols.,

2003; Monteiro y cols., 2014, Tang y cols., 2014) y la disminución de la VFC (Ziegler, 1994, Tang y cols, 2014).

### **1.3.5. Epidemiología.**

La prevalencia de la NAC está aumentando rápidamente en todas las poblaciones a lo largo del mundo, particularmente en los países en vías de desarrollo. La prevalencia reportada de NAC presenta variaciones amplias dependiendo de la cohorte estudiada y del método empleado (Li y cols, 2014; Serhiyenko y Serhiyenko, 2015). En función de los criterios de la metodología y de diagnóstico, la prevalencia de la NAC oscila desde 2.6 hasta 90% en los pacientes con diabetes y su prevalencia aumenta con la edad (alcanza aproximadamente 38% en pacientes entre 40-70 años de edad con DM tipo 1 y 44% en pacientes con DM2) (Bellman, 2014), la duración de la diabetes, y el control glucémico inadecuado y puede estar asociada con la neuropatía periférica (hasta el 62.5% de los casos) y la presencia de otros factores de riesgo cardiovascular, como hipertensión, dislipidemia, nefropatía, retinopatía diabética, rigidez arterial, hipertrofia ventricular izquierda y disfunción diastólica.

Datos del continente asiático, reportan que en pacientes chinos con DM, la prevalencia de NAC es del 30 al 60% (Tang y cols., 2014). Algunos datos reportados en América, muestran que en Perú, la prevalencia de la NAC es del 41% (Aguirre y cols, 2007); en una muestra de pacientes brasileños con DM tipo 1, la prevalencia de NAC reportada fue de 30.5%; la neuropatía fue asociada de forma independiente con la frecuencia cardíaca en reposo y con la retinopatía y nefropatía diabética. Finalmente en México, en el 2012, un ensayo reporto que la NAC tuvo una

prevalencia de 60% entre pacientes con diabetes mellitus. Esta cifra es mayor a la reportada a nivel mundial (Gutierrez y cols., 2012).

La NAC resulta en una alta morbi-mortalidad que puede conducir a la muerte a los pacientes diabéticos. En el 2011, alrededor de 4.6 millones de personas entre 20 y 79 años fallecieron a causa esta patología, representando un 8.2% de la mortalidad mundial (IDF). De acuerdo a estudios epidemiológicos realizados en sujetos con diagnóstico de diabetes, la tasa de mortalidad de 5 años de esta complicación es cinco veces mayor para las personas con NAC que para las personas sin ninguna implicación autonómica cardiovascular (Ziegler, 1999).

Ewing y cols reportaron una tasa de mortalidad (2.5 años) de 27,5% que aumentó a 53% después de 5 años en pacientes diabéticos con pruebas de función autonómica anormal en comparación con una tasa de mortalidad de 15% durante un período de 5 años entre pacientes diabéticos con resultados normales de las pruebas de función autonómica. Cabe señalar que la mitad de las muertes en individuos con pruebas anormales de función autonómica fueron de falla renal y el 29% fueron de muerte súbita. Un estudio de O'Brien reporto una tasa de mortalidad de 5 años del 27% en los pacientes con neuropatía autonómica asintomática en comparación con una tasa de mortalidad de 8% en sujetos con diabetes con pruebas de función autonómica normales (Vinik y cols., 2003)

### **1.3.6. Manifestaciones de la NAC.**

*Intolerancia al ejercicio.* Se ha demostrado que los individuos con NAC presentan disminución de la tolerancia al ejercicio. Estos pacientes presentan una disminución en la respuesta de la frecuencia cardíaca y presión sanguínea durante el ejercicio

(Kahn y cols. 1986). Esta respuesta es acompañada además de disminución del gasto cardiaco, disminución de la fracción de eyección y disfunción sistólica y diastólica (Mythri y Rajeev, 2015). En base a estos datos, se ha sido sugerido que los pacientes diabéticos que tienen probabilidades de tener estrés cardiaco deberían realizarse pruebas antes de adherirse a un programa de ejercicios.

*Hipotensión ortostática.* Esta se define como una caída en la presión sanguínea mayor a 20 mmHg para la presión sistólica o 10 mmHg para la presión diastólica en respuesta a cambios posturales, de decúbito supino a bipedestación (Oduwole, 2014). En pacientes con diabetes, la hipotensión ortostática es generalmente debida al daño de las fibras vasomotoras eferentes simpáticas, particularmente en la vasculatura esplácnica (Low y cols., 1975). La hipotensión postural, en la presencia de pruebas de función autonómica anormal lleva particularmente un pronóstico pobre.

### ***1.3.7. Asociación de la NAC con eventos cardiovasculares.***

Estudios recientes consideran que las microangiopatías están asociadas con las macroangiopatías y pueden tener un papel importante en la patogénesis de estas. Aunque los mecanismos que vinculan a ambas angiopatías, no son claros, algunas evidencias sugieren que los efectos de las microangiopatías pueden estar vinculadas a la aterosclerosis subclínica. En este contexto, la NAC es una determinante de aterosclerosis subclínica durante la DM2. La presencia de NAC está asociada con aterosclerosis de la carótida cuantificada por la presencia de engrosamiento de la pared intima-media y presencia de placa de ateroma independientemente de los factores de riesgo cardiovasculares tradicionales. Los

niveles de engrosamiento de la carótida tienen una correlación positiva con la presencia de NAC, esto es, los niveles de engrosamiento aumentan con la severidad de la NAC (Jung y cols., 2013). Además, se han reportado evidencias de la relación existente entre la NAC y la aparición de eventos cardiovasculares mayores; en concreto, la relación entre la NAC basal y la subsecuente incidencia de un evento cardiovascular fatal o no fatal como un infarto, insuficiencia cardíaca, reanimación de taquicardia ventricular o fibrilación, angina, o la necesidad de revascularización coronaria (Vinik y cols., 2003); sin embargo, el tamaño de la muestra poblacional en los ensayos realizados, hace aun necesario la realización de estudios, que fortalezcan esta asociación.

#### ***1.3.8. Patogenia de la neuropatía autonómica cardíaca.***

Si bien no están claros los mecanismos fisiopatológicos que subyacen a NAC, se sabe que el resultado final es una destrucción progresiva de las fibras nerviosas del sistema nervioso autónomo. Al parecer, se presentan cambios en el estado oxidativo de la neurona, mediados por la hiperglicemia y los mecanismos metabólicos asociados a ella.

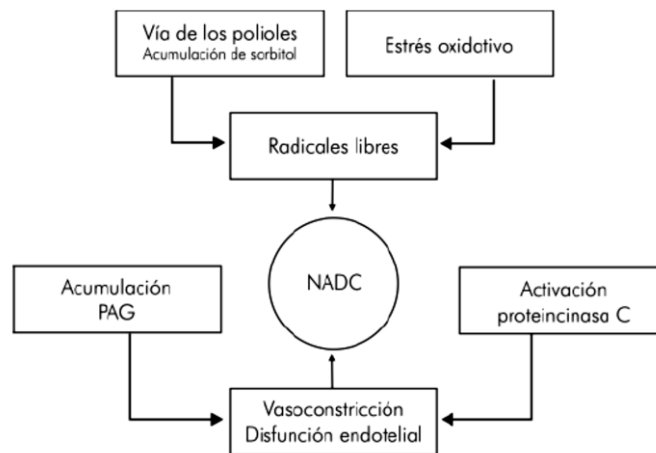
Múltiples factores han sido implicados, entre estos se incluyen, isquemia endoneural, hipoxia, acumulación de proteínas glicosiladas, desordenes en el metabolismo de los polioles, ausencia de factores de crecimiento, también como daño autoinmune. Sin embargo, los desórdenes del metabolismo son considerados el mayor problema (figura 6). La hiperglucemia tiene un efecto perjudicial directo a nivel neuronal, por lo que se ha asociado la patogénesis de la neuropatía con la

activación de vías metabólicas alternas inducidas por el estado hiperglucémico. Entre las principales vías se encuentran la vía aldosa reductasa o vía de los polioles, la acumulación de productos avanzados de glicosilación, la vía de la hexosamina, la sobreexpresión y activación de la proteínquinasa C (PKC) y la activación de la Poli ADP-Ribosa Polimerasa (Edwards *et al.*, 2008). Mientras que cada vía puede ser perjudicial por su cuenta, conjuntamente provocan un desbalance en el estado redox mitocondrial de la célula, lo que conlleva a una formación excesiva de especies reactivas de oxígeno (Vinik *et al.*, 2003). A su vez este incremento del estrés oxidativo dentro de la célula conduce a la expresión de genes involucrados en la promoción de reacciones inflamatorias y disfunción neuronal.

Activación de la vía del poliol: en la vía de los polioles, la glucosa es convertida de manera secuencial en sorbitol (mediante la aldosa reductasa) y posteriormente en fructosa (mediante la sorbitol deshidrogenasa). La aldosa reductasa es activada en presencia de concentraciones elevadas de glucosa; para su funcionamiento requiere como cofactor el NADPH (el cual se convierte en NADH). A su vez, el NADPH es el cofactor necesario en el manejo de los radicales libres de oxígeno, por lo cual el aumento en la síntesis de sorbitol (con el subsiguiente consumo de NADPH) imposibilita el manejo de los radicales libres.

Activación de la proteincinasa C: la hiperglicemia favorece la síntesis de diacilglicerol, el cual es el segundo mensajero en la activación de la proteincinasa C, lo que se traduce en una disminución en los niveles de óxido nítrico. Esto favorece la vasoconstricción y el subsiguiente daño isquémico a nivel del tejido nervioso.

Acumulación de productos avanzados de glicación (PAG): la hiperglicemia favorece la acumulación de PAG, los cuales contribuyen al aumento en los niveles de angiotensina y de proteincinasa C (a través del aumento en la síntesis de ácidos grasos libres); estos dos mecanismos están involucrados en la vasoconstricción y disfunción endotelial.



**Figura 6.** Mecanismos fisiopatológicos involucrados en la neuropatía autonómica cardiovascular.

### **1.3.9. Alcances terapéuticos de la neuropatía autonómica cardíaca**

A la fecha, no existe ningún tratamiento satisfactorio para la ninguna de las entidades de la neuropatía diabética, a excepción de un buen control de la glucemia, el cual retrasa mas no previene la progresión (Van Dam *et al.*, 2013). A pesar de nuevas opciones terapéuticas, la expectativa de vida de los pacientes con DM es inferior en comparación al promedio de la población. La NAC, en las primeras etapas, puede ser subclínica y hasta que la enfermedad progresa, se hace evidente clínicamente. Por lo tanto, el tratamiento eficaz de NAC es particularmente

relevante; el tratamiento de la NAC incluye: dieta equilibrada y actividad física; control estricto de la glucemia; tratamiento de la dislipemia; corrección de las alteraciones metabólicas en el miocardio; prevención y tratamiento de trombosis; uso de inhibidores de la aldosa reductasa; ácido gama linoleico, acetil L-carnitina, antioxidantes (específicamente el ácido alfa lipóico), uso de ácidos de cadena larga poliinsaturados, vasodilatadores, vitamina B1, y amino guanidina, entre otros.

#### Los inhibidores de la aldosa reductasa

A partir de la determinación de NAC por ensayos de 5 pruebas se ha corroborado la utilidad de los inhibidores de la aldosa reductasa. Estos se emplean para enlentecer o revertir la progresión de la NAC especialmente media o asintomática. Una revisión de 10 ensayos clínicos controlados y aleatorizados mostro que los inhibidores de la aldosa reductasa, mejoran al menos 3 de las 5 pruebas de función autonómica, las cuales fueron, el radio 30:15, el cambio de presión sistólica ante el cambio postural, y la relación expiración/inspiración, estos cambios benéficos no se relacionan con la glucemia ya que no hubo cambios en el control glucémico (Hu y cols., 2014).

La presencia de DM, tanto en seres humanos como en modelos animales de experimentación, se asocia con el incremento del estrés oxidativo. La Hiperglucemia conduce a un aumento en el estrés oxidativo y se considera el factor fisiopatológico de las complicaciones micro y macrovasculares. La peroxidación lipídica de las membranas ha sido sugerida como un mecanismo por el cual la isquemia e hipoxia en las fibras periféricas podrían causar neuropatía. Estudios realizados empleando

agentes inhibidores de la peroxidación lipídica y de especies reactivas de oxígeno como el ácido lipóico presentan resultados aún no totalmente satisfactorios. En un grupo de pacientes con neuropatía diabética, el nivel de peroxidación de lípidos, fue menor de forma significativa respecto al grupo que no recibió tratamiento con ácido lipóico (600 mg/día/70 días). Sin embargo en una cohorte de pacientes con diabetes tipo 1 y con NAC moderada, un tratamiento antioxidante con ácido lipóico por 2 años, no impidió la progresión de la NAC, ni se presentaron efectos beneficiosos en la perfusión miocárdica (Pop-Busui y cols., 2013). Por otra parte, en un estudio aleatorizado y controlado, en pacientes con DM1 y NAC, la administración de ácido alfa-lipóico por 600mg/iv/10 días resulto en una mejoría significativa en la NAC. La puntuación en los indicadores de las pruebas de Edwin mejoró de forma significativa en el grupo que recibió tratamiento en relación al grupo que recibió placebo. Estos resultados se han asociado a la disminución del estrés oxidativo inducida por la terapia; la actividad sérica de la SOD, y los niveles de SOD eritrocitaria incrementaron significativamente (Tankova y cols., 2004).

## **2. Antecedentes.**

En el corazón, el desequilibrio autonómico neural se asocia con la señalización anormal de la noradrenalina y/o la acetilcolina, con consecuencias directas en la génesis de mayor heterogeneidad electrofisiológica, aumentando la susceptibilidad a sufrir arritmias ventriculares y muerte súbita cardíaca (Kuehl y Stevens, 2012; Viniky Ziegler, 2007, Xuan y cols., 2015).

Estudios clínicos han demostrado que el componente parasimpático del baroreflejo puede ser deteriorado durante la diabetes, de forma similar a la mayoría de las enfermedades que afectan al sistema cardiovascular (Thayer y Lane, 2007). Además, se ha sugerido que una disminución de la VFC, que es un indicador de la influencia de actividad eferente parasimpática sobre el corazón, puede ser el signo más temprano de la NAC en diabéticos (Chessa y cols., 2002). Desde la década de los 90's una gran cohorte de pacientes con DM tipo 1 y tipo 2 Ziegler y cols., (1993) encontraron una asociación de la diabetes con la disminución en la modulación parasimpática del corazón y un cambio hacia un tono simpático aumentado. Este hecho condujo a la aceptación de la existencia del desequilibrio en la inervación simpático-vagal en el corazón diabético (Shotton y cols., 2003).

Estudios realizados en modelos animales de DM se han conducido en dirección a establecer la relación temporal entre las alteraciones estructurales y funcionales de los nervios autonómicos cardiacos ya que la duración del cuadro diabético impacta de forma directa en el daño de la inervación autonómica cardiaca.

El modelo experimental de rata con DM inducida por STZ, presenta características adecuadas para el estudio de NAC (Howart y cols., 2005; Lin y cols., 2008). Este modelo presenta disminución de la VFC, cambios en las oscilaciones de alta y baja

frecuencia de la frecuencia cardiaca, y desbalance simpático vagal; por lo que se considera como un modelo de estudio para la NAC. Como en el humano esta disautonomía se asocia con daños cardiovasculares, en el modelo animal, la disautonomía presente, precede a la presencia de rigidez arterial, disfunción sistólica y diastólica e hipertrofia cardiaca. (Al-Shafei y cols., Lin y cols., 2008).

En el modelo de rata con diabetes inducida por STZ con 3 meses de evolución, se presenta denervación parasimpática del miocardio distal con daño mínimo del miocardio proximal, mientras que a los 6 meses, se presenta tanto denervación simpática como parasimpática (Xuan y cols., 2015). Esta situación conduce al desequilibrio simpático vagal y un aumento en la inducibilidad de arritmias ventriculares (Xuan y cols., 2015).

En el mismo modelo de estudio, después de 20 días de la administración de STZ, se observa la depleción de las vesículas de neurotransmisores y la degradación de las terminaciones nerviosas parasimpáticas (Sanyal y cols., 2012); después de 2 meses, la respuesta refleja de bradicardia y taquicardia a hipertensión e hipotensión respectivamente, ya se encuentran deteriorados en el animal diabético (Khaliq y cols., 2012). Además, se presenta disminución del poder espectral total y de las oscilaciones de alta frecuencia. Después de 16 semanas de evolución de la DM, se presenta degradación de las terminaciones nerviosas tanto simpáticas como parasimpáticas (Sanyal y cols., 2012).

Estudios realizados en el modelo experimental en cuestión, aportan evidencias que apoyan la hipótesis de que en la DM, el aumento del estrés oxidativo favorece la aparición de NAC. En la rata diabética, la administración de extractos de plantas como la Terminalia arjuna presenta efectos terapéuticos asociados a su naturaleza

antioxidante. La administración, resulta en la mejoría significativa de la bradicardia refleja pero no en la taquicardia refleja. El efecto protector del extracto, es atribuido al mantenimiento de la actividad enzimática antioxidante similar a la observada en ausencia de DM. Sin embargo, este tratamiento antioxidante no presenta mejoría sobre la disminución de peso, frecuencia cardíaca, presión arterial y glucemia elevada registrada en ratas diabéticas (Khaliq y cols., 2013).

El ácido alfa lipóico, un antioxidante previene los cambios en los nervios autónomos inducidos por la DM en el modelo de ratas diabéticas inducida por STZ. El ácido alfa lipóico (80 mg/kg/día) evita la disminución de noradrenalina en el corazón, un indicador de daño de las terminaciones simpáticas. La efectividad del tratamiento de la neuropatía autonómica diabética no se presenta por igual en los nervios autónomos de diversos órganos ya que el efecto del ácido alfa lipóico no se presentan en otras fibras autónomas como las del tracto digestivo o del pene (Shotton, 2003)

Una característica muy importante del modelo estudiado en relación a los daños autonómicos es que la rata con DM, presenta un incremento del estrés oxidativo en el sistema cardiovascular, indicado por el incremento de la expresión de la NADPH oxidasa en aorta (subunidad p22 (phox)), en arteria pulmonar (subunidad p47 (phox)) y en el corazón (subunidad p22 (phox)) (Hink y cols., 2001; López-López 2008; Matsuki y cols., 2013). A nivel vascular, el incremento del estrés oxidativo se ha asociado como un elemento importante para la aparición de disfunción endotelial. A nivel cardíaco, el incremento del estrés oxidativo, se ha relacionado con el daño en las terminaciones simpáticas evaluada por la disminución de la captura de  $^{125}$ metaiodobenzilguanidina, observada en el mismo modelo experimental. La

administración de 10 mg/Kg/día de fluvastatina (un poderoso efecto antioxidante (Suzumura y cols., 2000), favorece la disminución de la expresión de la subunidad p22 (phox) de la NADPH oxidasa (Matsuki y cols., 2010) y la captura normal de I<sup>125</sup>metaiodobenzilguanidina. La disminución del estrés oxidativo atenúa la neuropatía simpática cardíaca inducida por la el cuadro diabético.

Por otra parte, el óxido nítrico (NO) además de participar en la regulación de la presión arterial, también participa en el mantenimiento del tono autonómico cardíaco; el NO inhibe el tono simpático e incrementa la influencia parasimpática (Schultz 2009); la deficiencia de NO produce hipertensión y disfunción autonómica cardíaca a través de un incremento del tono simpático. En modelos animales se ha reportado que la inhibición de la eNOS por administración crónica de L-NAME (50 mg/kg/7días/v.o) produce un incremento de la presión arterial, taquicardia, atenuación del baroreflejo y disminución en los indicadores del dominio de la frecuencia de la VFC. En la rata diabética, el incremento del estrés oxidativo derivado de la producción de aniones superóxido durante el incremento de la expresión de la NADPH oxidasa, conduce a una disminución de la biodisponibilidad del NO (Hink y cols., 2001; López-López 2008; Matsuki y cols., 2013). Estos eventos explican en parte la alteración del control sobre el tono autónomo cardíaco y la aparición de NAC en un estado de alto estrés oxidativo como ocurre durante la diabetes.

### **3. Justificación.**

En el 2011, la federación internacional de la diabetes publicó que alrededor de 4.6 millones de personas entre 20 y 79 años fallecieron a causa de la DM, representando un 8.2% de la mortalidad mundial. Además, la mortalidad por enfermedades cardiovasculares en pacientes con DM tipo 1 se ve incrementada hasta en un 50% por cada unidad de incremento en la hemoglobina glucosilada (Schnell y cols., 2013). La hiperglucemia crónica en la DM tipo 1 y 2 es la causa principal que da lugar a las complicaciones micro y macrovasculares. El daño microvascular afecta principalmente a la retina, riñones y al sistema nervioso autónomo y periférico; el corazón en particular es afectado tanto por micro como por macroangiopatías.

La neuropatía autonómica cardíaca es una de las complicaciones crónicas más comunes de la DM, esta patología se presenta en aproximadamente 20% de los individuos diabéticos y su valor aumenta del 35 a 65% en pacientes con diabetes prolongada (Spallone et al., 2011). La NAC resulta de daño de la inervación cardiovascular simpática y parasimpática y es un factor de riesgo independiente para presentar enfermedades cardiovasculares, entre ellos infarto del miocardio, arritmias ventriculares, evento cerebral vascular y muerte súbita entre otras.

La hiperglucemia induce la sobre producción de superóxido a partir de la activación de rutas alternas de metabolismo de la glucosa. Esta vía es considerada una pieza clave en la patogénesis de las complicaciones diabéticas. Diversas evidencias publicadas apoyan la hipótesis de que el incremento del estrés oxidativo presente en los pacientes diabéticos es el estímulo que da lugar a la neuropatía diabética. En pacientes diabéticos, la concentración de marcadores de estrés oxidativo como el

MDA o productos de la lipoperoxidación lipídica se encuentran incrementados en fibras nerviosas, corazón y vasos sanguíneos incluyendo el lecho pulmonar y se correlacionan con el nivel de daño observado.

El incremento de estrés oxidativo principalmente a partir del incremento del radical superóxido, reduce la biodisponibilidad del óxido nítrico, originando una disminución de la perfusión hacia diversos lechos vasculares (Hink y cols., 2001; López-López 2008; Matsuki y cols., 2013); que podría generar daños por hipoxia e isquemia a las fibras autónomas cardíacas. De acuerdo al consenso de Toronto de 2013, aun no existe un tratamiento adecuado para la NAC, la estrategia recomendada se basa en el cambio de estilo, corrección del nivel de glucemia y el tratamiento para los síntomas de la neuropatía. Además, aunque existen algunas estrategias terapéuticas con la administración de antioxidantes, los resultados aunque prometedores aun no son contundentes y se ven minimizados por los efectos tóxicos colaterales por ejemplo durante la administración de ácido alfa lipóico o estatinas. Por otra parte, algunos agentes que facilitan la vía de señalización del óxido nítrico (como el sildenafil) presentan efecto cardioprotector y mejoran los indicadores de estrés oxidativo por lo que es pertinente realizar estudios que conduzcan a la búsqueda de una alternativa terapéutica antioxidante y que no represente efectos colaterales.

#### **4. Hipótesis**

En el modelo de diabetes mellitus con incremento del estrés oxidativo, el tratamiento con un agente antioxidante previene el desarrollo de neuropatía autonómica cardíaca.

## **5. Objetivos.**

### **5.1 General.**

Evaluar el efecto del tratamiento con un agente antioxidante sobre la cardiopatía autonómica cardiaca en un modelo de rata diabética inducido por estreptozotocina.

### **5.2 Particulares.**

Evaluar los cambios sobre los indicadores de función autónoma cardiaca durante la diabetes mellitus en un modelo de rata diabética.

Evaluar el efecto del ácido ascórbico sobre los indicadores de función autónoma cardiaca durante la diabetes mellitus.

## **6. Material y Método.**

Se emplearon ratas macho de la cepa Sprague-Dawley con un peso de 200 g. adquiridas en el Bioterio "Claude Bernard" de la BUAP. Los animales fueron divididos de forma aleatoria en cuatro grupos de 6 integrantes: el grupo control (CTRL), el grupo diabético (DM), el grupo control con ácido ascórbico (ASC) y el grupo diabético con ácido ascórbico (DM-ASC). Los animales tuvieron acceso a comida y agua ad libitum durante todo el estudio. El uso y cuidado de los animales estuvo regido según la NOM-062-ZOO-1999.

### **6.1 Generación del modelo experimental**

El peso de los roedores y los niveles de glucosa sanguínea fueron cuantificados en el día cero y a las 8 semanas. En el día cero la diabetes fue inducida mediante la administración de STZ por vía intraperitoneal a una dosis única de 50mg/Kg de peso previamente disuelta en una solución buffer citrato pH 4.5. Los grupos CTRL Y CTRL-ASC fueron administrados con vehículo. 72 horas después de la administración se cuantificaron los niveles plasmáticos de glucosa mediante un glucómetro (Contour<sup>®</sup>TS, Bayer). Se empleó una muestra de sangre venosa obtenida por punción de la cola del roedor. Valores de glucosa  $\geq 350$ mg/dL fueron considerados como hiperglucemia (Howarth *et al.*, 2005).

### **6.2 Tratamiento antioxidante**

El tratamiento con ácido ascórbico se inició una vez que los animales presentaron hiperglucemia y se siguió por 8 semanas. La administración se realizó por vía oral empleando una dosis de 2mg/Kg/día.

### **6.3. Registro de electrocardiograma.**

Los animales fueron trasquilados desde la región torácica hasta la región epigástrica donde se colocaron los electrodos de acuerdo a la derivación II del plano frontal (electrodo negativo en la extremidad derecha delantera y el electrodo positivo en la extremidad izquierda trasera). El animal fue colocado en un cepo para roedor. El registro se obtuvo a través de un bioamplificador (BIO Amp CF, ADInstruments). La señal generada fue digitalizada por el equipo Powerlab 4/35 (ADInstruments) y transmitida al software LabChart 7 (ADInstruments) para su captura, almacenamiento y análisis posterior. El registro fue efectuado siempre en un horario de 8-12 am el día previo a la administración de STZ (día cero) y 8 semanas después.

### **6.4. Obtención de los parámetros electrocardiográficos.**

A partir del registro electrocardiográfico se obtuvo de forma manual el intervalo PR, intervalo QRS y el intervalo QT. Los datos fueron obtenidos con ayuda del software LabChart 7 (ADInstruments) y fueron expresados en milisegundos. Para cada caso, se consideró como valor real el promedio de 3 mediciones obtenidas de 3 ciclos consecutivos.

### **6.5. Análisis de la Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca**

El análisis de la VFC fue realizado en el dominio del tiempo, en el dominio de la frecuencia y por el método no lineal de Poincaré. Para este fin, a partir del registro de 60-70 min se seleccionó un periodo central de 5 minutos de cada ECG para su análisis con el software Kubios HRV 2.1 (University of Eastern Finland). Previo al

análisis se eliminaron eventos arrítmicos o intervalos RR con perturbaciones derivados de artefactos mecánicos.

En el análisis en el dominio del tiempo se obtuvo la desviación estándar de los intervalos RR (DERR) y la raíz cuadrada de la media de las diferencias al cuadrado de los intervalos RR adyacentes (RMSSD). Ambos índices fueron expresados en milisegundos.

Para el análisis en el dominio de la frecuencia, se cuantificaron los componentes LF (0.19-0.74Hz) y HF (0.75-2.5Hz) (Aubert y cols., 1999).

Para cada uno de los índices se obtuvo el poder total expresado en % y el poder total expresado en unidades normalizadas (UN). Los porcentajes se calcularon en base a las contribuciones de cada componente con respecto al poder total. Las unidades normalizadas se calcularon en base a la ecuación siguiente:

$$LF \text{ o } HF (un) = \frac{LF \text{ o } HF(\%)}{Poder \text{ total } (\%) - VLF(\%)} \quad (\text{Seyd y cols., 2008}).$$

El cociente LF/HF, indicador del balance simpático vagal, se obtuvo a partir de los valores expresados en unidades normalizadas.

Para el análisis por el método no lineal de Poincaré se obtuvieron los índices SD1 y SD2, los cuales representan la VFC a corto y largo plazo, (Brennan y cols., 2001).

## **6.6. Análisis estadístico.**

Para cada uno de los parámetros, los resultados obtenidos fueron expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media. El contraste entre los grupos fue realizado

mediante una prueba  $t$  de student para datos no pareados y valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados como diferencia estadísticamente significativa.

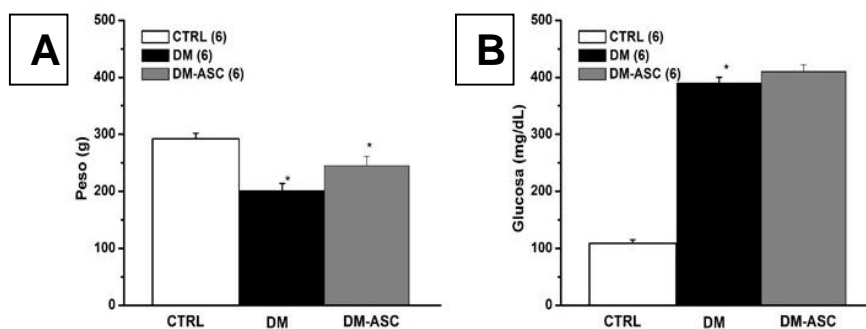
## **7. Resultados.**

### **7.1. Características del modelo de diabetes inducida por estreptozotocina.**

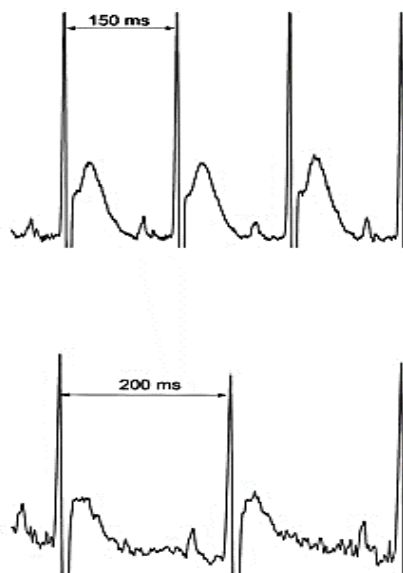
Los pesos de los animales en el día cero fueron similares y no se presentaron diferencia significativa en el promedio entre los grupos estudiados. La inducción y desarrollo de la DM, provoco una disminución significativa en el peso del grupo DM y un incremento significativo en la concentración de glucosa plasmática ( $p < 0.05$ ) en relación al grupo CTRL. Los valores de peso obtenidos fueron  $201 \pm 13$  vs  $292 \pm 11$ g, mientras los valores de glucosa plasmática fueron de  $109 \pm 6$  vs  $390 \pm 10$  mg/dL, en los grupos CTRL y DM respectivamente (Figura 7). El grupo CTRL-ASC, no presento diferencia significativo respecto al grupo CTRL ( $305 \pm 9$  vs  $292 \pm 11$ g.). Sin embargo en el grupo DM-ASC los animales perdieron menos peso que el grupo DM sin tratamiento. Los valores obtenidos fueron  $245 \pm 16$  vs  $292 \pm 11$ g en los grupos DM-ASC y DM respectivamente.

### **7.2. Parámetros electrocardiográficos.**

El desarrollo de la DM modifico la FC cardiaca y duración de los intervalos del electrocardiograma (figura 8). La FC del grupo DM disminuyo de forma significativa respecto al grupo CTRL ( $280 \pm 32$  vs  $404 \pm 20$  lpm, respectivamente). La duración del intervalo PR no presento diferencia significativa en el grupo DM respecto al grupo CTRL ( $60 \pm 3$  vs  $65 \pm 4$ ms). La duración del intervalo QT del grupo DM fue mayor significativamente respecto al grupo CTRL ( $120 \pm 3$  vs  $95 \pm$ ms, respectivamente). No se obtuvo diferencia significativa en la FC ni en los intervalos PR y QT de los grupos CTRL y CTRL-ASC. Sin embargo, el grupo DM-ASC si presento diferencia significativa en el intervalo QT respecto al obtenido en el grupo



**Figura 7. Efecto del ácido ascórbico en el modelo de diabetes inducida por STZ.** Se observa que la DM indujo la disminución de peso (A) y el incremento de glucosa (B). El tratamiento antioxidante no ejerció ningún la glucosa y solo presentó una ligera disminución en la pérdida de peso en el grupo DM-ASC. Los datos se representan como la media  $\pm$  EEM con una  $n=6$  para todos los grupos. \* $p<0.05$ .



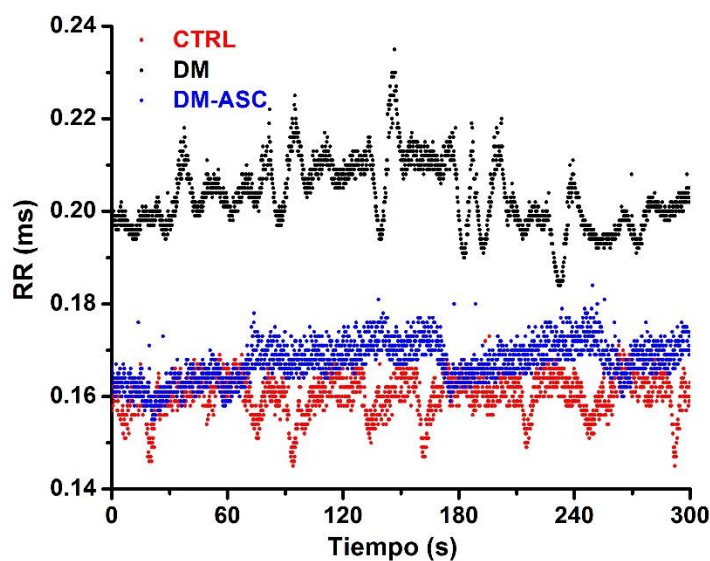
**Figura 8. Efectos de la DM sobre los parámetros electrocardiográficos.** Se observa un registro de ECG obtenido de una rata del grupo CTRL (A) y a partir de un animal del grupo DM. Se observa que la DM favorece el aumento del intervalo RR con la consecuente disminución de frecuencia cardíaca.

DM sin tratamiento ( $107 \pm 2$  vs  $120 \pm 3$  ms, respectivamente). También se observó una tendencia de mejora en la FC del grupo tratado pero no se obtuvo diferencia significativa. La frecuencia cardiaca del grupo DM-ASC fue  $310 \pm 27$  lpm mientras en el grupo DM fue de  $280 \pm 32$  lpm.

Los resultados observados en el grupo diabético indican que el estado hiperglucémico no induce alteraciones en la conducción auriculo ventricular (intervalo PR) y que el principal cambio se presenta en el intervalo QT, asociado al cambio de frecuencia registrado.

### 7.3. Variabilidad de la frecuencia cardiaca. Dominio del tiempo.

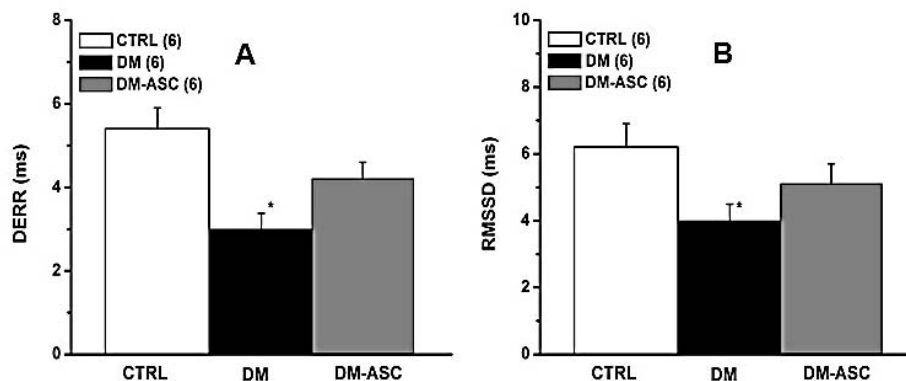
En el tacograma de la figura 9 se grafica la duración de los intervalos RR obtenidos a partir del electrocardiograma en función del tiempo de registro. Se observa en el grupo DM la disminución en los valores del intervalo así como una menor dispersión de los valores del mismo en relación a lo que se observa en el grupo CTRL y en el grupo DM-ASC.



**Figura 9.** Efectos de la DM sobre la variabilidad de la frecuencia cardiaca.

El intervalo RR obtenido en el grupo DM presenta un incremento significativo respecto al valor obtenido en el grupo CTRL (Figura 9). El intervalo RR fue de  $217 \pm 10$  en el grupo DM y  $150 \pm 8$ ms en el grupo CTRL. No se obtuvo diferencia significativa en el intervalo RR entre los grupos CTRL y CTRL-ASC. El tratamiento antioxidante, en el grupo DM-ASC resulto en una disminución del intervalo RR en relación al grupo DM, el cual no recibió tratamiento. En el grupo DM-ASC el intervalo RR fue de  $180 \pm 10$ ms.

Por otra parte, la desviación estándar del intervalo RR (DERR), presento una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en el grupo DM contrastado con el grupo CTRL; es decir, durante la DM la VFC total disminuye como se observa en la fig. 9 y 10. En el grupo DM el valor de DERR fue de  $3 \pm 0.37$ ms mientras en el grupo CTRL fue de  $5.4 \pm 0.5$ ms. No se obtuvo diferencia significativa en la DERR entre los grupos CTRL y CTRL-ASC. El tratamiento antioxidante, en el grupo DM-ASC resulto en un incremento en el valor de la DERR en relación al grupo DM como se observa en la figura 9 y 10. En el grupo DM-ASC el valor de DERR fue  $4.2 \pm 0.4$ ms.



**Figura 10.** Efecto de la DM sobre los indicadores de la VFC en el dominio del tiempo. Tanto DERR como RMSSD, disminuyen durante la DM, ambos muestran una recuperación parcial con el tratamiento antioxidante.

El índice RMSSD también presentó una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en el grupo DM contrastado con el grupo CTRL (Fig.10B). El valor de RMSSD fue de  $4 \pm 0.5$  ms en el grupo DM y  $6.26 \pm 0.7$  ms en el grupo CTRL. No se obtuvo diferencia significativa en el valor de RMSSD entre los grupos CTRL y CTRL-ASC.

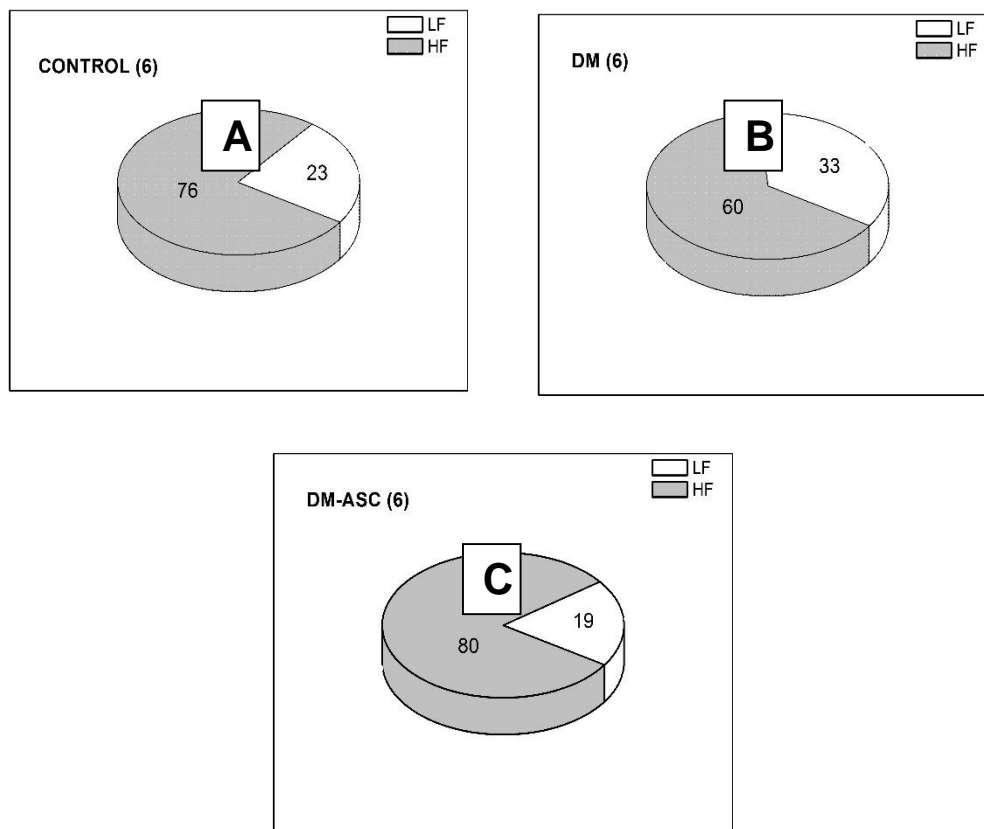
La reducción de ambos índices del análisis de la VFC en el dominio del tiempo sugiere que durante la DM se genera una disminución de la VFC asociada a una disfunción de la modulación parasimpática sobre la función cardíaca. El tratamiento antioxidante, en el grupo DM-ASC resultó en un incremento en el valor de este índice en relación al grupo DM como se observa en la figura 10B. En el grupo DM-ASC el valor de RMSSD fue  $5.1 \pm 0.6$  ms.

#### **7.4. Dominio de la frecuencia.**

La DM indujo la modificación de las oscilaciones de baja (LF) y alta frecuencia (HF), las cuales están asociadas a la influencia del SNS y SNP sobre la FC. En la figura 11 se observa que el índice HF disminuyó de forma significativa ( $p < 0.05$ ) en los animales de grupo DM en comparación con los animales del grupo CTRL. El valor de HF fue de  $60 \pm 2$  en el grupo DM y  $73 \pm 2.5$  en el grupo CTRL (Figura 11.).

El índice LF del grupo DM presentó un incremento significativo en relación al grupo CTRL. El valor de LF fue de  $33 \pm 3$  en el grupo DM y  $23 \pm 2$  en el grupo CTRL (Figura 11). Por otra parte, no se obtuvo diferencia significativa en el valor de LF entre los grupos CTRL y CTRL-ASC. La disminución del indicador HF se relaciona positivamente con la disminución del índice RMSSD del dominio del tiempo, reflejando que durante la DM, existe una alteración del control autonómico sobre el corazón, principalmente del tono parasimpático.

El tratamiento aplicado en el grupo DM-ASC resulto en un efecto protector hacia ambos indicadores de la VFC en el dominio de la frecuencia. Los valores tanto de HF como de LF del grupo DM-ASC son similares a los obtenidos en el grupo CTRL (figura 11).



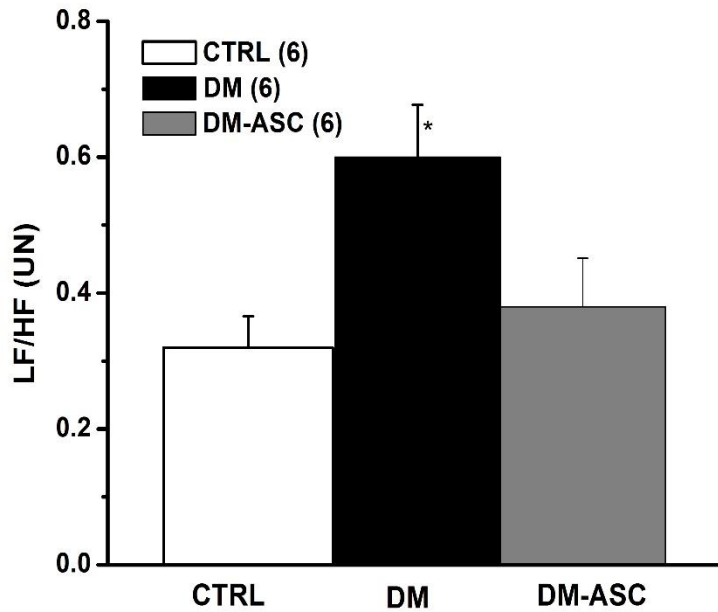
**Figura 11.** Efecto de la DM sobre los indicadores de la VFC en el dominio de la frecuencia. A. Durante la DM, se presenta una disminución del indicador de la regulación parasimpática sobre el corazón (HF). B. El índice LF presenta un incremento en su valor en el grupo DM. C. El tratamiento con ácido ascórbico muestra un efecto protector sobre ambos índices de la función autonómica a nivel cardíaco.

Finalmente, como se esperaba, durante la DM, el cociente LF/HF considerado como el indicador del equilibrio simpático-vagal sobre la función cardiaca, presento un incremento significado respecto al grupo CTRL. El valor obtenido de LF/HF fue de  $0.6 \pm 0.07$  en el grupo DM y  $0.32 \pm 0.04$  en el grupo CTRL (Figura 12). Por otra parte, no se obtuvo diferencia significativa en el valor del cociente entre los grupos CTRL y CTRL-ASC. Estos datos indican que la DM induce la presencia de un desbalance simpático vagal con predominio del tono simpático. Sin embargo, el grupo de animales diabéticos que recibieron tratamiento con ácido ascórbico (DM-ASC), no presentaron el incremento en el cociente, mejor aún el valor obtenido fue similar al encontrado en el grupo control (figura 12). El valor de LF/HL en el grupo DM-ASC fue de  $0.38 \pm 0.07$ .

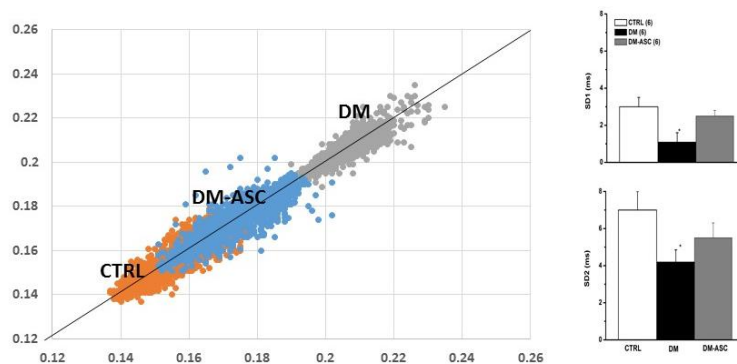
### **7.5. Análisis no lineal.**

En este análisis, a partir de los graficos de Poincare visualmente se apreció una dispersión disminuida de los puntos a lo largo y ancho de la línea de identidad, hecho que esta en congruencia con lo descrito en el tacograma de la figura 9. Los índices cuantitativos obtenidos en este análisis, fueron SD1 y SD2 que reflejan la variabilidad de corto y largo plazo respectivamente. En el grupo DM, se observó una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) tanto en SD1 como en SD2 respecto al grupo CTRL (figura 13). En el grupo CTRL SD1 presento un valor de  $3 \pm 0.5$ ms y en el grupo DM el valor obtenido fue de  $1.10 \pm 0.5$ ms. Por otra parte, en el grupo CTRL SD2 presento un valor de  $7 \pm 1$  ms, mientras en el grupo DM el valor obtenido fue de  $3.2 \pm 0.65$  ms. Es importante recalcar que los datos de SD1 y SD2 en los grupos CTRL y CTRL-ASC no presentaron ninguna diferencia significativa.

Sin embargo, el grupo de animales diabéticos que recibieron tratamiento con ácido ascórbico (DM-ASC), presentaron una mejoría significativa en SD1 y una ligera mejoría (no significativa) en SD2 respecto al grupo DM como se observa en la figura 13.



**Figura 12.** Efectos de la DM sobre el balance simpático vagal. La diabetes, genera un desbalance en el equilibrio simpático vagal, por disminución de la influencia parasimpática sobre el corazón. El tratamiento antioxidante con ácido ascórbico, evita el daño autonómico inducido por la DM.



**Figura 13.** Efecto del tratamiento antioxidante sobre los indicadores del análisis no lineal de la VFC. El grupo CTRL presentó una mayor dispersión de los valores del intervalo RR alrededor de la línea de identidad, a diferencia del grupo DM donde esta se encuentra disminuida. En el panel de la izquierda, se observa el valor de los índices SD1 y SD2 de los grupos estudiados. El grupo DM-ASC presenta una mejoría en la dispersión de los intervalos RR como se observa en el gráfico de poincare y se constata en el valor de SD1. Los datos se representan como la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0.05$ .

## **8. Discusión.**

La presente tesis fue realizada para determinar el efecto del tratamiento con un agente antioxidante sobre la neuropatía autonómica cardíaca en un modelo de diabetes inducida por estreptozotocina. Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento, previene el daño de la regulación autónoma cardíaca durante la DM como lo muestran los indicadores de la variabilidad de la frecuencia cardíaca.

Los resultados obtenidos, han reproducido en primera instancia los efectos inducidos por el cuadro de diabetes, reportados para este modelo experimental. El modelo de rata diabética inducida por STZ es utilizado para investigar las hipótesis fisiológicas y moleculares responsables de las complicaciones cardiovasculares durante la DM. Después de la inducción del estado hiperglucémico en el grupo DM, se presentó una mayor concentración de glucosa plasmática y un peso menor a lo observado en el grupo CTRL. El primero es atribuido a la destrucción selectiva de las células  $\beta$ -pancreáticas mediado por la STZ y con ello la incapacidad de producir insulina. La STZ entra en la célula  $\beta$  mediante un transportador de glucosa (GLUT2) y provoca la alquilación del ADN. El daño del ADN induce la activación de la poli ADP-ribosa polimerasa, agotamiento de celular de NAD<sup>+</sup> y ATP y la formación de radicales superóxido O<sub>2</sub><sup>·</sup>. Además, la STZ libera cantidades tóxicas de óxido nítrico que inhibe la actividad de aconitasa y participa en el daño del ADN. Como resultado de la acción de STZ, las células  $\beta$  se necrosan (Szkudelski, 2001).

La capacidad reducida para transportar y metabolizar a la glucosa para la obtención de energía, permite que las células utilicen a los ácidos grasos como principal fuente de energía, causando el consumo de los depósitos de grasa, pérdida significativa

de peso y reducción en la tasa de ganancia de peso. Es conocido que la diabetes se asocia con deficiencia calórica que se traduce en una reducción marcada en el peso corporal (Dall'Ago y cols., 1997). En este trabajo, no se aplicó insulina a un grupo de animales pero está documentado que la reducción de peso y niveles de glucosa se corrigen después de la terapia de insulina por lo que estos efectos no pueden ser atribuibles a la STZ (Khalid y cols., 2013).

Por otra parte, se ha documentado que las ratas tratadas con STZ presentan hipoinsulinemia, glucosuria, poliuria (de Angelis y cols., 2002), niveles significativamente elevados de colesterol total y triglicéridos en el suero, incremento en la concentración de colesterol LDL y disminución de colesterol HDL. En este trabajo no se evaluaron estos parámetros metabólicos.

Además de las características ya descritas, el mismo modelo experimental presenta diversos signos asociados a la alteración del control autonómico sobre la función cardíaca, entre los que se encuentran la bradicardia, el prolongamiento del intervalo QT y disminución de la VFC (Wei y cols., 2003, Howarth y cols., 2005, VanHoose y cols., 2010). Nosotros, registramos una reducción significativa de la frecuencia cardíaca y de la VFC y un incremento en el intervalo QT del electrocardiograma a las 8 semanas después de la administración de la STZ.

Los mecanismos por los cuales la frecuencia cardíaca disminuye pueden ser debido a la modulación simpático vagal afectada (regulación extrínseca, reportada también en este trabajo) o a defectos en la función del NSA (regulación intrínseca). Varios estudios han reportado disminución en la frecuencia cardíaca en la preparación de corazón aislado de rata tratada con STZ, y la magnitud del cambio es dependiente

del tiempo de tratamiento (De Angelis y cols., 2000; Nemeth y cols., 2001). Una reducción en la frecuencia basal espontánea ha sido reportada en preparaciones superfundidas de aurícula derecha 12 semanas después del tratamiento con STZ, hecho que sugiere una alteración específica a nivel del NSA (Hicks y cols., 1997). Este efecto sobre la frecuencia cardíaca es revertido por el tratamiento con insulina, lo que demuestra que la bradicardia observada es dependiente de la hiperglucemia y no es efecto de la STZ (Li y cols., 1989; Hicks y cols., 1998; Zhang y cols., 2002). Por otra parte el incremento del intervalo QT obtenido durante la diabetes, puede ser atribuido a una prolongación de la duración del potencial de acción (Shimoni y cols., 1994) que se asocia a la disminución de la corriente transitoria de salida acarreada por potasio,  $I_{to1}$  (Shimoni y cols., 1994; 1998).

En este trabajo, la VFC, un índice de modulación simpático vagal de la función cardíaca (Aubert y cols., 1999; Howart y cols., 2005) disminuyó después del tratamiento con STZ; indicando entonces la presencia de NAC. Al realizar el análisis en el dominio del tiempo se obtuvo que los índices DERR y RMSSD disminuyeron significativamente en el grupo diabético tras la administración de STZ. La modificación del primer índice refleja únicamente la disminución de la variación del periodo de tiempo entre latidos cardíacos consecutivos; sin embargo, la disminución del índice RMSSD apunta a la posibilidad de que esta disminución de la variabilidad se encuentre asociada a una alteración de la actividad parasimpática sobre la FC (Von Borell y cols., 2007). En el grupo DM-ASC se obtuvo que el índice RMSSD, que refleja el tono vagal, presentó un incremento después del tratamiento, la misma tendencia mostró la DERR. El indicador RMSSD también se correlaciona con las oscilaciones de alta frecuencia HF, reflejando la modulación parasimpática (Cowan,

1995). Por lo tanto, el análisis de la VFC en el dominio del tiempo mostró mayor actividad parasimpática en los animales diabéticos con tratamiento antioxidante que los animales diabéticos sin tratamiento. Los índices del dominio del tiempo de la VFC no son considerados específicos ya que son meramente estadísticos, por lo que solo se puede expresar que se detectó una anormalidad de la regulación autonómica cardíaca más no se le puede atribuir a cambios específicos de la actividad simpática o parasimpática (Rodas y cols., 2008). Es por ello la importancia entonces del análisis de la VFC en el dominio de la frecuencia.

El componente de HF de la VFC se considera como el indicador del control vagal sobre la frecuencia cardíaca (Park y Watanuki, 2005). Algunos autores han sugerido que el componente LF es un marcador cuantitativo de la modulación simpática (Goit y cols., 2014) y otros que es un marcador de modulación tanto simpático como de la vagal; por lo tanto, es indebido utilizarlo como marcador específico de alguno de los sistemas mencionados. La relación LF/HF refleja el equilibrio simpático vagal (Montano y cols., 1994).

En este trabajo, el análisis espectral mostro un aumento en el poder de LF, y una reducción en el poder de HF en el grupo de animales DM en comparación con los animales del grupo CTRL. La relación LF/HF aumento de forma significativa a las 8 semanas del inicio de la diabetes; este resultado se debe principalmente a la reducción en el poder de HF; esta reducción sugiere una depresión de la regulación parasimpática sobre la frecuencia cardíaca. El incremento en el componente LF es difícil de atribuir a un cambio específico sobre una de las ramas autónomas ya que este componente parece ser una complicada mezcla de influencias simpáticas y vágales. El tratamiento antioxidante en el grupo DM-ASC muestra la ausencia de

daño en la balance simpático vagal, como lo ilustran los valores obtenidos en los indicadores HF y LF.

A partir del análisis de los graficas de Poincaré, se observó que el grupo diabético presentó un menor número de desaceleraciones cardiacas que orientan a un predominio del SNS durante la DM, caso contrario al predominio del SNP observado en el grupo CTRL. Estos sucesos han sido observados y cuantificados por Guzik en el 2010; sin embargo en el presente trabajo dichas contribuciones no se pudieron cuantificar, por lo tanto las contribuciones parasimpáticas y simpáticas en los grupos diabético y control solo quedan determinadas cualitativamente. El tratamiento con ácido ascórbico al grupo de animales diabéticos, resulto en un incremento de la dispersión de los intervalos RR, de hecho la nube de puntos tiende a parecer a la obtenida en el grupo CTRL. El índice SD1, asociado a la VFC a corto plazo, se vio reducido significativamente en el grupo diabético al compararse con el grupo control, tal y como se ha reportado (Contreras *et al.*, 2007; Guzik *et al.*, 2010). Por otra parte, el tratamiento antioxidante favoreció el incremento en el valor del índice SD1 en los animales del grupo DM, mientras que SD2 no fue afectado significativamente después del tratamiento. SD1, que refleja el nivel de VFC a corto plazo, es equivalente a RMSSD; mientras que el índice SD2, que refleja el nivel de VFC a largo plazo, es equivalente a DERR (Brennan y cols., 2002). Por lo tanto, también se muestra una mayor influencia vagal en los animales diabéticos con tratamiento antioxidante que en los animales sin tratamiento (Goit y cols., 2014). Los resultados observados por el análisis no lineal de la VFC se relacionan positivamente con los obtenidos en el dominio del tiempo y de la frecuencia.

Durante la hiperglucemia crónica, el metabolismo de la glucosa resulta en la generación de radicales libres. En el modelo de rata con DM inducida por STZ se observa un incremento de indicadores de estrés oxidativo como el malonaldehído (MDA) y hidroxialquenos. El incremento de los niveles de radicales libres del superóxido y peróxido de hidrógeno es perjudicial y tiene un efecto neurotóxico directo (Ziegler y cols., 2004)]. Algunos agentes antioxidantes (como el ácido lipóico y algunas estatinas) reducen la formación de radicales libres, presentando resultados positivos al disminuir la progresión de la NAC cuando se administra durante la diabetes; sin embargo, se ha reportado que causan efectos adversos como toxicidad muscular, incluyendo miopatía y rhabdomiólisis (Gotto, 2006); por lo que el tratamiento con un agente antioxidante e inocuo es una propuesta que favorecería la protección del daño de las fibras autónomas cardíacas.

Aunque la patogenia de la NAC es multifactorial, una hipótesis plantea que las neuronas autónomas presentan daños a causa de la disminución del flujo sanguíneo derivado del incremento del tono vascular inducido por la disminución del efecto relajante mediado por el óxido nítrico, ya que en la DM, el incremento del estrés oxidativo, disminuye la biodisponibilidad del NO. Entonces el ácido ascórbico al neutralizar el  $O_2\cdot^-$ , evita la disminución de la biodisponibilidad del óxido nítrico y la disfunción endotelial resultante; esto evitaría el daño isquémico de las neuronas autónomas. Recordemos que durante la DM la biodisponibilidad del NO se encuentra disminuida por un aumento de  $O_2\cdot^-$  (Hink y cols., 2001; López-López 2008; Matsuki y cols., 2013), lo que induce disfunción vascular y con ello menor perfusión a los distintos tejidos, incluyendo el sistema nervioso.

El ácido ascórbico, un agente inocuo, actúa como antioxidante debido a su habilidad para reaccionar con radicales libres, experimentando la oxidación de un solo electrón, para producir el radical ascórbico. Por lo tanto el ácido ascórbico puede reducir la toxicidad, de especies reactivas al oxígeno como el anión superóxido  $O_2^{\cdot-}$  y el radical hidroxilo, así como los oxo radicales orgánicos  $RO_2^{\cdot}$  y nitrógeno ( $NO_2^{\cdot}$ ). Entonces si durante la DM el incremento de la expresión de NADPH oxidasa conduce al incremento de la producción de  $O_2^{\cdot-}$  (Hink y cols., 2001; López-López 2008; Matsuki y cols., 2013), el ácido ascórbico al reaccionar con el disminuye su concentración y con ello el daño de las fibras autónomas evitando así la presencia de neuropatía autonómica cardíaca.

Entonces si la neuropatía diabética se origina por el daño neural causado por procesos isquémicos, inflamatorios y por la expresión de vías de señalización que conducen a la muerte celular, todas ellas dependientes al aumento de especies reactivas al oxígeno durante la DM, la administración de ácido ascórbico prevendría el daño neural a través de la neutralización de la generación de  $O_2^{\cdot-}$ .

Nuestros resultados muestran que el tratamiento con ácido ascórbico previene la presencia de NAC posiblemente por la neutralización de los radicales libres producidos en exceso durante la hiperglucemia; sin embargo, una debilidad del presente trabajo es que no se determinaron los niveles séricos de marcadores de estrés oxidativo, ni la actividad del sistema antioxidante, es decir, GSH, SOD y catalasa. El equilibrio alterado de las enzimas antioxidantes, causado por la disminución de la actividad de catalasa, SOD y GSH puede ser el responsable de la deficiencia en la defensa antioxidante contra el daño mediado por radicales libres. (Parveen y cols., 2011). El tratamiento con ácido ascórbico pudo ayudar al

mantenimiento de la actividad de enzimas antioxidantes y así disminuir la concentración de radicales libres generados durante la diabetes. Relacionando los resultados obtenidos en el dominio del tiempo, en el dominio de la frecuencia y por el método no lineal se puede argumentar que en el modelo de rata diabética inducida por STZ se presenta NAC debida a la disfunción parasimpática y que este efecto es prevenido por el tratamiento con ácido ascórbico.

## **9. Conclusión.**

El tratamiento con ácido ascórbico por 8 semanas en el modelo de rata con diabetes inducida por STZ previene la aparición de neuropatía autonómica cardíaca evaluada por los cambios en la VFC, un indicador de función del sistema nervioso autónomo.

## 10. Bibliografía.

**Akselrod S, Gordon D, Ubel FA, Shannon D, Barger AC, Cohen RJ. (1981).**

Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat to beat cardiovascular control. *Science*; 213: 220-222.

**Albaghdadi M.** Baroreflex control of long-term arterial pressure. (2007). *Rev Bras Hipertens*; 14: 212-225.

**American Diabetes Association (2012).** Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*; 35: S64-S71.

**Aubert AE, Ramaekers D, Beckers F, Breem R, Deneff C, Van de Werf F, Ector H. (1999).** The analysis of heart rate variability in unrestrained rats. Validation of method and results; 60(3): 197-213.

**Billman GE. (2011).** Heart rate variability- a historical perspective. *FPHYS*; 2: 86.

**Brennan M, Palaniswami M, Kamen P (2001).** Do existing measures of Poincaré plot geometry reflect nonlinear features of heart rate variability? *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 48: 1342–1347.

**Brennan M, Palaniswami M, Kamen P. (2002).** Poincare plot interpretation using a physiological model of HRV based on a network of oscillators. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 283: H1873–H1886.

**Chiou CW, Zipes DP (1998).** Selective Vagal Denervation of the Atria Eliminates Heart Rate Variability and Baroreflex Sensitivity While Preserving Ventricular Innervation. *Circulation*; 98; 360-368.

**Cowan MJ. (1995).** Measurement of heart rate variability. *West J Nurs Res*; 17: 32–48.

creased exercise heart rate in diabetic subjects with cardiac autonomic neuropathy. *Diabetes Care* 9:389–394, 1986.

**Dall’Ago, P., Fernandes, T. G., Machado, U. F., Bello’, A. A., & Irigoyen, M. C. (1997).** Baroreflex and chemoreflex dysfunction in Streptozotocin-diabetic rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30, 119–124.

**De Angelis, K., Schaan, B. D., Maeda, C. Y., Dall’Ago, P., Wichí, R. B., & Irigoyen, M. C. (2002).** Cardiovascular control in experimental diabetes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35, 1091–1100.

**Edwards JL, Vincent AM, Cheng HT and Feldman EL (2008).** Diabetic neuropathy: Mechanisms to management. *Pharmacology and Therapeutics*; 120: 1-34.

**Ewing DJ, Campbell IW, Clarke BF. (1980).** The natural history of diabetic autonomic neuropathy. *Q J Med* 49:95–108.

**G. Garruti, F. Giampetruzzi, M. G. Vita. (2012).** “Links between metabolic syndrome and cardiovascular autonomic dysfunction,” *Experimental Diabetes Research*. 2012: 2012-2019.

**Giudice, P.L., Careddu, A., Magni, G., Quagliata, T., Pacifici, L., & Carminati, P. (2002).** Autonomic neuropathy in streptozotocin diabetic rats: effect of acetyl-L-carnitine. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 56, pp.173–180.

**Giudice, P.L., Careddu, A., Magni, G., Quagliata, T., Pacifici, L., & Carminati, P. (2002).** Autonomic neuropathy in streptozotocin diabetic rats: effect of acetyl-L-carnitine. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 56, pp.173–180.

**Goldberger JJ. Sympathovagal balance: how should we measure it?. (1999).** *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 276: H1273-H1280.

**Gordan, R., Gwathmey, J.K., & Xie, L-H. (2015).** Autonomic and endocrine control of cardiovascular function. *World J Cardiol*, 7, pp.204-214.

**Gotto, A. M. (2006).** Statins, cardiovascular disease, and drug safety. *American Journal of Cardiology*, 97(8A), 3C–5C.

**Gutiérrez, A.J., Montes, M.L., & Jiménez J.H. (2012).** Prevalencia de neuropatía autonómica cardiovascular en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y estandarización en población mexicana por medio de la variabilidad de la frecuencia cardiaca. *Revista Mexicana de Medicina Física y Rehabilitación*, 24, pp.45-55.

**Guzik P, Piskorski J, Contreras P and Migliaro E (2010).** Asymmetrical properties of heart rate variability in type 1 diabetes. *Clin Auton Res*. 20: 255-257.

**Hainsworth R (1995).** The control and physiological importance of heart rate. *Futura Publ Comp*: 3–19.

**Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaiss F, Stahl RA, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K (2001).** Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res*. 88: 14-22.

**Hon EH and Lee ST (1985).** Electronic evaluations of fetal heart rate patterns preceding fetal death. *Am.J.Obset Gynecol.* 87: 814–826.

**Howarth FC, Jacobson M, Shafiullah M, Adeghate E (2005).** Long-term effects of streptozotocin-induced diabetes on the electrocardiogram, physical activity and body temperature in rats. *Exp Physiol.* 90: 827-835.

**Howarth, F.C., Jacobson, M., Naseer, O., & Adeghate, E. (2005).** Short-term effects of streptozotocin-induced diabetes on the electrocardiogram, physical activity and body temperature in rats. *Experimental Physiology*, 90, pp.237-245.

**Kanaya AM, Grady D, Barrett-Connor E. (2002).** Explaining the sex difference in coronary heart disease mortality among patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. *Arch Intern Med* 162:1737–1745.

**Kara T, Narkiewicz, Somers VK (2003).** Chemoreflexes-physiology and clinical implications. *Acta Physiol Scand.* 177: 377-384.

**Khaliq, F., Parveen, A., Singh S., Hussain, M.E., & Fahim, M. (2012).** Terminalia arjuna Improves Cardiovascular Autonomic Neuropathy in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Cardiovasc Toxicol*, 13, pp.68–76.

**Khaliq, F., Parveen, A., Singh, S., Hussain, M.E., & Fahim, M. (2013).** Terminalia arjuna Improves Cardiovascular Autonomic Neuropathy in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Cardiovasc Toxicol*, 13, pp.68–76.

**Kitney RI, Rompelman O. the study of heart rate variability (1980).** Oxford: Clarendon.59-107.

**Kleiger RE, Stein PK, Bigger JT (2005).** Heart rate variability: Measurements and clinical utility. *A.N.E.*10: 88-101.

**Kumar, R., Hari, B., Khadka, R., Kumar, R., & Kumar, M. (2014).** Mild-to-moderate intensity exercise improves cardiac autonomic drive in type 2 diabetes. *Journal Diabetes Invest*, 5, pp.722–727.

**Kurata, C., Okayama, K., Wakabayashi, Y., Shouda, S., Mikami, T., Tawarahara, K., & Tsuyoshi Sugiyama, T. (1997).** Cardiac Sympathetic Neuropathy and Effects of Aldo se Reductase Inhibitor in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *The Journal Of Nuclear Medicine*, 38, pp.1677-1680.

**Kurata, C., Okayama, K., Wakabayashi, Y., Shouda, S., Mikami, T., Tawarahar, K., & Sugiyama T. (1997).** Cardiac Sympathetic Neuropathy and Effects of Aldo se Reductase Inhibitor in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *The Journal Of Nuclear Medicine*, 38, pp.1677-1680.

**L. Chen, D. J. Magliano, and P. Z. Zimmet.** “The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus—present and future perspectives,” *Nature Reviews Endocrinology*, 8 (4), pp. 228–236.

**Lanfranchi P, Virend KS (2002).** Arterial baroreflex function and cardiovascular variability: interactions and implications. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 283: R815–R826.

**Lin, Y.D., Hsu, K.L., Wu, E.T., Tsai, M.S., Wang, C.H., Chang, C.Y., & Chang K.C. (2008).** Autonomic neuropathy precedes cardiovascular dysfunction in rats with diabetes. *European Journal of Clinical Investigation*, 38, pp.607-614.

**Lin, Y-D., Hsu, K-L., Wu, E-T., Tsai, M-S., Wang, C-H., Chang, C-Y., & Chang, K-C. (2008).** Autonomic neuropathy precedes cardiovascular dysfunction in rats with diabetes. *European Journal of Clinical Investigation*, 38, pp.607–614.

**López-López JG, Moral-Sanz J, Frazziano G, Gomez-Villalobos MJ, Flores-Hernandez J, Monjaraz E, Cogolludo A, and Perez-Vizcaino F (2008).** Diabetes induces pulmonary artery endothelial dysfunction by NADPH oxidase induction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 295:L727–L732.

**Low PA, Walsh JC, Huang CY, McLeod JG. (1975).** The sympathetic nervous system in diabetic neuropathy: a clinical and pathological study. *Brain* 98:341–356.

**Low PA, Walsh JC, Huang CY, McLeod JG. (1975).** The sympathetic nervous system in diabetic neuropathy: a clinical and pathological study. *Brain* 98:341–356.

**Matsuki, A., Nozawa, T., Igarashi, N., Sobajima, M., Ohori, T., Suzuki, T., Fujii, N., Igawa, A., & Inoue, H. (2010).** Fluvastatin Attenuates Diabetes-Induced Cardiac Sympathetic Neuropathy in Association With a Decrease in Oxidative Stress. *Circulation Journal*, 74, pp.468 – 475.

**Matsuki, A., Nozawa, T., Igarashi, N., Sobajima, M., Ohori, T., Suzuki, T., & Fujii, N. (2010).** Fluvastatin Attenuates Diabetes-Induced Cardiac Sympathetic

Neuropathy in Association With a Decrease in Oxidative Stress. *Circulation Journal*, 74, pp.468 – 475.

measurement. *Diabetes Reviews* 7:300– 315.

**Mesirca, P., Torrente, A.G., & Mangoni, M.E. (2015).** Functional role of voltage gated Ca<sup>+</sup> channels in heart automaticity. *Frontiers in Physiology*, 6, p.19.

**Montano N, Ruscone TG, Porta A, et al. (1994).** Power spectral analysis of heart rate variability to assess the changes in sympathovagal balance during graded orthostatic tilt. *Circulation*; 90: 1826–1831.

**Mythri S., Rajeev H. (2015).** Left Ventricular Diastolic Dysfunction (LVDD) & Cardiovascular Autonomic Neuropathy (CAN) in Type 2 Diabetes Mellitus (DM): A Cross-Sectional Clinical Study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9, pp.18-22.

**O'Brien IA, McFadden JP, Corrall RJ (1991).** The influence of autonomic neuropathy on mortality in insulin-dependent diabetes. *Q J Med* 79:495–502.

**Oakley I, Emond L. (2011).** Diabetic cardiac autonomic neuropathy and anesthetic management: review of the literature. *AANA J.* 79(6): 473-9.

**Oduwole, O.A., Adeniyi, O.F., Esezbor, C.I., Ekure, E., Fajolu, I.B., & Renner J.K. (2014).** Postural hypotension in type 1 diabetes: The influence of glycemic control and duration of illness. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, 17, pp.140-144.

**Olshansky B, Sabbah HN, Hauptman PJ, Colucci WS. (2008).** Parasympathetic nervous system and heart failure: pathophysiology and potential implications for therapy. *Circulation*.118: 863-871.

**Pagani M, Lombardi F, Guzzeti S, (1986).** Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as a marker of sympatho-vagal interaction in man and conscious dog. *Circ Res.* 59: 178-193.

**Park MK, Watanuki S. (2005).** Specific physiological responses in women with severe primary dysmenorrhea during the menstrual cycle. *J Physiol Anthropol Appl Human Sci*; 24: 601–609.

**Parveen, A., Babbar, R., Agarwal, S., Kotwani, A., & Fahim, M. (2011).** Mechanistic clues in the cardioprotective effect of Terminalia arjuna bark extract in

Isoproterenol-induced chronic heart failure in rats. *Cardiovascular Toxicology*, 11, 48–57.

**Piskorski J and Guzik P. (2007).** Geometry of the Poincaré plot of RR intervals and its asymmetry in healthy adults. *Physiol. Meas.* 28: 287-300.

**Pop-Busui, R., Stevens, M.J., Raffel, D.M., White, E.A., Mehta, M., Plunkett, C.D., Brown, M.B., & Feldman, E.L. (2013).** Effects of triple antioxidant therapy on measures of cardiovascular autonomic neuropathy and on myocardial blood flow in type 1 diabetes: a randomised controlled trial. *Diabetologia*, 56, pp.1835–1844.

**Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D (2001).** *Neuroscience*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates.

**Rajendra U, Acharya K, Joseph KP and Kannathal N (2006).** Heart rate variability: a review. *Med Bio Eng Comput.* 44: 1031-1051.

**Rodas G, Carballido CP, Capdevila L (2008).** Variabilidad de la Frecuencia Cardiaca: concepto, medidas y relación con aspectos clínicos. *AMD.* 123: 41-47.

**Sanyal, S.N., Wada, T., Yamabe, M., Anai, H., Miyamoto, S., Shimada, T., & Ono, K. (2012).** Synaptic degradation of cardiac autonomic nerves in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pathophysiology*, 19, pp.299–307.

**Sanyal, S.N., Wada, T., Yamabe, M., Anai, H., Miyamoto, S., Shimada, T., & Ono, K. (2012).** Synaptic degradation of cardiac autonomic nerves in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pathophysiology*, 19, pp.299–307.

**Saul JP. (1990).** Beat-To-Beat Variations of Heart Rate Reflect Modulation of Cardiac Autonomic Outflow. *Physiology.* 5: 32-37.

**Schnell, O., Cappuccio, F., Genovese, S., Standl, E., Valensi, P., & Ceriello, A. (2013).** Type 1 diabetes and cardiovascular disease. Schnell et al. *Cardiovascular Diabetology*, 12, p.156.

**Shotton, H.R., Clarke, S., & Lincoln, J. (2003).** The Effectiveness of Treatments of Diabetic Autonomic Neuropathy Is Not the Same in Autonomic Nerves Supplying Different Organs. *Diabetes*, 52, pp.157-164.

**Szkudelski, T. (2001).** The mechanism of Alloxan and Streptozotocin action in B Cells of the rat pancreas. *Physiological Research*, 50, 536–546.

**Tankova T, Cherninkova S, Koev D. (2005).** Treatment for diabetic mononeuropathy with alpha-lipoic acid. *Int J Clin Pract.* 59:645–650.

**Task Force of The European Society of Cardiology and The North American Society of Pacing and Electrophysiology (1996).** Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *European Heart Journal.* 17: 354-381.

**Tesfaye S, Boulton AJ, Dyck PJ, Freeman R, Horowitz M, Kempler P, Lauria G, Malik RA, Spallone V, Vinik A, Bernardi L, Valensi P. (2010).** Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. *Diabetes Care.* **33**: 2285-2293.

**Ticse, R., Villena, J., & Pimentel, R. (2007).** Prevalencia de neuropatía autonómica cardiovascular en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 de un hospital general. *Rev Med Hered,* 18, pp.129 - 135.

**Ticse, R., Villena, J., & Pimentel, R. (2007).** Prevalencia de neuropatía autonómica cardiovascular en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 de un hospital general. *Rev Med Hered,* 18 , pp.129-135.

**Triposkiadis F, Karayannis G, Giamouzis G, Skoularigis J, Louridas G, Butler J. (2009).** The sympathetic nervous system in heart failure. *JACC.*54: 1747-1762.

**Vinik AI, Maser RE, Mitchell BD, Freeman R. (2003).** Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes Care.* 26: 1553–1579.

Vinik and Associates

**Vinik, A.I., Erbas, T., & Casellini, C.M. (2013).** Diabetic cardiac autonomic neuropathy, inflammation and cardiovascular disease. *Journal of Diabetes Investigation,* 4, pp.4-18.

**Vinik, A.I., Maser, R.E., Mitchell, B.D., & Freeman, R. (2003).** Diabetic Autonomic Neuropathy. *Diabetes Care,* 26, pp.1553-1579.

**Von Borell E, Langbein J. (2007).** Després G. Heart rate variability as a measure of autonomic regulations of cardiac activity for assessing stress and welfare in farm animals- A review. *Physiology and Behavior.* 92: 293-316.

**Vornanen M, Halinen M, Haverinen J. (2010).** Sinoatrial tissue of crucian carp heart has only negative contractile responses to autonomic agonists. *BMC Physiology*. 10: 1-13.

**Woo MA, Stevenson WG, Moser DK. (1992).** Patterns of beat-to-beat heart rate variability in advanced heart failure. *Am Heart J*.123: 704-710.

**Xuan, Y.L., Wang, Y., Xue, M., Hu, H.S., Cheng, W.J., Li, X.R., Yin, J., Yang, N., & Yan, S.H. (2015).** In rats the duration of diabetes influences its impact on cardiac autonomic innervations and electrophysiology. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 189, pp.31–36.

**Xuan, Y-L., Wang, Y., Xue, M., Hu, H-S., Cheng, W.J., Li, X-R., Yin, J., Yang, N., & Yan, S-H. (2015).** In rats the duration of diabetes influences its impact on cardiac autonomic innervations and electrophysiology. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 189, PP.31-36.

**Ziegler D. (1994).** Diabetic cardiovascular autonomic neuropathy: prognosis, diagnosis and treatment. *Diabetes Metab Rev* 10: 339–383.

**Ziegler, D., Christoph, G.H, & Nourooz, J. (2004).** Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Relation to the Severity of Diabetic Polyneuropathy and Cardiovascular Autonomic Neuropathy. *Diabetes Care*, 27, 2178-2183.

**Ziegler, D., Sohr, C. G. H., & Nourooz-zadeh, J. (2004).** Oxidative stress and antioxidant defense in relation to the severity of diabetic polyneuropathy and cardiovascular autonomic neuropathy. *Diabetes Care*, 27, 2178–2183.