BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD EN CIENCIAS QUIMICAS

POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Área de bioquímica y Biología molecular

"Efecto de la atorvastatina sobre la variabilidad de la frecuencia cardiaca en ratas diabéticas"

Tesis presentada para obtener el grado de Maestría en Ciencias Químicas en el área de Bioquímica y Biología Molecular.

PRESENTA:

Ing. Silvia Lizbeth Herrera López.

Director de Tesis:

Dr. José Gustavo López y López

Junio del 2018.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Farmacia clínica de la Facultad de Ciencias Qumicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Para la realización de este trabajo se contó con los siguientes apoyos:

CONACYT. Becario CONACYT por 2 años (2015-2017), con el número de registro CVU.

Se agradece a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por el apoyo otorgado para conclusión de esta tesis dentro del programa II. Investigación y Posgrado. Aseguramiento de la calidad en el Posgrado. Indicador establecido en el Plan de Desarrollo Institucional 2013-2017.

Indice

Lista de abreviaturas 5

Lista de gráficas y figuras 8

Lista de tablas 9

Resumen 9

1. Introducción 10

1.1 Diabetes mellitus 10

1.2 Clasificación 11

1.3 Sistema Nervioso Autónomo 13

1.3.1 Sistema nervioso simpático 14

1.3.1.1 Neurotransmisores simpáticos 14

1.3.1.2 Receptores simpáticos: 14

1.3.2 Sistema nervioso parasimpático 15

1.3.2.1 Neurotransmisores parasimpáticos 16

1.3.2.2 Receptores parasimpáticos 16

1.3.3 Control del sistema nervioso simpático y la función cardiaca 17

1.3.4 Control del sistema nervioso parasimpático y la función cardíaca 17

1.4 Transducción de señal celular del SNA 18

1.4.1 Vía de señalización de la estimulación simpática 18

1.4.2 Vía de señalización de la estimulación parasimpática 18

1.5 Conducción eléctrica del corazón 20

1.6 Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo 21

1.7 Principales fuentes productoras de estrés oxidativo durante la DM 22

1.7.1 Activación de la vía del poliol 23

1.7.2 Ruta de las hexosas 24

1.7.3 Proteína cinasa C 25

1.7.4 Fuentes no enzimáticas 26

1.7.4.1 Producción de AGEs 26

1.7.5 Fuentes enzimáticas 27

1.7.6 Fuentes no enzimáticas 28
1.7.6.1 Producción de O^{2-} por la cadena de transporte mitocondrial 28
1.8 Complicaciones de la diabetes mellitus debido al estrés oxidativo 30
1.9 Estrés oxidativo en el sistema neuro-cardiovascular 31
1.10 Patogénesis de la neuropatía autonómica cardiaca 32
1.11 Signos clínicos de la Neuropatía autonómica cardiaca 41
1.12 Método de diagnostico de la NAC 42
1.13 Variabilidad de la frecuencia cardiaca 42
1.14 Estatinas 43
1.14.1 Estructura química de las estatinas 43
1.14.2 Mecanismos de acción de las estatinas 44
1.14.3 Efectos pleiotrópicos de las estatinas 46
1.14.4 Mejoramiento del proceso angiogénico por inhibición de isoprenoides 47
1.14.5 Efecto antioxidante de las estatinas 51
1.14.5.1 Disminución del estrés oxidativo 51
1.14.6 Efecto cardioprotector de las estatinas 53
1.14.6.1 Mejoramiento de la función endotelial 53
1.14.7 Estatinas y el sistema nervioso autónomo 57
1.14.7.1 Estudios experimentales de las estatinas sobre el SNA 60
2. Antecedentes 64
3. Justificación 65
4. Diagrama de trabajo 67
5. Hipótesis: 68
6. Objetivos: 68
6.1 General: 68
6.2 Particulares: 68
7. Metodología 69
7.1 Modelo animal 69
7.2 Modelo experimental de diabetes mellitus 69
7.3 Tratamiento con atorvastatina 69
7.4 Administración oral de la atorvastatina 70

7.5 Registro de electrocardiograma 70
7.6 Procesamiento del registro de EKG 70
7.7 Obtención de los parámetros electrocardiográficos 70
7.8 Análisis de la variabilidad de la frecuencia cardiaca 72
7.8.1 Análisis de la VFC en el dominio del tiempo 73
7.8.2 Análisis de la VFC en el dominio de la frecuencia 75
7.8.3 Análisis de la VFC en el método no lineal de Poincaré 76
7.9 Análisis estadístico 78
8. Resultados 78
8.1 Características generales del modelo experimental de Diabetes Mellitus inducida por Estreptozotocina 78
8.1.2 Peso y glucosa 78
8.2 Análisis de la VFC en el dominio del tiempo 79
8.2.1 Análisis de la VFC en el dominio de la frecuencia 82
8.2.2 Análisis de la VFC en el diagrama de Poincaré 85
8.3 Parámetros electrocardiográficos 87
9. Discusión 88
9.1 Modelo de Diabetes mellitus experimental inducido con STZ en rata. 88
9.2 Disminución de peso en las ratas diabéticas 90
9.3 Aumento de glucosa en el grupo diabético 90
9.4 Aumento del intervalo QT en el grupo diabético 91
9.5 Efecto protector de la atorvastatina sobre el intervalo QT 93
9.6 Reducción de la VFC durante la DM 95
9.7 Posibles mecanismos de acción implicados en la reducción de la VFC durante la DM 98
9.8 Evaluación de la modulación simpático-vagal por análisis de la VFC 99
9.9 Protección sobre la reducción de la VFC con el tratamiento con atorvastatina 100
9.10 Posibles mecanismos de acción implicados en la protección sobre la reducción de la VFC durante la DM con el tratamiento con atorvastatina 101
10. Conclusiones 102
11. Perspectivas 103
12. Bibliografía 103

Lista de abreviaturas

AC: Adenilil Ciclasa
ACh: Acetilcolina
ADMA: Dimetil Arginina Asimétrica
AGEoxLDL: Modificación de AGEs de Lipoproteínas de Baja Densidad Oxidada
AGEs: Productos Finales de Glicación Avanzada
AMPc: Monofosfato de Adenosina Cíclico
AngII: Angiotensina II
ANP: Péptido Natriurético
AOPPs: Productos de Proteína de Oxidación Avanzada
apoB: Apolipoproteína B
AT1: Receptor de Angiotensina Tipo 1
BCP: Bypass Cardiopulmonar
BH4: Tetrahidrobiopterina
BNP: Péptido Natriurético Cerebral
Cav-1: Caveolina 1
CE: Células Endoteliales
CML: Carboximetilisina
Colesterol LDL: Lipoproteínas de Baja Densidad
COX-2:Ciclooxigenasa 2
CTE:Cadena de Transporte de Electrones Mitocondrial
DAMPs: Patrón Molecular Asociado a Daños.
DE: Disfunción Endotelial
DERR: Desviación Estándar de los Intervalos RR consecutivos
DGA: Diacilglicerol
DHAP: Dihidroxiacetona
DM: Diabetes Mellitus
DM1: Diabetes Mellitus tipo 1
DM2:Diabetes Mellitus tipo 2
DMG: Diabetes Gestacional
DPP:3-Dimetilalil Pirofosfato
EAC: Enfermedad Arterial Coronaria
EC: Enfermedad Cardiovascular
ECG:Electrocardiograma
eNOS: Óxido Nítrico Sintasa Endotelial
EO: Estrés Oxidativo
ERC: Enfermedad Renal Crónica
Erg-1: Factor de Crecimiento Epidérmico
EROS: Especies Reactivas de Oxigeno
ET-1: Endotelina 1

FC: Frecuencia Cardiaca
FPP: Farnesil Pirofosfato
GA3P: Gliceraldehído-3-Fosfato
GC: Gasto Cardiaco
GFAT: Fructosa-6-Fosfato Amidotransferasa
GGPP: Geranilgeranil Pirofosfato
Gi: Proteína G Inhibitoria
GPCR: Receptores Acoplados a Proteína G
GPP: Geranil Pirofosfato
GSH: Glutation
GSSG: Disulfuro de Glutation
GTPCH: Guanosina Trifosfato Ciclohidrolasa
H_2O_2: Peróxido de Hidrógeno
HAT: Hipertensión Arterial
HF: Oscilaciones de Alta Frecuencia
HMGB1: Proteína de Alta Movilidad box-1
HMG-CoA: 3-Hidroxi-Metil Glutaril Coenzima A Reductasa
HUVEs: Células Endoteliales de la Vena de Cordón Umbilical Humano.
IAM: Infarto Agudo al Miocardio
IC: Insuficiencia Cardiaca
ICC: Insuficiencia Cardiaca Crónica
IL-1: Interleucina 1
IL-6: Interleucina 6
IPP: Isopentil Pirofosfato
LF/HF: Relación de las Oscilaciones de Baja/Alta Frecuencia
LF: Oscilaciones de Baja Frecuencia
M2: Receptor Muscarinico M2
M3: Receptor Muscarinico M3
MDA: Malonaldehído
MSNA: Actividad Nerviosa Simpática Muscular
NA: Núcleo Parasimpático Ambiguo
NAC: Neuropatía Autonómica Cardiaca
NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NADPH Oxidasa: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Oxidasa
NE: Noradrenalina
NE: Norepinefrina
NF-Kβ: Factor Nuclear Kappa Beta
NLS: Secuencia Señal de Localización Funcional
NO: Óxido Nítrico
Nodo SA: Nodo Sinoatrial
Nodulo AV: Nodulo Auriculoventricular
NTS: Nucleo del Tracto Solitario
O^{-2}: Radical Superóxido
$ONOO^-$: Peroxinitrito
PA: Potencial de Acción
PA: Presión Arterial

PAMs: Patrón Molecular Asociado a Patógenos
PBR: Región Polibásica C-terminal
PKA:Proteína Quinasa A
PKC: Proteína Quinasa C
RAGE: Receptores de Productos Finales de Glicación Avanzada
RMSSD: raíz cuadrada de la media de la suma de los cuadrados de las diferencias entre intervalos RR consecutivos
RS: Reticulo Sarcoplásmico
RSNA: Actividad Nerviosa Simpática Renal
RVLS: Nucleo Rostral Ventromedular
SmgGDS: El Pequeño Estimulador de la Disociación del GDP de la Proteína de Unión al GTP
SNA: Sistema Nervioso Autónomo
SNP: Sistema Nervioso Parasimpático
SNS: Sistema Nervioso Simpático
SOD: Superóxido Dismutasa
SRAA: Sistema Renina-Angiotensina Aldosterona
STZ: Estreptozotocina
TBARS: Sustancias Reactivas al Ácido Tiobartitúrico
TCA: Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos
TGF-β1: Factor de Crecimiento Transformante Beta 1
TLR 4: Receptor Tipo Toll 4
TLR-2: Receptor Tipo Toll 2
TNF-α: Factor de Necrosis Tumoral-α
TPI: Triosafosfato Isomerasa
VEGF: Factor de Crecimiento Endotelial Vascular
VFC: Variabilidad de la Frecuencia Cardiaca
VS: Volumen Sistólico
VSMC: Células del Músculo Liso Vascular
α7nCHR: Subunidad α7 del Receptor de Acetilcolina Nicotínico.
β1: Receptor Adrenérgico β1
β2: Receptor Adrenérgico β2

Lista de gráficas y figuras

Figura 1. Sistemas de transducción de señales para receptores β-adrenérgicos y estimulaciones de receptores muscarínicos en un miocito cardíaco. 19
Figura 2. Regulación de la frecuencia cardiaca por el sistema nervioso autónomo. 20
Figura 3. Sitio del marcapasos y vías de conducción dentro del corazón.. 21
Figura 4. Activación de vías metabólicas durante la diabetes mellitus. 23
Figura 5. Rol de la aldosa reductasa (AR) en la hiperglucemia inducida por estrés oxidativo. 24
Figura 6. Activación de rutas del metabolismo de la glucosa y la generación de especies reactivas de oxigeno (EROS) durante la diabetes mellitus. 33
Figura 7. Denervación autonómica del corazón y los efectos de la diabetes.. 34
Figura 8. Reacción entre los productos finales de glicación avanzada (AGEs) y el receptor RAGE en la patogénesis de la neuropatía diabética. 36
Figura 9. Unión de ligandos al receptor de producto final de glicación avanzada (RAGE), aumento de estrés oxidativo y procesos inflamatorios en el daño a la macrovasculatura y microvasculatura.. 38
Figura 10. Regulación de la respuesta inflamatoria por el circuito neural del sistema nervioso autónomo (SNA) 40
Figura 11. Registro de la variabilidad de la frecuencia cardiaca (VFC) 42
Figura 12. Estructuras químicas de los inhibidores de la HMG-CoA reductasa (estatinas) 44
Figura 13. Mecanismos de acción de las estatinas. 45
Figura 14. Efectos pleiotrópicos de las estatinas..... 46
Figura 15. Mecanismos de acción de las estatinas sobre los isoprenoides…..... 48
Figura 16. Nuevos mecanismos de los efectos pleiotrópicos de las estatinas.. 51
Figura 17. Efectos de las estatinas sobre la NADPH oxidasa en las células endoteliales (CE).. 53
Figura 18. Efectos de las estatinas en la eNOS de las células endoteliales (CE).. 55
Figura 19. Mecanismos cardioprotectores de las estatinas y la interacción con PPAR. 57
Figura 20. Señales típicas de un electrocardiograma la onda P, el complejo QRS, onda T y los intervalos eléctrocardiográficos (PR, QRS y QT) (Tomado y modificado de Howart y cols., 2009). 71
Figura 21. Duración del intervalo RR del corazón.. 75
Figura 22. Tacograma de intervalo RR de una señal del EKG en función del tiempo de una rata control de semana cero. 75
Figura 23. Análisis de la VFC por el Diagrama de Poincaré mediante el uso del software Kubius 2.1, para una rata control A) y una rata diabética B); con sus respectivos paramétros estadísticos SD1 y SD2. 77
Figura 24. Análisis de la VFC por el Diagrama de Poincaré mediante el uso del Software 2.1, para una persona sana A) y una persona con enfermedad cardiaca B); con sus respectivos parámetros estadísticos SD1 y SD2..... 77
Figura 25. Registro de peso (A) y de la concentración de glucosa en sangre (B)del grupo control (CTRL) y grupo diabético (DM) al inicio de la fase experimental (semana cero) y en la semana ocho..... 79
Figura 26. Efectos de la atorvastatina sobre la VFC durante la diabetes mellitus..... 80
Figura 27. Efecto de la atorvastatina sobre la VFC en el dominio del tiempo durante la diabetes mellitus.. 82

Figura 28. Efecto de la atorvastatina sobre la modulación autómica de la frecuencia cardiaca durante la diabetes mellitus.. 84
Figura 29. La atorvastatina protege de la disminución de la variabilidad de la frecuencia cardiaca durante la diabetes mellitus.. 86
Figura 30. Parámetros electrocardigráficos de los grupos experimentales en la semana 8. 88

Lista de tablas

Tabla 1. Receptores simpáticos y parasimpáticos y sus funciones en el corazón y vasos sanguíneos.
Tabla 2. Registro de Peso y de Glucosa para el grupo control y grupo diabético.
Tabla 3. Valores del intervalo RR y de la frecuencia cardiaca para el grupo control y grupo diabético de la semana ocho.
Tabla 4. Tabla de parámetros estadísticos del diagrama de poincaré, SD1 y SD2 de los grupos control (CTRL), grupo diabético (DM) y grupo diabético atorvastatina (DM ATO) de la semana ocho.
Tabla 5. Tabla de intervalos electrocardiográficos de los grupos control (CTRL), grupo diabético (DM), grupo diabético atorvastatina (DM ATO) y grupo control atorvastatina (CTRL ATO) en la semana ocho.

Resumen

La neuropatía diabética, incluyendo la neuropatía autonómica cardiaca (NAC), son una complicación crónica común de la diabetes tipo 1 y tipo 2 que confieren una alta morbilidad y mortalidad de los pacientes diabéticos. La hiperglucemia juega un papel clave en la activación de diversas vías bioquímicas relacionadas con el estado redox celular que desencadena disfunción endotelial, disminución en la perfusión de las terminales autónomas que determina el desarrollo y la progresión de las neuropatías diabéticas (Vinik y Seglar, 2007). Los datos experimentales implican una serie de vías de señalización celular que pueden afectar la

función neuronal autonómica en la diabetes, incluyendo: la formación de productos finales de glicación avanzada (AGEs), el aumento del estrés oxidativo / nitrosativo, con el aumento de la producción de radicales libres, la activación de las vías de poliol y de la proteína quinasa C, la activación dela hexosamina, y la activación de genes implicados en los procesos inflamatorios, causando daño neural (Witte y cols, 2005; Maser y cols, 2003). En el presente trabajo de investigación se contempló el empleo de la atorvastatina como un tratamiento terapéutico, que potencialmente puede proteger la integridad de la regulación autonómica cardiaca y por lo tanto evitar o disminuir la presencia de la neuropatía autonómica cardiaca en un modelo experimental de diabetes mellitus. Se empleó a la variabilidad de la frecuencia cardiaca (VFC) como indicador de la regulación autónoma sobre la función cardiaca. Durante la evaluación de la VFC en el dominio del tiempo, se observó una disminución de la VFC como lo indican los parámetros estadísticos DERR y RMSSD en grupo diabético con respecto al grupo control y se presentó un efecto protector sobre la VFC en el grupo diabético tratado con la atorvastatina. En el análisis de la VFC en el dominio de la frecuencia se presentó una disminución de las oscilaciones de alta frecuencia (HF), un incremento en las oscilaciones baja frecuencia (LF) y en relación simpático vagal (LF/HF) en el grupo diabético con respecto al grupo control, sin embargo en el grupo diabético tratado con la atorvastatina se presentó un efecto protector sobre estos indicadores. Resultados similares fueron obtenidos en la variabilidad a corto y largo plazo obtenidos a partir del análisis no lineal. El tratamiento con atorvastatina en el modelo de diabetes empleado tiene un efecto protector en el desarrollo de la NAC.

1. Introducción

1.1 Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es en términos generales, un desbalance metabólico teniendo como principal característica a la hiperglucemia. Su causa es la deteriorada secreción de insulina, de su efecto, o de ambos (Kerner y Brückel, 2014).

La insulina es una hormona producida por el páncreas, que se encarga de regular la cantidad de glucosa en la sangre. Dentro del páncreas, las células β producen la hormona insulina. Con cada comida, las células β liberan insulina para ayudar a las células del cuerpo a utilizar o almacenar la glucosa que obtienen de los alimentos (ADA, 2018); por lo que una deficiencia o alteración en su metabolismo producirá hiperglucemia.

De acuerdo a datos de la Federación Internacional de la Diabetes (FID, 2015), a nivel mundial, 1 de cada 11 adultos tiene DM, y se estima que para el 2040 sea uno de cada 10. Esta enfermedad afecta mayoritariamente al género masculino y se considera que uno de cada dos adultos con DM no ha sido diagnosticado.

1.2 Clasificación

De acuerdo con la *American Diabetes Association* (ADA) la DM puede clasificarse en: diabetes mellitus tipo 1 (DM1), la cual se origina debido a la destrucción de las células β pancreáticas principalmente originada por reacciones autoinmunes, provocando deficiencia en la producción de insulina; diabetes mellitus tipo 2 (DM2), generada por la pérdida progresiva de la secreción de insulina por parte de las células β pancreáticas asociada directamente con la resistencia a la insulina; diabetes gestacional (DMG), este tipo de diabetes se diagnostica durante el segundo o tercer trimestre del embarazo en personas que no fueron diabéticas antes de la gestación; y el desarrollo de la diabetes debido a otras causas, como es el caso del síndrome de diabetes monogénica (Diabetes neonatal o MODY [*Maturity-Onset Diabetes of the Young*], la diabetes generada por enfermedades pancreáticas (fibrosis quística y pancreatitis) y diabetes inducida por fármacos o sustancias químicas.

La DM1 y la DM2 son enfermedades heterogéneas en las que la génesis y la progresión de la enfermedad pueden variar considerablemente dependiendo de cada individuo. Sin embargo, es importante la clasificación de la DM para determinar la terapia que se asignará a cada uno, no obstante, a pesar de ello, algunas personas no se pueden clasificar con DM1 o DM2 al momento del diagnóstico (ADA, 2014).

Los paradigmas clásicos de que la DM2 se presentan solamente en adultos y que la DM1 se desarrolla solo en niños, ya no son precisos, debido a que ambas enfermedades pueden desarrollarse en ambos grupos de edad (ADA, 2018).

Los niños que son diagnosticados con DM1 generalmente presentan los síntomas característicos de poliuria y polidipsia, y alrededor de un tercio presentan cetoacidosis diabética (Dabelea y cols., 2014). El inicio de este tipo de DM puede ser más variable en cuanto a los signos y síntomas en adultos, y pueden no presentarse con los síntomas anteriormente mencionados en niños (ADA, 2018).

Ocasionalmente, los pacientes diagnosticados con DM2 también pueden presentar cetoacidosis diabética, particularmente las minorías étnicas; aunque las dificultades para distinguir los tipos de DM desde el punto de vista sintomatológico pueden ocurrir en todos los grupos de edad (Newton y cols., 2004).

En el desarrollo de la DM1 o DM2 se involucran varios factores genéticos y ambientales que pueden resultar en la pérdida progresiva de la masa pancreática correspondiente a las células β, desencadenando la disminución de su función normal, misma que se manifiesta clínicamente con la presencia de hiperglucemia. Una vez detectada dicha hiperglucemia, todos los pacientes, independientemente del tipo de DM que desarrollen, están en riesgo de padecer las mismas complicaciones crónicas, aunque las tasas de progresión pueden diferir
(ADA, 2018).

La caracterización de la fisiopatología diabética se encuentra más desarrollada para la DM1 que para la DM2. Actualmente se sabe que los pacientes que tienen presencia de dos o más anticuerpos dirigidos al páncreas desarrollaran hiperglucemia clínica y por lo tanto DM1. En este tipo de pacientes la DM puede ser dividida en tres etapas: la primera que inicia con normoglucemia, es presintomática y con reacciones inmunes; la segunda, que es el primer momento donde se genera disglucemia; y la tercer etapa donde se registra hiperglucemia y toda la sintomatología (Skyler y cols., 2017; Insel y cols., 2015).

1.3 Sistema Nervioso Autónomo

El sistema nervioso autónomo esta constituido por el sistema nervioso autónomo simpático y parasimpático, que interactúan entre ellos y ambos llevan a cabo diversas funciones, como la regulación de la FC. Las fibras simpáticas responsables de tal control, salen de la médula espinal en el segmento torácico, y en los dos primeros segmentos lumbares, estas fibras se dirigen a todos los vasos excepto a los capilares, y cumplen la función de provocar vasoconstricción o vasodilatación. La mayor parte de las fibras son vasoconstrictoras, y una mínima parte son vasodilatadoras (ambos ramos pertenecen al sistema simpático pero las vasoconstrictoras liberan noradrenalina, mientras que las vasodilatadoras liberan acetilcolina).

Toda la regulación circulatoria proviene del centro vasomotor del cerebro, tal centro se encuentra en el tercio inferior de la protuberancia en la sustancia reticular del bulbo, su función es proveer impulsos simpáticos a la periferia e impulsos parasimpáticos al corazón. El centro vasomotor contiene tres zonas de suma importancia que le permiten tener un control óptimo en la circulación:

1. Zona vasoconstrictora (emite fibras simpáticas hacia la periferia)
2. Zona vasodilatadora (emite fibras hacia la zona vasoconstrictora para inhibirla)
3. Zona sensitiva (recibe las señales de los nervios vagos y glosofaríngeos de la periferia y emite señales de control hacia las zonas de vasoconstricción y vasodilatación consiguiendo un cambio reflejo mediado por baroreceptores).

Específicamente, el SNA puede regular la frecuencia cardíaca (FC), la presión arterial (PA), la tasa de respiración, la temperatura corporal, la sudoración, la motilidad gastrointestinal y la secreción, así como otras actividades viscerales que mantienen la homeostasis (Gordan y cols., 2015). El SNA funciona continuamente sin esfuerzo consciente. Sin embargo, está controlado por centros ubicados en la médula espinal, el tronco cerebral y el hipotálamo (Gordan y cols., 2015). Las neuronas simpáticas y parasimpáticas ejercen efectos antagonistas sobre el corazón. El SNS prepara al cuerpo para el gasto de energía, situaciones de emergencia o estresantes. Por el contrario, el SNP es más activo en condiciones de descanso. El parasimpático contrarresta el sistema simpático después de un evento estresante y restaura el cuerpo a un estado de reposo (Gordan y cols., 2015). Las vías simpáticas y parasimpáticas

están compuestas por una cadena de dos neuronas: una neurona preganglionar y una neurona posganglionar. El neurotransmisor entre las neuronas preganglionares y posganglionares es la acetilcolina (ACh). Los mensajes de estos sistemas se transmiten como impulsos eléctricos que viajan a lo largo de los axones y las hendiduras sinápticas (utilizando un neurotransmisor químico) (Gordan y cols., 2015).

1.3.1 Sistema nervioso simpático

El SNS es el componente del SNA, que es responsable de controlar la reacción del cuerpo humano ante situaciones de estrés o emergencia. En el sistema simpático (división toracolumbar), estos nervios se originan en la región toracolumbar de la médula espinal (T1-L2) y se irradian hacia los órganos diana. Los nervios preganglionares simpáticos cardíacos (típicamente todos mielinizados) emergen de los segmentos torácicos superiores de la médula espinal (T1-T4). Después de viajar una distancia corta, las fibras preganglionares abandonan los nervios espinales a través de ramas llamadas ramas blancas y entran en los ganglios simpáticos. Las neuronas simpáticas cardíacas forman los ganglios de la cadena simpática localizados a lo largo del costado de la columna de vísceras (es decir, ganglios paravertebrales). Estos ganglios comprenden los troncos simpáticos con sus fibras de conexión. Las fibras posganglionares se extienden a las vísceras, como el corazón. En general, las neuronas preganglionares simpáticas son más cortas que las neuronas postganglionares simpáticas (Gordan y cols., 2015).

1.3.1.1 Neurotransmisores simpáticos

Los neurotransmisores son sustancias químicas liberadas de la hendidura sináptica desde las terminales nerviosas en respuesta a los potenciales de acción (PA). Transmiten señales de una neurona a una célula objetivo a través de una sinapsis, por ejemplo, ACh para las uniones neuromusculares. Las neuronas preganglionares del sistema simpático secretan ACh, por lo que se les conoce como colinérgicas, la mayoría de las terminaciones posganglionares del SNS liberan Noradrenalina (NE). Por lo tanto, estas fibras posganglionares simpáticas se denominan comúnmente fibras adrenérgicas (Gordan y cols., 2015).

1.3.1.2 Receptores simpáticos:

Hay dos tipos de receptores adrenérgicos: β y α. En el sistema cardiovascular hay $ß_1$, $ß_2$,$α_1$ y $α_2$ adrenérgicos; los cuales se muestran en la **Tabla 1.**

	Corazón				Vasos sanguíneos	
	Receptor	**Función**			**Receptor**	**Función**
Norepinefrina	**α_1**	**Inotrópico**	**Cronotrópico**	**Dromotrópica**	**α_1**	
	β_1	+	+	+	**β_1**	**Vasoconstricción**
	β_2	+	+	+	**β_2**	**Vasoconstricción**
Acetilcolina	**M_2**	-	-	-	**M_2**	**Vasoconstricción**

Tabla 1. Receptores simpáticos y parasimpáticos y sus funciones en el corazón y vasos sanguíneos (Tomada y modificada de Gordan y cols., 2015).

Los receptores β_1 adrenérgicos se expresan en el corazón (en el nodo SA, nodo AV y en cardiomiocitos auriculares y ventriculares). La activación de los receptores β_1 aumenta la FC (a través del nodo SA), aumenta la contractilidad como resultado del aumento de las concentraciones de calcio intracelular y el aumento de la liberación de calcio por el retículo sarcoplásmico (RS) y el aumento de la velocidad de conducción del nódulo auriculoventricular (AV). Además, la activación de este receptor también induce la liberación de renina por los riñones para ayudar a mantener la PA, los niveles plasmáticos de sodio y el volumen sanguíneo (Gordan y cols., 2015).

Los receptores β_2 adrenérgicos se expresan principalmente en el músculo liso vascular, músculo esquelético, y en la circulación coronaria. Su activación provoca vasodilatación, que a su vez aumenta la perfusión sanguínea en los órganos diana (especialmente el hígado, el corazón y el músculo esquelético). Estos receptores no están inervados y, por lo tanto, son estimulados principalmente por la epinefrina circulante. También hay algunas expresiones bajas de receptores β_2 en cardiomiocitos. Los receptores α_1 adrenérgicos se expresan en el músculo liso vascular proximal a las terminales nerviosas simpáticas. Su activación provoca vasoconstricción. También hay algunas expresiones bajas de receptores α_1 en cardiomiocitos. Los receptores adrenérgicos α_2 se expresan en el músculo liso vascular distal de las terminales nerviosas simpáticas. Su activación también provoca vasoconstricción (Gordan y cols., 2015).

1.3.2 Sistema nervioso parasimpático

El sistema parasimpático tiene neuronas preganglionares (división craneosacral) que surgen de las neuronas en el cerebro medio, protuberancia y médula oblongata del tallo cerebral y parte

de estas fibras se originan en la región sacra (nervios espinales sacros S2-S4) de la médula espinal. Los cuerpos celulares de las neuronas preganglionares parasimpáticas se encuentran en los núcleos motores homólogos de los nervios craneales. Las fibras que inervan los órganos del tórax y la parte superior del abdomen son partes del nervio vago, el cual transporta aproximadamente el 75% de todas las fibras nerviosas parasimpáticas que pasan al corazón, los pulmones, el estómago y muchos otros órganos viscerales. Las fibras preganglionares que surgen de la región sacra de la médula espinal forman parte de los nervios espinales sacros S2-S4 y llevan impulsos a las vísceras, por ejemplo, glándula lagrimal, las glándulas salivales, corazón, tráquea, pulmón, hígado, vesícula biliar, bazo, páncreas, intestinos, los riñones y la vejiga urinaria, etc. A diferencia del sistema simpático, la mayoría de las fibras preganglionares parasimpáticas alcanzan los órganos diana y forman los ganglios periféricos en la pared del órgano. Así, en el sistema parasimpático, las neuronas preganglionares son generalmente más largas que las neuronas postganglionares (Mann y cols., 2014).

1.3.2.1 Neurotransmisores parasimpáticos

La ACh es el neurotransmisor predominante del sistema nervioso parasimpático, tanto en las neuronas preganglionares como posganglionares. El proceso excitatorio del músculo esquelético se produce al unirse a los receptores nicotínicos e inducir la apertura de los canales de sodio controlados por los ligandos, la ACh inhibe la contracción de los cardiomiocitos mediante la activación de los receptores muscarínicos (M_2). Estas fibras posganglionares parasimpáticas se denominan comúnmente fibras colinérgicas porque secretan acetilcolina en sus terminaciones nerviosas (Mann y cols., 2014).

1.3.2.2 Receptores parasimpáticos

Las fibras posganglionares parasimpáticas son colinérgicas. La ACh se puede unir a dos tipos de receptores colinérgicos llamados receptores nicotínicos y receptores muscarínicos. Los receptores muscarínicos se localizan en las membranas de las células efectoras al final de los nervios parasimpáticos posganglionares y en los extremos de las fibras simpáticas colinérgicas. Las respuestas de estos receptores son excitadoras y relativamente lentas. Los receptores nicotínicos se encuentran en las sinapsis entre las neuronas pre y posganglionares de las vías simpática y parasimpática. Los receptores nicotínicos en contraste con los receptores muscarínicos producen respuestas excitativas rápidas. Las uniones neuromusculares

que se encuentran en las fibras musculares esqueléticas son nicotínicas. En relación con el sistema cardiovascular el sistema nervioso parasimpático tiene dos tipos diferentes de receptores muscarínicos: El receptor muscarínico 2 (M_2) y el receptor muscarínico (M_3) (**Tabla 1**). Los receptores M_2 se expresan en el corazón; abundante en tejido nodal y auricular, pero escaso en los ventrículos. La unión de la ACh a los receptores M_2 sirve para disminuir la frecuencia cardíaca hasta que alcanza el ritmo sinusal normal. Esto se logra al disminuir la velocidad de despolarización, así como al reducir la velocidad de conducción a través del nodo AV. Además, la activación de los receptores M_2 reduce la contractilidad de los cardiomiocitos auriculares, reduciendo así, en parte, un volumen sistólico más pequeño y una frecuencia cardíaca más lenta. El gasto cardiaco (GC) está determinado por la FC y el volumen sistólico (VS). Los receptores M_3 se expresan principalmente en el endotelio vascular. El efecto predominante de la activación del receptor M_3 es la dilatación de los vasos, mediante la estimulación de la producción de NO por las células endoteliales vasculares (Mann y cols., 2014).

1.3.3 Control del sistema nervioso simpático y la función cardiaca

La estimulación por el SNS produce los siguientes efectos en el corazón (**Tabla 1**) son los siguientes: Efecto cronotrópico positivo (aumento de la frecuencia cardíaca). El nodo SA es el predominante marcapasos del corazón. Se encuentra dentro de la pared posterior superior de la aurícula derecha y es responsable de mantener un ritmo sinusal de entre 60 y 100 lxm. Esta tasa se ve constantemente afectada por la inervación de los sistemas nerviosos simpático y parasimpático. La estimulación por los nervios del sistema simpático produce un aumento de la FC. El efecto inotrópico positivo (aumento de la contractilidad).

1.3.4 Control del sistema nervioso parasimpático y la función cardíaca

La actividad parasimpática produce efectos que son, en general, opuestos a los de la activación simpática. Sin embargo, en contraste con la actividad simpática, el SNP tiene poco efecto sobre la contractilidad del miocardio. El efecto cronotrópico negativo (disminución de la FC): El nervio vago inerva directamente el nódulo sinoauricular; cuando se activa, sirve para reducir la FC, por lo que muestra un efecto cronotrópico negativo. El efecto inotrópico negativo (disminución de la contractilidad del miocardio). El efecto dromotrópico negativo

(disminución de la velocidad de conducción eléctrica del corazón): la estimulación del SNP sirve para inhibir la velocidad de conducción del nódulo AV (Mann y cols., 2014).

1.4 Transducción de señal celular del SNA

Los receptores simpáticos y parasimpáticos son receptores acoplados a proteína G (GPCR). En el corazón, la vía de señalización de la proteína G-cAMP-PKA media el control catecolaminérgico sobre la FC y la contractilidad (Boron y Boulpaep, 2011).

1.4.1 Vía de señalización de la estimulación simpática

Los efectos inducidos por la estimulación simpática resulta de la activación de los receptores β_1 adrenérgicos del corazón, que son GPCRs (**Figura 3**). El neurotransmisor simpático NE (Norepinefrina) (así como otras catecolaminas) se unen a los receptores adrenérgicos β_1 y activan las proteínas G estimuladoras (Gs) al causar un cambio conformacional dentro de la Gs, de modo que la subunidad α_s disociada puede unirse y activar la adenilil ciclasa (AC). La activación de esta enzima cataliza entonces, la conversión de ATP en monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). Este segundo mensajero puede activar otras vías de señalización, canales iónicos, factores de transcripción o enzimas. Con respecto al sistema cardiovascular, la enzima más importante que activa el AMPc es la proteína quinasa A (PKA). La PKA, que a su vez fosforila múltiples proteínas diana, tales como los canales de Ca de tipo L y la maquinaria contráctil como la troponina C, I y T. Además, el AMPc se une directamente a canales iónicos responsables para la corriente iónica (If), aumentando así la FC (Boron y Boulpaep, 2011).

1.4.2 Vía de señalización de la estimulación parasimpática

Los efectos de la estimulación inducida por el sistema parasimpático en el corazón resulta de la activación de receptores M_2, que son también los GPCR por la ACh (**Figura 3**). El neurotransmisor parasimpático ACh se une a M_2 receptores activadores de este modo las proteínas G inhibitorias (Gi) haciendo que un cambio conformacional dentro de la Gi subunidad, de modo que la disociación de la subunidad α puede unirse e inhibir a la AC. Como los receptores M_2 están acoplados negativamente a la AC y, por lo tanto, reducen la formación de AMPc, los receptores M_2 actúan para inhibir la actividad de PKA y ejercen un

efecto opuesto sobre los canales iónicos, las proteínas que manipulan Ca^{2+} y la maquinaria contráctil, en comparación con la estimulación simpática (Gordan y cols., 2014).

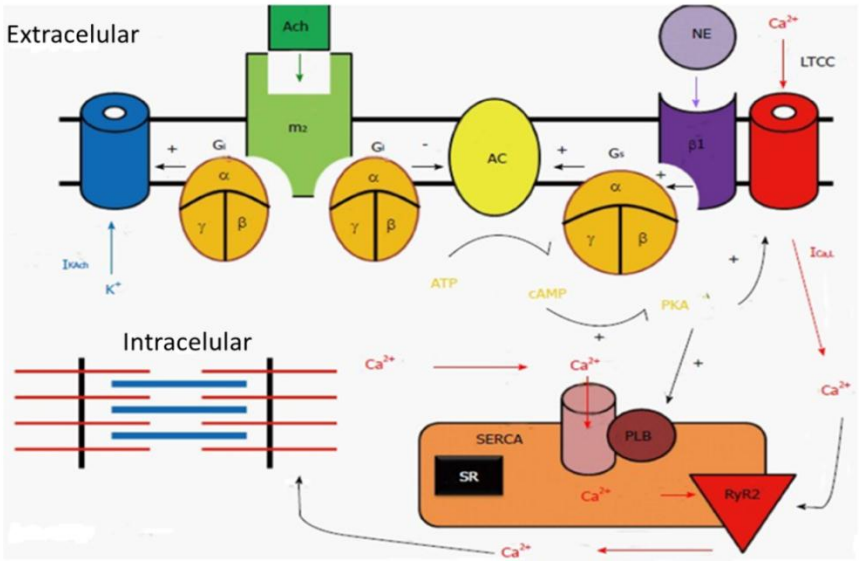


Figura 1. Sistemas de transducción de señales para receptores β-adrenérgicos y estimulaciones de receptores muscarínicos en un miocito cardíaco. NE:Norepinefrina;β1:receptor beta 1-adrenergico; Gs:proteína G estimulante: Ache:acetilcolina:m2:receptores muscarínicos de tipo 2; Gi:proteína inhibidora; AC:Adenilato ciclasa; PKA:proteína quinasa A; Ica-L: canal de Ca tipo L:RyR2:receptor de la Ryanodina 2; SERCA: retículo sarcoplásmico Ca+2 ATPasa;PLB:Phospholamba (Tomado y modificado de Gordan y cols., 2014).

En la regulación de la FC se lleva a cabo por ambos sistemas del SNA. La regulación de la FC por el SNA, se realiza a través del núcleo del tracto solitario (NTS), donde convergen las fibras simpáticas y parasimpáticas que inervan al corazón.Cuando se recibe el estimulo aferente por las fibras parasimpáticas en el NTS, en donde se traduce la información, posteriormente se activa negativamente la respuesta eferente hacia el corazón (es decir disminuyendo la FC) mediante la liberación de ACh. Por otro lado, cuando se recibe el estimulo aferente por las fibras simpáticas en el NTS, esta información se traduce y se activa positivamente la respuesta eferente hacia el corazón (es decir aumentando la FC) mediante la liberación de NE (**Figura 4**).

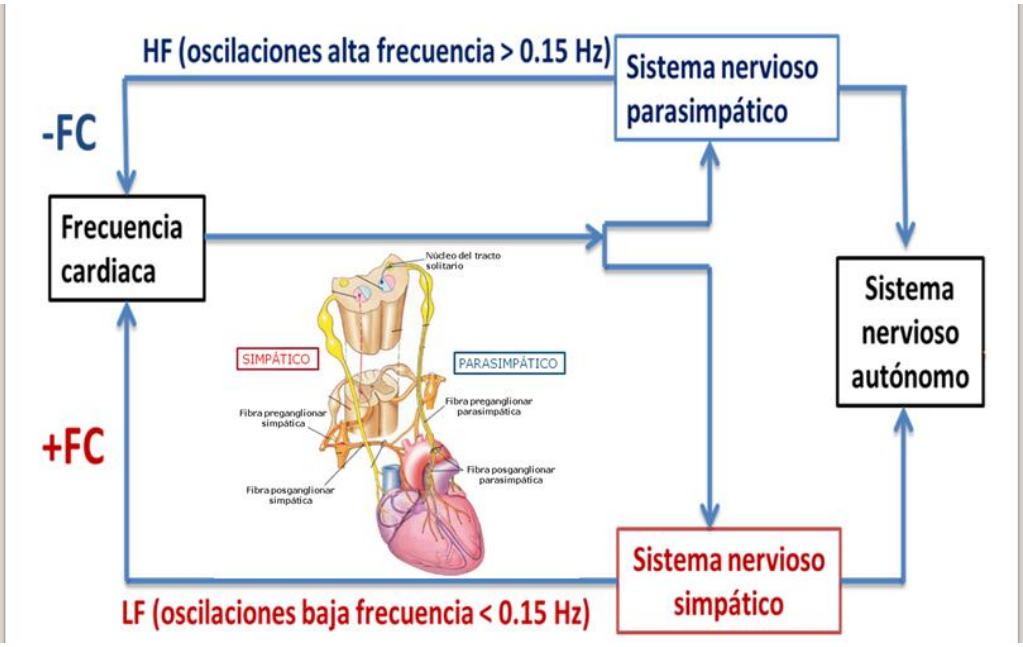


Figura 2. Regulación de la frecuencia cardiaca por el sistema nervioso autónomo. LF (oscilaciones de baja frecuencia (LF); los cuales representan la actividad del SNP) y las oscilaciones de alta frecuencia (HF); los cuales representan la actividad del SNS (Tomado y modificado de Franciosi y cols., 2017).

1.5 Conducción eléctrica del corazón

En el sistema de conducción intrínseca, los latidos del corazón se originan de la descarga de estimulación rítmica del nodo SA dentro del propio corazón. El nodo SA, es el sitio de marcapasos normal del corazón y se encuentra localizado en la aurícula derecha, es una parte del sistema intrínseco de conducción (o nervioso) que se encuentra en el corazón. Este sistema de conducción en orden de velocidad de despolarización comienza con el nódulo SA o marcapasos y resulta en la despolarización auricular y la contracción auricular, la vía internodal, el nódulo AV (donde el impulso se retrasa), el haz AV, las ramas izquierda y derecha del haz de His y, por último, las fibras de Purkinje, que resultan en una despolarización y contracción ventricular (**Figura 5**).Todos los componentes del sistema de conducción intrínseca contienen células autorítmicas que despolarizan espontáneamente (Gordan y cols., 2015). En ausencia de influencias neurales u hormonales extrínsecas, la frecuencia de estimulación del nodo SA sería de aproximadamente 100 latidos por minuto (lxm). La FC y el GC, sin embargo, deben variar en respuesta a las necesidades de las células del cuerpo de oxígeno y nutrientes en condiciones variables. Con el fin de responder

rápidamente a las necesidades cambiantes de los tejidos del cuerpo, la FC y la contractilidad son regulados por el SNA, hormonas y otros factores (Klabunde., 2017).

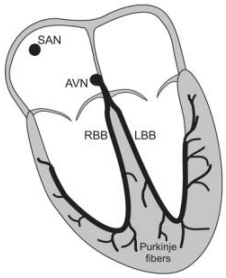


Figura 3. Sitio del marcapasos y vías de conducción dentro del corazón. SAN, nodo sinoauricular: AVN, nodo atriovenetricular; LBB, rama del haz izquierdo; RBB, rama del haz derecho. La secuencia normal de activación es SAN → AVN → LBB → RBB → fibras de Purkinje → miocardio (Tomado y modificado de Klabunde., 2017).

El sistema de conducción intrínseca coordina la actividad eléctrica del corazón. Esta actividad eléctrica en el corazón corresponde a los trazos de onda del electrocardiograma (EKG). En una grabación normal de ECG, la onda P refleja la despolarización auricular seguida por la contracción auricular. La onda QRS refleja la despolarización ventricular seguida por la contracción ventricular y la onda T refleja la repolarización ventricular y la relajación ventricular (Gordan y cols., 2015).

1.6 Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo

El estrés oxidativo (EO) se define, en general, como el exceso de formación y/o eliminación insuficiente de moléculas altamente reactivas, como las especies reactivas del oxígeno (EROS) y las especies reactivas del nitrógeno (RNS). EROS incluye radicales libres como superóxido (O_2^{-}), hidroxilo (OH^-), peroxilo (RO_2), hidroperoxilo (HO_2^-), así como especies no radicales, tales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y ácido clorhídrico (HOCl) (Johansen y cols., 2005). Los RNS incluyen radicales libres como el óxido nítrico (NO) y el dióxido de nitrógeno (NO_2^-), así como los no radicales como el peroxinitrito ($ONOO^-$), el óxido nitroso (HNO_2) y los peroxinitratos de alquilo (RONOO) .De estas moléculas reactivas, O_2^{-}, NO y

$ONOO^-$ son las especies más ampliamente estudiadas, ya que desempeñan un papel importante en las complicaciones cardiovasculares diabéticas (Johansen y cols., 2005).

Las EROS se generan bajo condiciones fisiológicas y están involucrados hasta cierto punto como moléculas de señalización y como mecanismos de defensa en la fagocitosis, función de neutrófilos. Sin embargo la generación excesiva de estrés oxidativo (EO) tiene consecuencias patológicas. La EROS puede estimular la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), por lo que estas moléculas ya no son reconocidas por su receptor LDL, por lo que sólo pueden ser captadas por receptores scavenger en macrófagos que conducen a la formación de células espumosas y placas ateroscleróticas (Johansen y cols., 2005).

El oxido nítrico regula la vasorelación dependiente del entodelio y presenta propiedades antiproliferativas e inhibe la adhesión de leucocitos y plaquetas en el endotelio vascular. No obstante, el NO fácilmente reacciona con el superoxido para formar peroxinitrito, lo cual produce una disminución en la biodisponibilidad de NO y por lo tanto al deterioro en el proceso de relajación e inhibición en los procesos antiproliferativos. Además el peroxinitrito oxida al tetrahidrobiopterina (BH4), un importante cofactor para la eNOS, que causa un descacople de la eNOS. El peroxinitrito altera la función de biomoléculas por nitración de proteínas, así como también causa la peroxidación lipídica. Por ejemplo, los canales de potasio, que regulan la respuesta de vasorrelajación, se inhiben por nitración.Y por último el peroxinitrito causa la rotura de ADN monocatenario, que a su vez activa la enzima nuclear poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP). La peroxidación inducida por EROS de los lípidos de la membrana alteran la estructura y la fluidez de las membranas biológicas, lo que finalmente afecta la función.

1.7 Principales fuentes productoras de estrés oxidativo durante la DM

Una fuente de generación de estrés oxidativo es la activación de diferentes vías alternas del metabolismo de la glucosa como la vía del poliol, proteína quinaca C (PKC), hexosamina, producción de AGEs durante la diabetes (**Figura 4**)(Cade y cols.,2008).

La patogénesis de las complicaciones diabéticas es compleja con múltiples mecanismos propuestos, que incluyen la glicación no enzimática, activación de la vía del poliolactivación

de proteína quinasa C (PKC), activación de la ruta de hexosamina y disrupción de la cadena respiratoria mitocondrial (**Figura 4**) (Tang y cols., 2012).

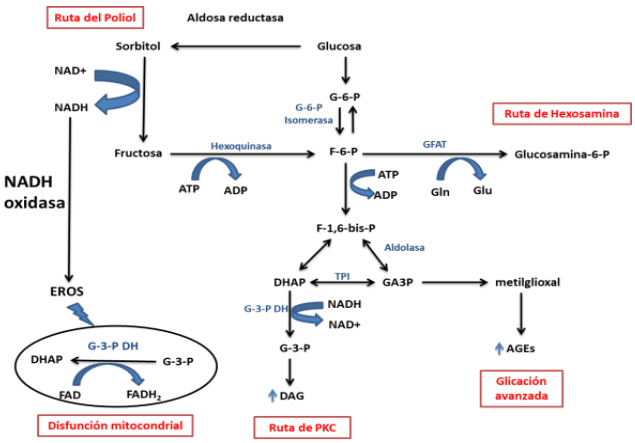


Figura 4. Activación de vías metabólicas durante la diabetes mellitus (Tomado y modificado de Yang y cols., 2012).

1.7.1 Activación de la vía del poliol

La aldosa reductasa (AR), una enzima clave en la vía del poliol, cataliza la reducción de glucosa dependiente de NADH a sorbitol, lo que conduce a una acumulación excesiva de EROS intracelulares en varios tejidos de la DM que incluyen el corazón, la vasculatura, las neuronas, los ojos y los riñones (Tang y cols., 2012).

En células cultivadas bajo condiciones de niveles altos de glucosa, han demostrado aumentos similares tanto en la actividad de la AR como en la producción de EROS, lo que confirma que la AR es un factor importante para la patogénesis de muchas complicaciones diabéticas (Tang y cols., 2012). Como ejemplo, en la hiperglucemia a través del EO inducido por la vía del poliol puede tener acciones cardíacas duales, en vasos sanguíneos coronarios (aterotrombosis) y miocardio (insuficiencia cardíaca); que conducen a morbilidad y mortalidad graves (Heather y Clarke, 2011).

Existen tres mecanismos potenciales, por los cuales la ruta del poliol contribuye al estrés EO. En primer lugar, bajo condiciones de hiperglucemia, el 30% de la glucosa se canaliza en la vía del poliol dependiente de la AR, que depende del NADPH como cofactor y, en consecuencia,

reduce el nivel de GSH (Cheng y González, 1986). En segundo lugar, se genera EO durante la conversión de sorbitol en fructosa por la sorbitol deshidrogenasa (SDH), (es decir, el segundo paso de la ruta del poliol). En este paso, el co-factor NAD^+ se convierte a NADH por la SDH. NADH es un sustrato para la NADH oxidasa que conduce a la producción de O^{-2} (**Figura 2**) (Morre y cols., 2000).

En tercer lugar, la vía del poliol convierte la glucosa en fructosa y la fructosa puede metabolizarse aún más en fructosa-3-fosfato y 3-desoxiglucosona, que son agentes de glicación no enzimáticos más potentes que la glucosa (Hamada y cols., 1996).

La AR reduce la glucosa en sorbitol a expensas de NADPH. Dado que la NADPH es esencial para la generación de GSH (antioxidante intracelular) a partir de GSSH, el agotamiento de NADPH por la AR puede perjudicar la defensa antioxidante intracelular. El sorbitol luego se convierte en fructosa por la SDH con la producción de NADH, conduciendo a las EROS a través de la NADH oxidasa **(Figura 5**) (Morre y cols., 2000).

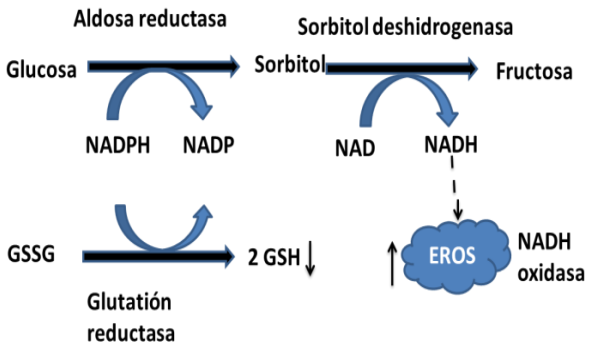


Figura 5. Rol de la aldosa reductasa (AR) en la hiperglucemia inducida por estrés oxidativo (Tomado y modificado de Morre y cols., 2000).

Esto sugiere que la ruta del poliol juega un papel importante en la patogénesis de la DM en pacientes humanos. De hecho, actualmente se están investigando varios inhibidores de la AR para prevenir complicaciones diabéticas tales como cardiomiopatía, neuropatía, nefropatía y retinopatía (Johnson y cols., 2004; Giannoukakis, 2006; Ramirez y Borja, 2008).

1.7.2 Ruta de las hexosas

Esta ruta causa una modificación postraduccional reversible de residuos de serina y treonina de proteínas intracelulares mediante N-acetilglucosamina. En las células dañadas por la

hiperglucemia, el exceso de glucosa intracelular proporciona un aumento de fructosa-6-fosfato (Fruc-6-P) que se convierte en glucosamina 6-fosfato (Glc-6-P), esta molécula se convierte en N-acetilglucosamina-6-fosfato (GlcNAc-6-P) y finalmente en UDP-N-acetilglucoseamina (UDP-GlcNAc). La enzima O-GlcNAc transferasa (OGT) usa UDP-GlcNAc para transferir N-acetilglucosamina a una variedad de proteínas, lo que resulta en una mayor modificación de proteínas por N-acetilglucosamina. Otra enzima, N-acetilglucosaminidasa (O-GlcNAcase u OGA), elimina esta modificación de la proteína (Shah y Brownlee, 2016). La O-GlcNAc sirve como un sensor de nutrientes y EO que regula la homeostasis celular al alterar la transcripción, el metabolismo, la biogénesis de los orgánulos, la dinámica del citoesqueleto y la apoptosis, debido en parte al aumento de las EROS propias de las alteraciones metabólicas mencionadas (Hardiville y Hart, 2014; Bond y Hanover; 2015).

Actualmente se han relacionado los niveles elevados crónicos de productos O-GlcNAc con el aumento de las complicaciones cardiovasculares diabéticas. Los efectos cardíacos adversos de la O-GlcNAcilación crónicamente aumentada incluyen disminución de la función mitocondrial, disminución de la señalización autofágica y disminución de la función contráctil (Shah y Brownlee, 2016).

1.7.3 Proteína cinasa C

Es un conjunto de proteínas que conforman una familia de enzimas cinasas compuesta de 15 isoformas, de las cuales nueve son activadas por DAG, por lo que de esta manera los niveles elevados de glucosa intracelular aumentan los niveles de DAG en los tejidos de los pacientes diabéticos, incluidas las células del músculo liso arterial y los cardiomiocitos (Shiba y cols., 1993).

La hiperglucemia activa principalmente las isoformas β y δ de la PKC.Estudios llevados a cabo por Venugopal y cols (2002) han demostrado que bajo condiciones hiperglucémicas, la PKC-α es un potente activador de la NADPH oxidasa (Venugopal y cols., 2002).También se ha demostrado que la PKC-α y la PKC-δ pueden activar a la NADPH oxidasa y, a su vez, son responsables de inducir la expresión del receptor tipo Toll -2 (TLR-2) y el receptor tipo Toll-4 (TLR-4) en condiciones de glucosa alta (Dasu y cols., 2008). Estas alteraciones pueden contribuir a un ambiente de EO, ya sea por la producción directa de EROS o indirectamente

por la activación de otras vías. Se ha demostrado que la activación de PKC suprime la producción de NO, que es un potente vasodilatador, al inhibir la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). Por el contrario, aumenta la vasoconstricción activando la endotelina 1(ET-1), lo que produce un flujo sanguíneo anormal. La activación de PKC también puede inducir la expresión del factor de potenciación de la permeabilidad, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que contribuye al flujo sanguíneo y a los cambios de permeabilidad del vaso. La PKC también contribuye a la acumulación de proteína de matriz, al inducir la expresión del factor de crecimiento transformante beta 1(TGF-β1), fibronectina y colágeno de tipo IV. Se cree que esta activación es un resultado de la inhibición del NO inducida por PKC. La PKC activada contribuye directamente al ambiente de EO, activando el factor nuclear kappa beta (NF-κB) y a la NADPH oxidasa, lo que resulta en una producción excesiva de EROS (Bissinger, 2017).

En este mismo sentido el aumento de la actividad de la PKC, también se ha relacionado con la disfunción del miocardio, causando cardiomiopatía e insuficiencia cardíaca, efecto que se ha demostrado es reversible con la administración de un inhibidor de PKC, disminuyendo la actividad de PKC en corazones diabéticos, sin alterar los niveles de metabolitos circulantes (Shiba y cols., 1993).

Otras fuentes productoras de estrés oxidativo en la diabetes, son las vías no enzimáticas, enzimáticas y mitocondriales (Johansen y cols., 2005).

1.7.4 Fuentes no enzimáticas

1.7.4.1 Producción de AGEs

Durante la hiperglucemia, la glucosa reacciona con las proteínas de una manera no enzimática que conduce al desarrollo de los productos Amadori seguido de la formación de productos finales de glicación avanzada (AGEs). Estos están formados por dicarbonilos derivados de la glucosa que reaccionan con grupos amino de residuos de proteínas y aminoácidos (lisina) no protonados de la proteína. Los principales productos son formados por la fragmentación no ezimatica del intermediario glucolítico triglicérido-fosfato, a su vez inducido en los tejidos por la hiperglucemia (Thornalley y cols., 2003).

La producción intracelular de precursores de AGEs dañan las células blanco, mediante tres mecanismos generales. En primer lugar, la propia modificación de las proteínas en AGEs

cambia o evita su función celular en aquellas que contengan una actividad. En segundo lugar, la formación de AGEs de los componentes de la matriz extracelular altera su interacción con otros componentes de la matriz y con los receptores de la matriz de integrina. En tercer lugar, el metilglioxal (uno de los principales productos de glicosilación avanzada) intracelular aumenta la expresión tanto del receptor de reconocimiento de patrones RAGE (receptor para AGEs) como de sus principales ligandos endógenos, las calgranulinas S100 que tienen actividad proinflamatoria (Yao y Brownlee., 2010).

La formación de AGEs en exceso, aumenta la actividad de la NADPH y la formación de ERO. Se ha demostrado que los AGEs y sus receptores están implicados en la activación del factor de transcripción factor nuclear kappa B (NF-kB), que aumenta la expresión de los genes responsables del daño vascular (Ceriello y cols., 2016).

1.7.5 Fuentes enzimáticas

Las fuentes enzimáticas de generan el aumento en la formación de EROS en la DM incluyen eNOS desacoplada, NAD(P)H oxidasa,xantina oxidasa,ciclooxigenasa e incluso la cadena transportadora de electrones. Todas las isoformas de eNOS requieren cinco cofactores/grupos prostéticos tales como flavin adenin dinucleotide (FAD), flavin mononucleotide (FMN), hemo, BH4 y Ca^{2+}/Calmodulina. Si eNOS no tiene su sustrato L-arginina o uno de sus cofactores, eNOS puede producir O_2^- en lugar de NO y esto se conoce como el estado desacoplado de eNOS. El aumento de las EROS durante la DM se debe principalmente a la activación de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa), fuente importante de producción de O_2^-.

Guzik y cols, (2005) investigaron los niveles de O_2^- en muestras vasculares de pacientes diabéticos y fuentes probadas de O_2^-, utilizando inhibidores de eNOS, NAD(P)H oxidasa, xantina oxidasa y la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Este estudio demostró que hay una mayor producción de O_2^- en la diabetes y esto está mediado predominantemente por la NAD(P)H oxidasa. Existen siete isoformas de la NADPH oxidasa en mamíferos: Nox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 y Duox2. Nox1, Nox2, Nox4 y Nox5 se expresan en el endotelio, células de músculo liso vascular, fibroblastos o adipocitos perivasculares (Guzik y cols, 2005).

1.7.6 Fuentes no enzimáticas

1.7.6.1 Producción de O^{2-} por la cadena de transporte mitocondrial

La cadena respiratoria mitocondrial es otra fuente de generación no enzimática de especies reactivas, siendo la superproducción de O^{-2} por la cadena de transporte de electrones mitocondrial (CTE) (Brownlee, 2001). En condiciones normales, la oxidación de la glucosa comienza en el citoplasma, donde la glucosa lleva a a cabo el proceso de glucólisis. Durante la glicólisis, se generan NADH y piruvato. El NADH dona electrones a la CTE mediante dos sistemas de lanzadera diferentes, mientras que el piruvato dona equivalentes reductores ingresando al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y produciendo NADH y FADH (Brownlee, 2001). Tanto el NADH como FADH proporcionan los electrones que alimentan a la CTE y a la producción de ATP. El NADH derivado de la oxidación de la glucosa y del TCA dona electrones al complejo I de la CTE y el FADH2 dona sus electrones al complejo II de la CTE. Los complejos I y II luego transfieren los electrones a la ubiquinona. La ubiquinona pasa sus electrones al complejo III, al citocromo C, al complejo IV y finalmente al oxígeno molecular. A medida que los electrones se transfieren a través de la CTE, la energía se utiliza para transportar protones a través de la membrana. Esto crea un voltaje a través de la membrana interna y externa de la mitocondria e impulsa la síntesis de ATP. En condiciones de hiperglucemia, el número de sustratos que entran en el ciclo de TCA se incrementa y, por consiguiente, también aumenta el número de equivalentes reductores que donan electrones a la CTE. Una vez que la CTE alcanza un voltaje umbral a través de la membrana, los electrones se donan al oxígeno molecular, lo que a su vez produce un aumento en la producción de O^{-2} mitocondrial (Albers, 2014).

Alteraciones en la cadena transportadora de electrones mitocondrial debido al aumento del transporte y oxidación de la glucosa, generando principalmente O_2^-. (Varvarovská y cols, 2004). El O_2^- es generado por la cadena transportadora de electrones mitocondrial, durante la oxidación de nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) a nicotinamida adenina dinucleótido oxidado (NAD+) y también como un subproducto de muchas enzimas que actúan como oxidasas. Los efectos beneficos del O_2^- incluyen la regulación de la función vascular, la división celular, inflamación, y apoptosis entre otros (Mahjoub y Roudsari, 2012). El exceso de O_2^- se elimina a través de una familia de enzimas como la superóxido dismutasa (SOD)

que convierte el O_2^- a H_20_2 y oxígeno. La sobreproducción de este radical ocurre en tejidos propensos a las complicaciones que se desarrollan, cuando el exceso de glucosa altera el metabolismo celular (Mahjoub y Roudsari, 2012).

La producción de EROS está bajo un control estricto en las células sanas, pero la producción excesiva de EROS durante la disfunción metabólica conduce a una lesión celular, tanto el O_2^- como el NO, son relativamente inertes, sin embargo cuando ambos se combinan forman el peroxinitrito ($ONOO^-$), altamente reactivo sobre las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Los lípidos presentes en las membranas del retículo plasmático, mitocondrial y endoplásmico son objetivos principales del ataque de las EROS y la peroxidación. Los productos de la peroxidación lipídica pueden ser tóxicos para una célula y requieren su eliminación por el antioxidante glutatión (GSH), de forma similar las proteínas y ácidos nucleicos pueden estar sujetos a peroxidación y nitrosilación. Aunque estos productos finales no suelen ser directamente tóxicos para la célula, la acumulación de proteínas inactivas puede sobrecargar la capacidad de una célula para reciclarlos, y se sabe que el daño del ADN activa los mecanismos de apoptosis. El estado REDOX puede tener profundos efectos sobre la expresión génica, por lo que el EO aumenta los factores de crecimiento, los elementos de respuesta al estrés y las vías de apoptosis (Heather y Clarke, 2011).

El tripeptido, γ-L-glutamil-l-cisteinil-glicina conocido como glutatión (GSH), es el antioxidante de bajo peso molecular más importante sintetizado en las células (Forman y cols, 2009). El GSH juega un papel fundamental en la protección de las células del daño oxidativo y la toxicidad de lo electrófilos xenobióticos, y el mantenimiento de la homeostasis redox (Forman y cols., 2009).

El agotamiento de GSH en la célula la vuelve susceptible a la lesión oxidativa. El agente 3-hidroxi-4-pentenoato reduce específicamente la GSH mitocondrial y aumenta la muerte celular inducida por prooxidantes. El GSH puede prevenir la apoptosis neuronal producida por isquemia y toxicidad (Morre y cols., 2000).

1.8 Complicaciones de la diabetes mellitus debido al estrés oxidativo

En la DM se desarrolla un incremento del estatus oxidante generado por aumento de las especies reactivas de oxígeno (EROS): superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y $ONOO^-$, principalmente, así como una disminución de las enzimas antioxidantes en comparación con los sujetos sanos provocando el aumento del estrés oxidativo (EO) (Varvarovská y cols, 2004).Cada vez hay más evidencias de que la generación excesiva de radicales libres altamente reactivos, en gran parte debido a la hiperglucemia, causa estrés oxidativo (EO), lo que exacerba aún más el desarrollo y la progresión de la diabetes y sus compolicaciones (Johansen y cols, 2005). La sobreproducción y/o la eliminación insuficiente de estos radicales libres tienen como resultado la disfunción vascular, el daño de las proteinas celulares, la membrana lipidica y los ácidos nucleicos (Johansen y cols, 2005).

La hiperglucemia crónica causa EO en tejidos propensos a complicaciones en pacientes con DM. La complicación microvascular más común es la neuropatía. Aunque la prevalencia exacta depende de los criterios diagnósticos utilizados parta identificar la neuropatía, la mayoría de los estudios sugieren que el 50% de los pacientes con una historia de DM de 20 años, tanto de tipo 1 como de tipo 2 padecen neuropatía (Vinik y cols., 2003).

En la DM se producen complicaciones microvasculares, que incluyen la retinopatía, nefropatía y neuropatía diabética y las complicaciones macrovasculares como la hipertensión arterial pulmonar, ateroesclerosis cerebrovascular y coronaria (Cade, W.T., 2008). Una de las principales complicaciones que se generan durante la DM es la neuropatía autonómica cardiaca (NAC) y es una forma importante clínica de la neuropatía autonómica diabética (NAD), la cual esta asociada con un aumento de riesgo del isquemia miocárdica silente y altos índices de mortalidad (Krishna y cols, 2014).

Los estudios en ratas diabéticas sugieren que las mismas vías de transducción de señales que generan el daño de los ganglios de la raíz dorsal en la neuropatía periférica; también se ven afectadas en el cerebro (Vinik y cols., 2003). Este EO está asociado con el desarrollo de la apoptosis en neuronas y células gliales de soporte, y podría ser el mecanismo unificador que conduce al daño del sistema nervioso en la diabetes. No solo existe muerte neuronal en la diabetes, sino que también se ve afectada su capacidad de regeneración, particularmente las fibras nerviosas de pequeño calibre. En pacientes con neuropatía diabética tanto la

degeneración como la regeneración, están presentes simultáneamente, lo que sugiere que el trastorno es altamente dinámico. Con el tiempo, el equilibrio entre la degeneración y regeneración se desplaza hacia una degeneración (Vinik y cols., 2003).

Un mecanismo unificador de las lesiones del sistema nervioso en la diabetes radica en la capacidad del aumento del EO celular y perjudicar la función de las mitocondrias. Estudios recientes han respaldado esta hipótesis, incluida la medición *in vivo* e *in vitro* del EO en neuronas sensoriales, así como la protección neuronal por antioxidantes. *In vitro*, la aplicación de 10-20mM de glucosa a las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal conduce a la producción de O_2^- y H_2O_2 y eso conduce a la oxidación de lípidos y muerte neuronal. La evidencia adicional proviene de alimentar a los ratones con una dieta alta en glucosa. En este caso, los ratones experimentan hiperglucemia que conduce a la producción de radicales libres y al EO (Vincent y cols., 2004).

En pacientes con DM 1, el EO es evidente dentro de unos pocos años del diagnóstico antes del inicio de las complicaciones. A media que la enfermedad progresa, el potencial antioxidante disminuye, y los productos de peroxidación lipídica en plasma aumentan dependiendo del nivel de control del glucémico. Los pacientes con DM 2, tienen aumento en los niveles de peroxidación lipídica en comparación con los sujetos control de la misma edad, así como la disminución de GSH y GSH en plasma, todos los cuales se relacionan directamente con la tasa de desarrollo de complicaciones. Del mismo modo, el EO está vinculado a las características preclínicas de la enfermedad, como la activación endotelial vascular que puede conducir a la aterosclerosis (Vincent y cols., 2004).

1.9 Estrés oxidativo en el sistema neuro-cardiovascular

Alteraciones en la regulación neuro-cardiovascular han sido implicadas en estados de enfermedad, como la hipertensión, insuficiencia cardiaca y la diabetes (Varvarovská y cols., 2004).

Evidencia experimental reciente sugiere que las especies reactivas de oxígeno (EROS) incluyendo el superóxido (O_2^-) y peroxinitrito ($ONOO^-$) podrían contribuir al desbalance

simpático-vagal en el tallo cerebral, neuronas periféricas y en cardiomiocitos (Danson y cols., 2006).

La hiperreactividad simpática y la disminución de la actividad parasimpática consecuencia de enfermedad cardiovascular, puede desencadenar arritmias (Varvarovská y cols., 2004). Se ha establecido que existe una correlacion entre el daño vagal y la mortalidad de arritmias.

1.10 Patogénesis de la neuropatía autonómica cardiaca

Una de las principales complicaciones crónicas de la diabetes es la neuropatía autonómica cardiaca (NAC); la hiperglucemia esta implicada en la patogénesis de la NAC (Vinik y cols., 2003).

La NAC es causada por el deterioro de las fibras nerviosas autónomas que regulan la frecuencia cardíaca, el gasto cardíaco, la contractilidad miocárdica, la electrofisiología cardíaca y la constricción y dilatación de los vasos sanguíneos. Causa una amplia gama de trastornos cardíacos, que incluyen taquicardia en reposo, arritmias, inestabilidad cardiovascular intraoperatoria, isquemia e infarto de miocardio asintomáticos y aumento de la tasa de mortalidad después del infarto de miocardio (Vinik y cols., 2003).

Estudios recientes llevados a cabo por Fisher y cols, (2017) han respaldado la teoría de que la hiperglucemia también afecta la regeneración neuronal y sugieren que un aumento en la generación de O_2^- plasmático puede predecir la disminución de la función nerviosa cardíaca y, en particular, puede ser el principal determinante en la disfunción autonómica cardíaca temprana. Varios factores diferentes han sido implicados en este proceso patogénico. La activación de la ruta del poliol que conduce a la acumulación de sorbitol y los cambios potenciales en la relación NAD/NADH pueden causar daño neuronal directo y disminución del flujo sanguíneo del nervio, que conduce a procesos de vasoconstricción y reducción del flujo sanguíneo neuronal (**Figura 6**) (Bissinger y cols., 2017). El EO, con una mayor producción de radicales libres causa daño al endotelio vascular y reduce la biodisponibilidad del NO. Alternativamente, el exceso de producción del NO, puede dar como resultado la formación de $ONOO^-$ y dañar el endotelio y las neuronas, un proceso denominado estrés nitrosativo (Vinik y cols., 2003).

El control glicémico deficiente, es un factor de riesgo importante para la progresión de la NAC, esta es causada por múltiples interacciones complejas e implica varios mecanismos y vías que conducen a la isquemia y finalmente la muerte neuronal (**Figura 6**) (Bissinger, 2017). Pese a los diversos mecanismos que relacionan la hiperglucemia con el daño de las fibras nerviosas, los más sobresalientes son los mecanismos vascular y neuroquímico. El concepto vascular implica la disfunción endotelial, con la disminución resultante en el flujo sanguíneo del nervio y la hipoxia endoneuronal. El concepto neuroquímico sugiere importantes anomalías en el metabolismo celular, como en la acumulación del sorbitol en los tejidos nerviosos (Stavniichuka y cols., 2014).

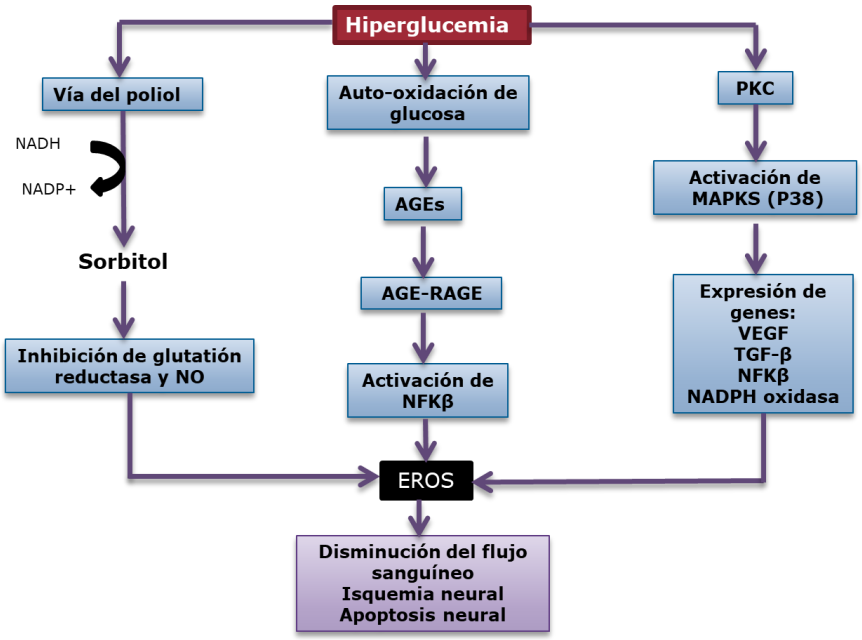


Figura 6. Activación de rutas del metabolismo de la glucosa y la generación de especies reactivas de oxigeno (EROS) durante la diabetes mellitus. (Tomado y modificado de Bissinger y cols., 2017).

La neuropatía diabética, incluyendo la NAC, son una complicación crónica común de la DM 1 y la DM 2, ambas representan una causa importante de morbilidad y mortalidad, llevando al desarrollo de arritmias cardiacas y muerte súbita (Balcıoğlu y cols., 2015).

La NAC es causado por el deterioro de las fibras nerviosas autónomas que inervan al corazón y a los vasos sanguíneos y que a su vez regulan la FC, el GC, la contractilidad miocárdica, la electrofisiología cardíaca, la constricción y dilatación de los vasos sanguíneo; lo que resulta en

alteraciones de la regulación autonómica sobre el corazón (Clemente de Souza y cols., 2008; Balcıoğlu y cols., 2015);causando anormalidades en el control de la FC y la dinámica vascular, manifestándose clínicamente por la disminución en la variabilidad de la frecuencia cardiaca (VFC) durante la respiración profunda (Vinik y cols., 2013).

Ziegler y cols, (2013) realizaron un estudio multicéntrico aleatorizado en pacientes con DM 1 y DM2, en los cuales se encontró la presencia de la NAC en el grupo de pacientes con DM 1(25.3 %) y de pacientes con DM 2 (34.3%).

Se ha demostrado que la hiperglucemia crónica promueve la disfunción neural autonómica progresiva de una manera que es paralela al desarrollo de la neuropatía periférica, por ejemplo, comenzando distalmente y progresando de manera proximal. El nervio vago, el nervio autónomo más largo, que representa el 75% de toda la actividad parasimpática. Debido a que la neuropatía se desarrolla primero en las fibras más largas, las primeras manifestaciones de la neuropatía autonómica en la diabetes tienden a estar asociados con la denervación parasimpática (**Figura 7**). Como tal, el desarrollo inicial de la NAC en la diabetes se caracteriza por la denervación parasimpática y posteriormente la denervación simpática, llevando a cabo la aceleración precoz del tono simpático (Tesfaye y cols., 2010).

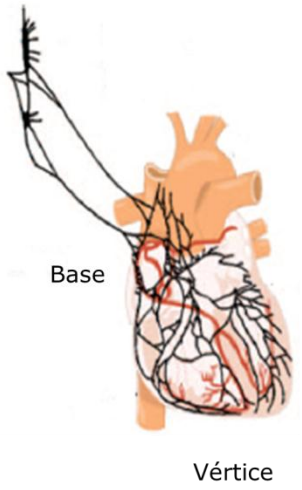


Figura 7. Denervación autonómica del corazón y los efectos de la diabetes. La denervación de la neuropatía autonómica cardiaca se desarrolla a partir del vértice de los ventrículos del corazón hasta la base del corazón (Tomado y modificado de Rodica y cols., 2010).

La patogénesis de la NAC es multifactorial, incluido el aumento de la producción mitocondrial de radicales libres debido al EO inducido por la hiperglucemia. La actividad neuronal, la función mitocondrial, la permeabilidad de la membrana y la función endotelial se ven afectadas por la formación de AGEs, la señalización de la vía poliol y la activación de poli (ADP ribosa) polimerasa y la alteración de la función de la bomba Na^+/K^+ATPasa.

Los datos experimentales implican una serie de activación de vías de señalización que pueden afectar la función neuronal autonómica en la diabetes, incluyendo: La formación de AGEs, el aumento del estrés oxidativo/nitrosativo con el aumento de producción de radicales libres, la activación de las vías de poliol y de la proteína quinasa C, la activación de polyADP ribosilación, y la activación de genes implicados en el daño (neuronal) (Rodica, 2010).

Los tejidos nerviosos expresan los RAGE, debido a las altas cantidades de AGEs, cuando los AGEs se unen a su receptor RAGE, activan a la NADPH oxidasa y promueven el aumento de la producción de EO. Los componentes que forman el complejo del factor nuclear Ikβα - NF-KB se separan de forma individual en Ikβα y NF-KB. El NF-KB se transloca al núcleo como un factor de transcripción, para llevar a cabo la expresión de los genes relacionados con los procesos de muerte celular o la supervivencia, a su vez la activación de NF-KB lleva a cabo la activación de procesos inflamatorios, dando como resultado a la microangiopatía endoneurial acompañados de Isquemia y Disfunción celular; produciéndose de esta manera un retraso de la conducción nerviosa, degeneración de la fibra distal y la desmielinización (**Figura 8**) (Yagihashi y cols.,2011).

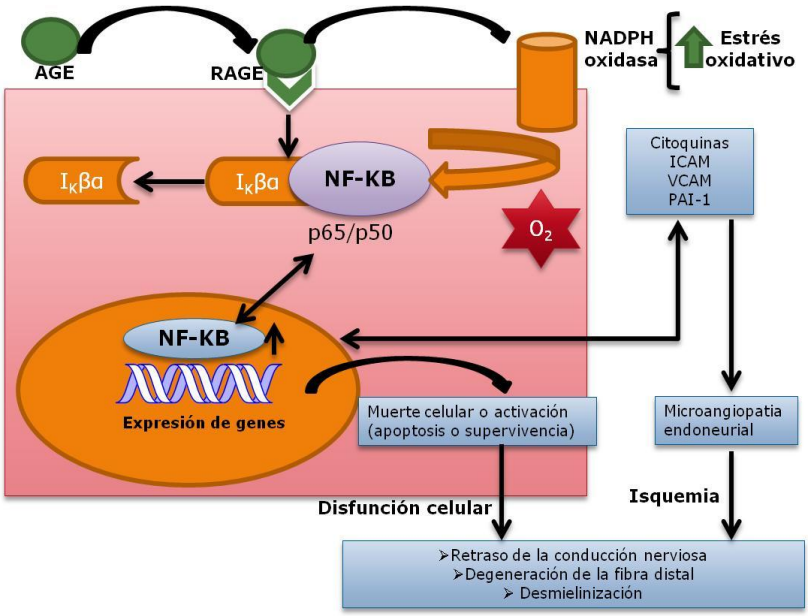


Figura 8. Reacción entre los productos finales de glicación avanzada (AGEs) y el receptor RAGE en la patogénesis de la neuropatía diabética (Tomado y modificado de Yagihashi y cols., 2011).

Los pacientes con diabetes a menudo muestran niveles elevados de carboximetilisina (CML) que pueden unirse y activar la señalización RAGE. Además, la interacción AGEs-RAGE, crea una cascada crónica de inflamación y lesión tisular (**Figura 9**). Estudios llevados a cabo por Charcot y cols, (2006) han demostrado que la presencia de neuropatía somática y autonómica severa se relacionó con niveles reducidos de sRAGE (RAGE solubles), sobre el SNP (vinik y cols., 2013). Los sRAGE, se forman a partir de la escisión de RAGE por desintegrinas, tales como ADAM 10, una metaloproteina y secretasas β y δ; las sRAGE y las esRAGE (variante empalmada), compiten por la unión de ligandos a RAGE, y la deficiencia de estas moléculas sRAGE y esRAGE podría iniciar la activación de eventos inflamatorios, con un aumento en la expresión de citoquinas proinflamatorias (E-selectina, endotelina-1,factor de crecimiento endotelial vascular, interleucina 6 y factor de necrosis tumoral α) y provocando daño a las neuronas, el riñon, el ojo y a la vasculatura (vinik y cols., 2013).

La relación entre la unión de ligandos al reconocimiento de patrones de glicación avanzada RAGE, la inflamación, expresión de genes, EO, ocasionan daño tisular y disfunción neural. Cuando existen niveles elevados de glucosa, reaccionan con las proteínas y forman AGEs, los

cuales se unen a los RAGE. Esta activación de la vía de señalización de unión a RAGE, activan a la NADPHoxidasa y por lo tanto favorece la producción de EROS. Este incremento de EROS, aumenta los productos de proteína de oxidación avanzada (AOPPs), mayor producción de AGEs y modificación de AGEs de Lipoproteínas de baja densidad oxidada (AGEoxLDL). Además el aumento de EROS reduce los niveles de glutatión, suprimiendo de este modo la actividad de la glioxilasa I, este mecanismo favorece la acumulación de AGE. Siendo estos compuestos (AOPPS, AGEs, AGEoxLDL) ligandos directos de RAGE y al mismo modo mantienen la estimulación de RAGE. Estos procesos (la activación de la vía de señalización de RAGE por la unión de ligando directos y el aumento de EROS) activan factores de transcripción, como el NFKB y el factor de crecimiento epidérmico (Erg-1), los cuales incrementan los factores de transcripción de genes, que activan mecanismos inflamatorios. Esto desencadena el aumento de la migración y activación de neutrófilos que expresan RAGE, monocitos, macrófagos, células T y células dentriticas. Esto da como resultado la liberación de los ligandos de RAGE proinflamatorios: S100/calgranulinas y la proteina de alta movilidad box-1 (HMGB1); en este proceso también se forman más AGEs, que promueven al aumento de EO y daño tisular. Por otro lado los ligandos endógenos y exógenos se unen a receptores tipo Toll (TLR), que también dirigen a la activación de NF-KB, así como la secreción de citoquinas proinflamatorias, que activan neuronas sensitivas aferentes que se dirigen hasta el tronco encefálico, a través de axones en el nervio vago, esto a su vez inhibe la respuesta en las células inmunitarias productoras de citoquinas y señales a través de la subunidad α7 del receptor de Acetilcolina nicotínico (α7nCHR). Esto a su vez inhibe la activación de NF-KB. Por lo tanto, las vías de activación AGE-RAGEs de los eventos de inflamatorios y los ligandos inflamatorios se dirigen a una ruta de procesos inflamatorios, que puede se anulada o inhibida mediante la activación vagal del reflejo anti-inflamatorio. Otro mecanismo de inhibición de los procesos inflamatorios son el aumento de RAGE solubles (sRAGE) y la variante empalmada (esRAGE) o su administración de estos podría reducir competitivamente la activación de la vía AGEs/RAGE y sus consecuencias antes mencionadas (vinik y cols., 2013).

Por lo tanto, para restringir la activación desenfrenada de los eventos inflamatorios y el aumento del EO, los cuales ocasionan daño tisular y disfunción neural, es necesario mantener la integridad de la función de ambos sistemas del SNA.

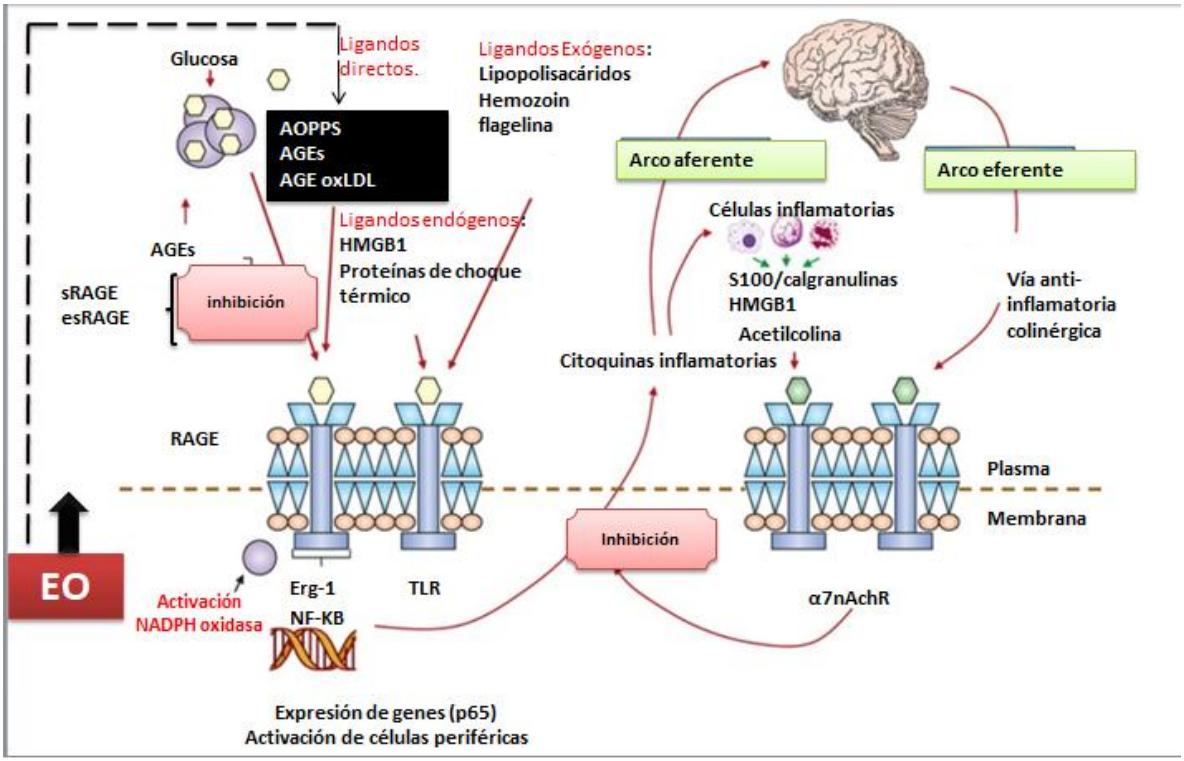


Figura 9. Unión de ligandos al receptor de producto final de glicación avanzada (RAGE), aumento de estrés oxidativo y procesos inflamatorios en el daño a la macrovasculatura y microvasculatura. Los niveles elevados de glucosa, se unen a proteínas y forman los productos finales de glicación avanzada (AGEs), que se unen a RAGE. La señalización de RAGE activa la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato-oxidasa (NADPH oxidasa) y a la producción de especies reactivas de oxigeno (EROS) (Tomado y modificado de Vinik y cols., 2013).

Vinik y cols, (2013) han demostrado que el proceso de inflamación es fundamental en la patogenia de la diabetes y sus complicaciones, incluyendo las complicaciones macrovasculares y microvasculares. Aunque la inflamación puede causar graves daños en los tejidos y la muerte celular, también es esencial en la protección del huésped, y es un mecanismo de defensa contra el trauma, la infección y el estrés, entre otros agentes provocadores. Se cree que la respuesta inflamatoria está controlada en parte por circuitos neuronales del SNA. El arco aferente consiste de nervios que detectan lesiones e infecciones, y

esto a su vez activa una vía colinérgica anti-inflamatoria que modula la respuesta y que es un objetivo potencial para futuras terapias de la diabetes (Vinik y cols., 2013).

Las señales sensoriales aferentes son transmitidas por el vago al núcleo del NTS y los receptores polisinápticos se transmiten al simpático a través del núcleo rostral ventromedular (RVLS), el núcleo parasimpático ambiguo (NA) y el núcleo vagal dorsal. Hay una salida simpática y parasimpática hacia el ganglio celíaco. El nervio esplénico (simpático) activa la cascada inflamatoria en los macrófagos, que podría estar en el bazo, pero se produce de forma difusa en todo el cuerpo. La estimulación del vago inhibe esta activación mediante la unión de la acetilcolina al receptor nicotínico de la subunidad a7 del receptor de la ACh, lo que reduce la respuesta. También se muestra la coactivación del eje hipotalámico de la hipófisis con liberación de glucocorticoides, que también modulan la respuesta inflamatoria (**Figura 10**) (Vinik y cols., 2013).

El reflejo inflamatorio es activado cuando aumentan los niveles de mediadores inflamatorios de moléculas exógenas, por ejemplo el (patrón molecular asociado a patógenos [PAMs]) o moléculas endógenas como el (patrón molecular asociado a daño [DAMPs]), estas moléculas estimulan los receptores en el nervio vago y células glómicas asociadas. Esto conduce a potenciales de acción aferentes siendo transmitido a lo largo del nervio vago hacia el tallo cerebral y otros núcleos que controlan las señales salientes en el nervio vago.

El aumento de la actividad del nervio vago en el bazo y otros órganos reduce la respuesta del sistema inmune innato a DAMP y PAMP, disminuyendo de esta manera la liberación de citoquinas y suprimiendo la inflamación. Así como la estimulación del nervio vago puede disminuir la FC, también aumentar la actividad del nervio vago ralentiza la inmunidad innata (**Figura 10**) (Vinik y cols., 2013).

Es importante señalar que el circuito reflejo inflamatorio utiliza tanto el nervio vago (clásicamente denominado "parasimpático") como el nervio esplénico (clásicamente denominado "simpático"), aunque esta diferenciación clásica se encuentra actualmente en debate (Vinik y cols., 2013).

Los órganos linfoides del sistema inmune están inervados por las neuronas colinérgicas, catecolaminérgicas y dopaminérgicas, así como por las neuronas peptidérgicas, y los neurotransmisores pueden interactuar con las células inmunitarias y alterar su nivel de funcionamiento. Watkins y cols, (2010) descubrieron que las neuronas sensoriales detectan la

presencia de inflamación en los tejidos. Estas respuestas a la inflamación inducida por interleuquina 1 (IL) -1 están mediadas por el nervio vago, y podrían ser abolidas por la vagotomía o por un antagonista competitivo selectivo del receptor de IL-1 (Watkins y cols., 2010). En la fisiología cardiovascular, el oxígeno, la glucosa y otros metabolitos son detectados por células glómicas especializadas en asociación con el SNA y en la liberación de activación de dopamina y NE. Estos causan la despolarización de las fibras sensoriales en el nervio vago, que se propagan al tronco encefálico iniciando un arco eferente motor. Parece que IL-1 se une a las células glómicas, iniciando el arco aferente; sin embargo, hay una serie de otros ligandos derivados de macrófagos, monocitos y células dendríticas (PAMP y DAMP descritos anteriormente), que activan los receptores similares a Toll y conducen a una expresión aumentada del NF-κB y el consecuente liberación de citoquinas inflamatorias, tales como factor de necrosis tumoral-α (TNF-α) e Interleucina 6 (IL-6). Por lo tanto, parece que el SNA, también es capaz de iniciar respuestas a la lesión e inflamación del tejido, y puede perseguir una respuesta proinflamatoria (Vinik y cols., 2013).

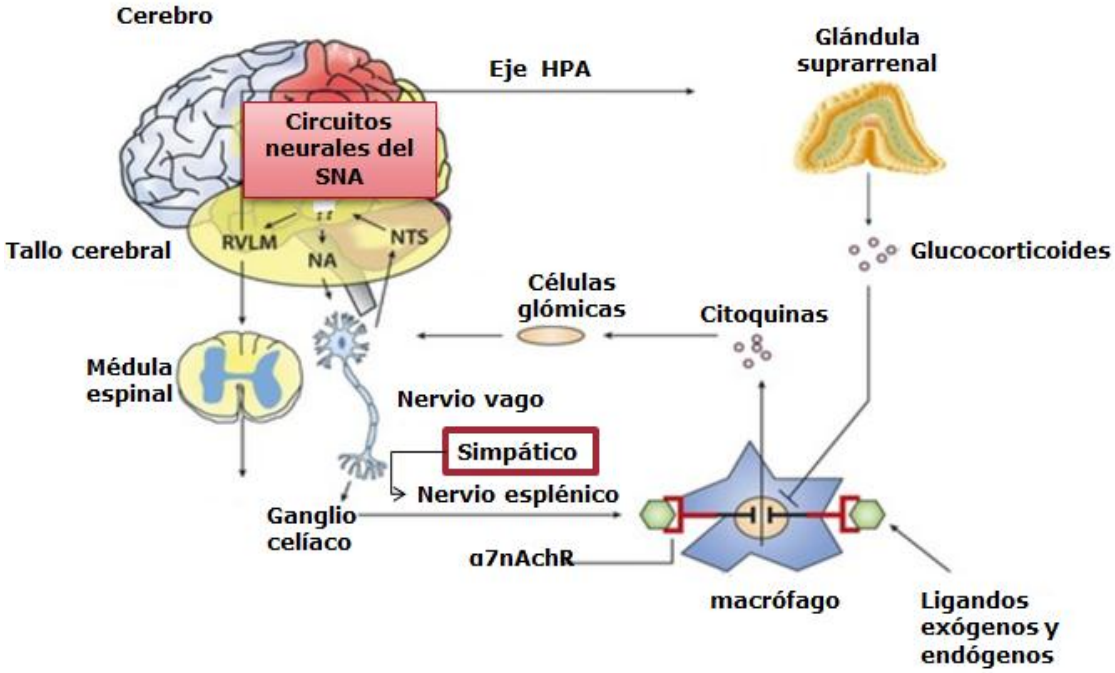


Figura 10. Regulación de la respuesta inflamatoria por el circuito neural del sistema nervioso autónomo (SNA) (Tomado y modificado de Vinik y cols., 2013).

La evidencia de un papel importante del EO, tanto de la neuropatía diabética experimental como clínica está emergiendo. La lesión por $ONOO^-$, ha sido implicada en el fenómeno de "memoria metabólica" tanto en estudios experimentales como clínicos. El $ONOO^-$, tiene múltiples efectos citotóxicos que incluyen los siguientes: nitración de proteínas y nitrosilación, rotura de una sola cadena de ADN y modificación de bases, activación de la póli-ADP-ribosa polimerasa con cambios en la señalización celular, disfunción mitocondrial, necrosis y apoptosis. La acumulación de nitrotirosina, un producto de la nitración de proteínas inducida por $ONOO^-$, se ha documentado en el nervio periférico, vasa nervorum y el ganglio de la raíz dorsal en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina (STZ), y el nervio periférico, la medula espinal y el ganglio de la raíz dorsal de ratones diabéticos inducidps por STZ, lo que indica que la DM genera no solo EO, si no estrés oxidativo/nitrosativo en el sistema nervioso periférico (Stavniichuka y cols., 2014).

1.11 Signos clínicos de la Neuropatía autonómica cardiaca

La DM puede provocar disfunción en el sistema nervioso autónomo, causando diversos trastornos cardiovasculares, incluyendo taquicardia en reposo, hipotensión postural, mayor inestabilidad cardiovascular intra y perioperatoria, isquemia e infarto de miocardio asintomáticos más frecuentes y mayor mortalidad después del infarto de miocardio. Los síntomas clínicos asociados con la NAC, generalmente ocurren en etapas posteriores e incluyen hipotensión postural, mareos, cansancio y agotamiento durante el ejercicio (Pop-Busui, 2010). El daño progresivo del equilibrio autónomo, está indicado por síntomas adicionales, que incluyen intolerancia al ejercicio, hipotensión ortostática y una reducción de la variabilidad de la frecuencia cardiaca (VFC). La percepción del dolor cardíaco a menudo se relaciona con el deterioro de las fibras nerviosas sensoriales, lo que hace a los pacientes propensos a la isquemia silente y al infarto de miocardio (Balcıoğlu y Müderrisoğlu, 2015).

El indicador clínico más temprano de la NAC, es la disminución de la VFC. La variabilidad en los intervalos de frecuencia cardiaca instantánea latido a latido, es una función de la actividad simpática y parasimpática que regula la respuesta funcional cardiaca a nivel de la actividad metabólica del cuerpo. En individuos normales, la tasa de corazón tiene un alto grado de variabilidad de latido a latido (Rodica, 2010).

1.12 Método de diagnostico de la NAC

El método más común utilizado para el diagnóstico de la NAC es la VFC, el cual se realiza mediante el registro de un ECG. La VFC es una prueba no invasiva, que evalúa la función del sistema nervioso autónomo sobre el corazón y tiene alrededor del 80% de especificidad (Rodica, 2010).

1.13 Variabilidad de la frecuencia cardiaca

El registro de la VFC, extraído de la señal de un ECG, refleja el balance entre los componentes simpáticos y parasimpáticos del SNA. Por lo tanto, la señal de la VFC es un método interesante para el estudio del funcionamiento del SNA sobre el corazón (Germán-Salló, 2016). La VFC es el fenómeno fisiológico de la variación en el intervalo de tiempo entre los latidos cardíacos (intervalos RR) consecutivos (**Figura 11**). Se mide por la variación en el intervalo latido a latido. Su variación puede contener indicadores de la enfermedad actual o advertencias sobre enfermedades cardiacas inminentes (ChuDuc y cols., 2013).

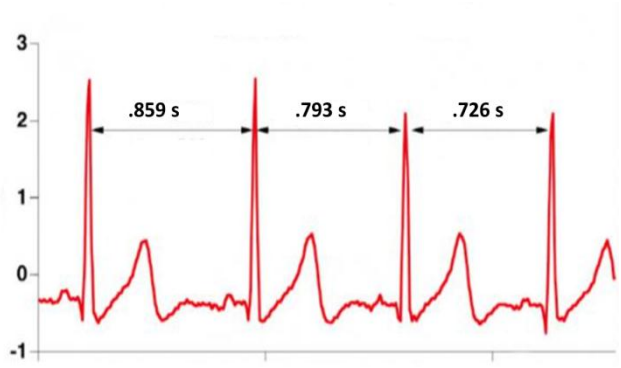


Figura 11. Registro de la variabilidad de la frecuencia cardiaca (VFC); mediante la medición de los Intervalos RR (intervalos de tiempo entre ondas R del EKG). (Tomado y modificado de Mazuco y cols., 2017).

Esta variación observada del tiempo de latido a latido es un fenómeno fisiológico normal, y es el resultado de cambios en la estimulación del nódo SA (Ho y cols., 2011). Esta variación latido a latido del ritmo cardíaco, refleja no sólo un cambio en la condición fisiológica, el estado del volumen y la función cardiaca, sino también un reflejo de la capacidad del organismo para responder al estrés ambiental y fisiológico, como cambios en el estado del

volumen, PA y tono autonómico. Algunos de los principales reguladores de esta variación de latido a latido, incluyen tanto los sistemas eferentes simpáticos y parasimpáticos, como el brazo aferente barorreflejo del sistema reflejo autonómico (Ho y cols., 2011).

La VFC se obtiene bajo respiración rítmica: descomponiendo la señal RR, en un conjunto de ondas de seno y coseno que estima la magnitud de la variabilidad en función de la frecuencia (Pop-Busui, 2010). La incorporación del análisis de la señal respiratoria permite medir independientemente tanto el sistema simpático y parasimpático del sistema nervioso autónomo; mediante índices estadísticos en lso dominios del tiempo, dominio de la frecuencia y por el método no lineal de Poincaré (Pop-Busui, 2010).

1.14 Estatinas

Las estatinas son un grupo de fármacos que tienen como principal función la dismución de lípidos, mediante su mecanismo de acción de inhibir a la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A (HMG-CoA) reductasa, enzima clave implicada en la síntesis de colesterol (Kapur y Musunuru, 2008).

1.14.1 Estructura química de las estatinas

Entre las estatinas, la simvastatina, lovastatina y pravastatina son derivados de productos fúngicos, mientras que otras estatinas recientemente desarrolladas son completamente sintéticas. Los productos fúngicos, simvastatina, lovastatina y pravastatina, están relacionados estructuralmente y tienen un anillo de hidronaftaleno en común. La simvastatina y lovastatina se administran por vía oral como profármacos inactivos en las formas lactonas mientras que se administra pravastatina en la forma activa de ácido abierto. Otras estatinas totalmente sintéticas tienen estructuras diferentes aunque también tienen un resto de tipo HMG ácido abierto entre los grupos 4-fluorofenilo e isopropilo (o ciclopropilo) (**Figura 12**) (Shitara y Sugiyama, 2006).

Por otro lado, la fluvastatina es una estatina completamente sintética con una estructura muy diferente de las estatinas derivadas de los productos fúngicos (Shitara y Sugiyama, 2006).La fluvastatina es un derivado de mevalonolactona con un anillo de indol sustituido con fluorofenilo (**Figura 12**) (Shitara y Sugiyama, 2006). Las estatinas, que alcanzaron el mercado

después de la fluvastatina, también tienen estructuras similares con grupos fluorofenilo. Todas las estatinas totalmente sintéticas tienen formas ácidas abiertas. Dependiendo de sus estructuras químicas, tienen diferentes afinidades para la HMG-CoA reductasa, que determina sus efectos farmacológicos, y diferentes propiedades farmacocinéticas (es decir, distribución de tejidos, estabilidad metabólica, enzimas y transportadores involucrados en su metabolismo, etc.). La ruta del mevalonato es activa no solo en los hepatocitos, donde se describió por primera vez, sino que también es importante para la homeostasis celular de las células vasculares (EC) y células del musculo liso vascular (VSMC). Las estatinas lipofílicas (como la atorvastatina y la simvastatina), pueden difundirse pasivamente a través de la bicapa lipídica de la membrana celular y pueden ser captadas por un gran número de células y no sólo por hepatocitos (que también poseen mecanismos de transporte activo) (**Figura 12**) (Shitara y Sugiyama, 2006).

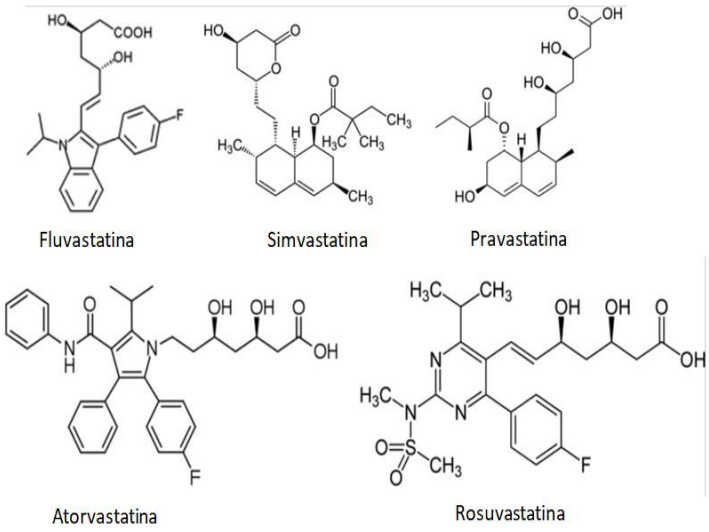


Figura 12. Estructuras químicas de los inhibidores de la HMG-CoA reductasa (estatinas) (Tomada y modificado de Margaritis y cols., 2014).

1.14.2 Mecanismos de acción de las estatinas

Las estatinas son un grupo de fármacos que reducen los niveles de colesterol por inhibición de la HMG-CoA reductasa, una enzima implicada en la síntesis de colesterol (**Figura 13**) (Psarros y cols., 2015). Esta inhibición resulta en la disminución de la síntesis de colesterol, así como otras moléculas isoprenoides diversas, atenuación e isoprenilación de Rac y Rho y subsecuentemente la reducción en Rac mediante la actividad de la NADPH oxidasa y Rho

mediante el incremento de la actividad de eNOS; mejorando de esta manera la biodisponibilidad de NO en las CE (Psarros y cols., 2015).

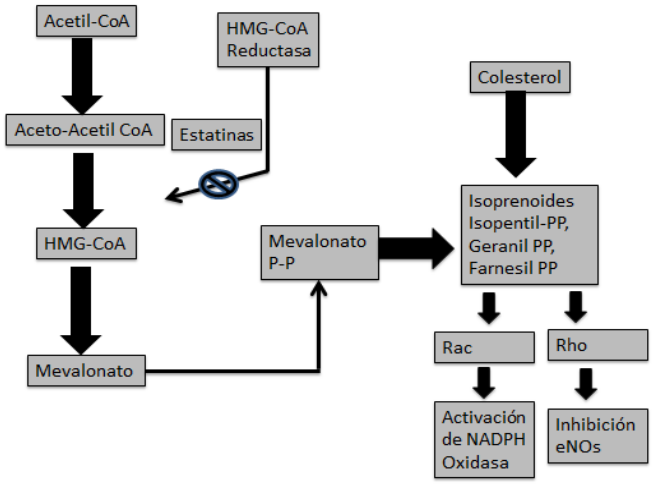


Figura 13. Mecanismos de acción de las estatinas. Las estatinas interfieren en la síntesis de la vía del mevalonato, mediante la inhibición de la actividad de la enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa (HMG-CoA) (Tomado y modificado de Psarros y cols., 2015).

Los hepatocitos toman de la circulación, el 50% de colesterol LDL (Lipoproteína de baja densidad). Un aumento en la actividad del receptor de LDL en hepatocitos podría ser un método eficiente para disminuir el nivel de colesterol LDL en plasma (Stancu y Anca, 2001).

Las estatinas, al reducir la biosíntesis del colesterol y reducir las concentraciones de colesterol conllevan a una expresión elevada de los receptores de LDL (LDL-R) en las membranas de las células del hígado, mejorando el aclaramiento de las partículas circulantes de colesterol LDL de la sangre. En pacientes con hiperlipidemia, la terapia con estatinas reduce la tasa de producción hepática de Apolipoproteína B100 (apoB100), que contiene lipoproteínas, lo que en última instancia conduce a la reducción de las concentraciones de colesterol y triglicéridos (Bilheimer, 1983).

Las estatinas hacen más que solo competir con el sustrato normal en el sitio activo de las enzimas, estas realizan un cambio conformacional de la enzima cuando se unen a su sitio activo. Esto hace que la enzima HMG-CoA reductasa, logre una estructura funcional. El

cambio conformacional del sitio activo, hace que estos medicamentos sean muy efectivos y específicos (Stancu y Anca, 2001).

1.14.3 Efectos pleiotrópicos de las estatinas

Las estatinas poseen numerosas propiedades pleiotrópicas que incluyen: (i) mejora la regulación del NO implicado en la disfunción endotelial (DE) y regulación positiva de la expresión de ET–1; (ii) efectos antioxidantes; (iii) propiedades antiinflamatorias; (iv) inhibición de la proliferación celular con acciones anticancerígenas en animales; (v) estabilización de placas ateroscleróticas; (vi) efectos anticoagulantes; e (vii) inhibición del rechazo del injerto después del trasplante cardíaco y renal (**Figura 14**) (Davignon y Laaksonen,1999).

Actualmente existen reportes que demuestran que las estatinas mejoran la función vascular, al favorecer la vasodilatación dependiente del endotelio, y ayudar a la disminución de procesos inflamatorios y disminución del EO (Rohilla y cols., 2015).

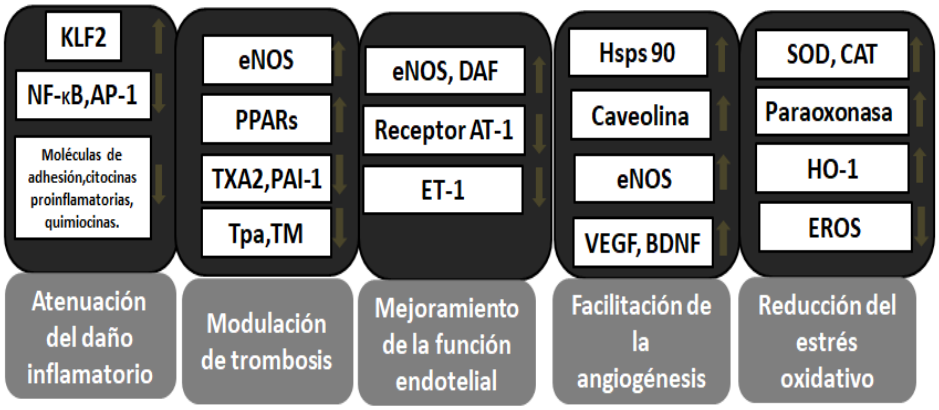


Figura 14. Efectos pleiotrópicos de las estatinas. NF-κB= factor de transcripción nuclear kappa B; AP-1 = activator de proteína 1; PPARs = receptores activados por el proliferador de peroxisoma; KLF2 = factores de transcripción 2 similares a Krüppel; TXA2 = tromboxano A2; PAI-1 = inhibidor del activador del plasminógeno-1; tPA = activador tisular del plasminógeno; TM = trombomodulina; ET-1 = endotelina 1; AT-1 = angiotensina II tipo 1; eNOS = óxido nítrico sintetasa endotelial; VEGF = factor de crecimiento endotelial vascular; BDNF = factor neurotrófico derivado del cerebro; Hsp90 = proteína de choque térmico de 90 kDa; EROS = Especies reactivas de oxígeno (Tomado y modificado de Zhao y cols., 2014).

1.14.4 Mejoramiento del proceso angiogénico por inhibición de isoprenoides

Cada vez hay más pruebas que indican que algunos de los efectos independientes de los lípidos están mediados, por la interrupción de la biosíntesis de isoprenoides (Liao, 2002). Los isoprenoides, como el isopentil pirofosfato (IPP); 3, 3-dimetilalil pirofosfato (DPP), geranil pirofosfato (GPP), farnesil pirofosfato (FPP) y geranilgeranil pirofosfato (GGPP), son importantes metabolitos intermedios en la ruta de la biosíntesis del colesterol. La isoprenilación, como la farnesilación y la geranilgeranilación, es fundamental para la inserción y el anclaje de las proteínas a las membranas celulares y para su funcionalidad biológica completa (Liao, 2002). La translocación de las proteínas Ras y tipo Ras (Rho y Rac) a la membrana depende de la farnesilación y geranilgeranilación, respectivamente (Van y D'Souza-Schorey, 1997). Las estatinas bloquean la transformación de HMG-CoA en L-mevalonato, la formación de los isoprenoides, tales como FPP y GGPP, y la posterior translocación de las proteínas Ras y tipo Ras (Rho y Rac) a la membrana (**Figura 15**). Las estatinas aumentan la producción y la biodisponibilidad del NO, derivado del endotelio a través de la reducción de la Rho GTPasa (Laufs y cols., 1997). Al inhibir la prenilación de Rac, las estatinas conducen a una reducción en el ensamblaje de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NOX) y la consecuente generación de EROS (Wassmann y cols., 2002). Las estatinas activan a Ras endotelial, que está asociado con la proliferación celular y conduce a efectos proangiogénicos (Urbich y cols, 2002). Varias de las funciones de las estatinas, en el accidente cerebrovascular isquémico (ACV) pueden deberse a la interrupción de la biosíntesis de isoprenoides (Zhao y cols., 2014).

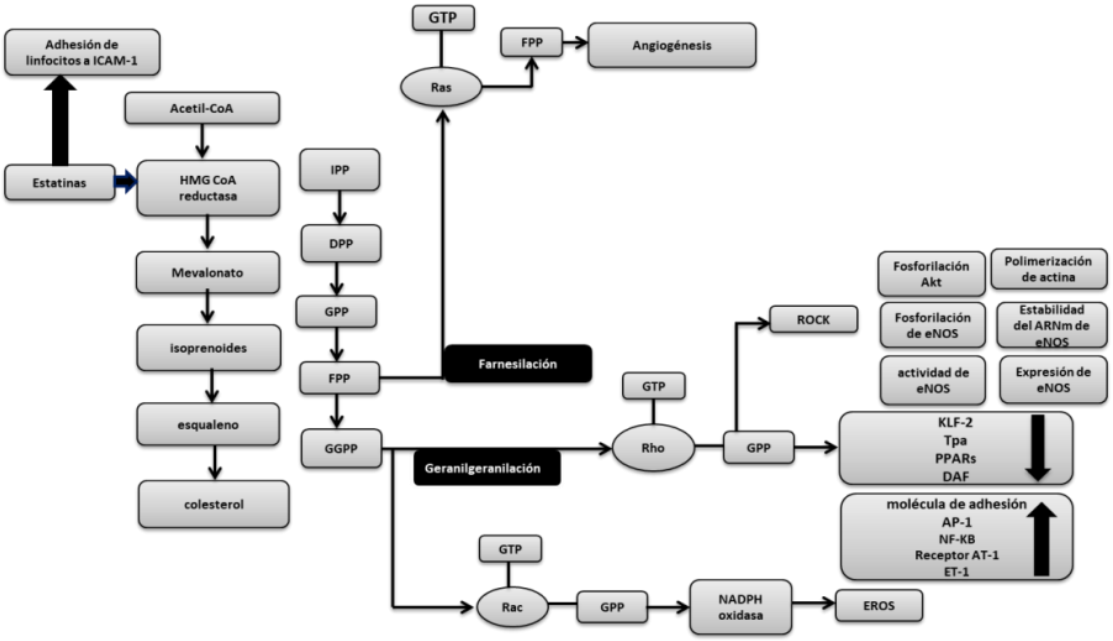


Figura 15. Mecanismos de acción de las estatinas sobre los isoprenoides. Las estatinas inhiben la HMG-CoA reductasa y disminuyen los isoprenoides intermediarios, tales como FPP y GGP, lo que conduce a una inhibición de la isoprenilación de pequeñas GTPasas tales como Ras, Rho y Rac. IPP=pirofosfato de isopentelino; DPP=3,3-pirofosfato de dimetilalilo, GPP=geranil pirofosfato, FPP=farnesil pirofosfato, GGPP=geranilgeranil pirofosfato, ROCK=Rho cinasa, EeNOS= oxido nítrico sintasa endotelial, NF-Kb =factor de transcripción nuclear kappa B, KLF2=factores de transcripción 2 similares a Krüppel, tPA = activador tisular del plasminógeno, AT-1 = angiotensina II tipo 1, ET-1 = endotelina-1, DAF = factor acelerador de la descomposición, AP-1 = activador de proteína-1, PPAR = receptores activados por el proliferador de peroxisoma, EROS = especies reactivas de oxígeno, ICAM-1(moléculas de adhesión intercelulares) (Tomado y modifcado de Zhao y cols., 2014).

Diversos estudios han demostrado que la vías metabólicas Rho/Rho-quinasa y la Rac 1, están implicadas en la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares (EC) (Tanaka y cols., 2013).

En un estudio llevado a cabo por Tanaka y cols, (2013) demostraron que los efectos pleiotrópicos de las estatinas a dosis regulares, están mediados principalmente por la inhibición de la vía de señalización Rac1, en lugar de la vía de señalización Rho / Rho-quinasa, aunque los mecanismos moleculares de la inhibición selectiva de la vía de señalización Rac1, por medio de las estatinas aún no se han dilucidado por completo. Por lo que se llevó a cabo la hipótesis de que el pequeño estimulador de la disociación del GDP de la proteína de unión al GTP (SmgGDS), juega un papel crucial en los mecanismos moleculares

de la inhibición de la ruta de señalización Rac1 por estatinas en las CE (Tanaka y cols., 2013). Las proteínas G pequeñas sirven como un interruptor molecular para transducir señales, intercambiando los estados unidos a GTP y GDP. Se han identificado tres tipos de reguladores: proteínas de intercambio de guanina y nucleótidos (GEP), inhibidores de la disociación del PIB (GDI) y proteínas activadoras de GTPasa (Ayumi y cols., 2000). SmgGDS, es el cuarto tipo de regulador para proteínas G pequeñas. El SmgGDS estimula la disociación del GDP de un grupo de proteínas G pequeñas, que incluyen no solo Rap1B, sino también las subfamilias Ki-Ras y Rho, Rac y Cdc42 (Ayumi y cols, 2000).

El SmgGDS es una proteína que estimula el intercambio de nucleótidos de guanina por GTPasas pequeñas (Wiliams, 2003). SmgGDS interactúa con la región polibásica C-terminal (PBR), de la GTPasa pequeña Rac1(Hamel y cols., 2011) (Wiliams, 2003). Recientemente se descubrió que el PBR de Rac1, tiene una secuencia de señal de localización nuclear funcional (NLS), que aumenta la acumulación nuclear de complejos proteicos que contienen SmgGDS y Rac1, que se degradan por el sistema proteasoma (Williams, 2003).

Rac1 juega un papel crucial en la generación de EROS y es un importante mediador de la hipertrofia cardiovascular (Brown y cols., 2006).En modelos de ratón con angiotensina II (AngII) e hipertrofia cardiovascular inducida por sobrecarga de presión, se demostro que la simvastatina inhibe la producción de EROS mediada por Rac1 en el corazón y el músculo liso vascular (Takemoto y cols., 2001). Estos hallazgos son respaldados por el análisis de los tejidos cardíacos humanos en situación de mal funcionamiento, donde el aumento de la generación de EROS, se asocia con una mayor actividad de Rac1, ambos atenuados por las estatinas (Maack y cols., 2003).

Se ha demostrado que las estatinas a dosis regulares (atorvastatina y pravastatina, 20 mg / día durante 1 semana) inhiben significativamente la actividad de Rac1, pero no de RhoA / Rho-quinasa de leucocitos circulantes en voluntarios sanos normales (Rashid y cols., 2009) y que las estatinas ejercen sus efectos pleiotrópicos, a través de la regulación positiva de SmgGDS, con una degradación de Rac1 resultante y un EO reducido en animales y humanos (Tanaka y cols., 2013).

En cultivos de CE, se ha encontrado que las estatinas aumentan la expresión smgGDS de la vía del mevalonato o de la vía RhoA/Rho quinasa, resultando en la degradación aumentada de Rac1 y en una producción reducida de las EROS. Sin embargo el papel de la Rac1 en el núcleo y la razón de esta degradación intracelular, todavía permanece sin conocerse (Tanaka y cols., 2013). Además también se ha demostrado que la smgGDS, no transporta el RhoA al núcleo, no obstante es capaz de ligarse a RhoA. (Tanaka y cols., 2013).

Actualmente se conoce que el SmgGDS, desempeña un papel crucial en los mecanismos moleculares de los efectos pleiotrópicos de las estatinas a través de la mejora de la degradación intranuclear de Rac1 en animales y humanos (**Figura 16**). Múltiples procesos pueden estar involucrados en los efectos de las estatinas en SmgGDS. Primero, las estatinas aumentan la expresión de SmgGDS. Segundo, SmgGDS se une y transporta Rac1 al núcleo. En tercer lugar, Rac1 es degradado por el sistema de proteasoma nuclear. Cuarto, la degradación total de Rac1, provoca una reducción de la producción de EROS. Finalmente, esta reducción de la producción de EROS, ejerce efectos protectores cardiovasculares independientes de los niveles de colesterol, es decir, los efectos pleiotrópicos de las estatinas (**Figura 16**). Demostrando que las estatinas de dosis regulares, aumentan la expresión de la SmgGDS, a través de la inhibición de la glucógeno sintetasa quinasa (GSK)-3β, a través de la ruta fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K/Akt), y que SmgGDS transporta Rac1 al núcleo, donde Rac1 es degradado por el proteasoma nuclear con la producción reducida de EROS (**Figura 16**).

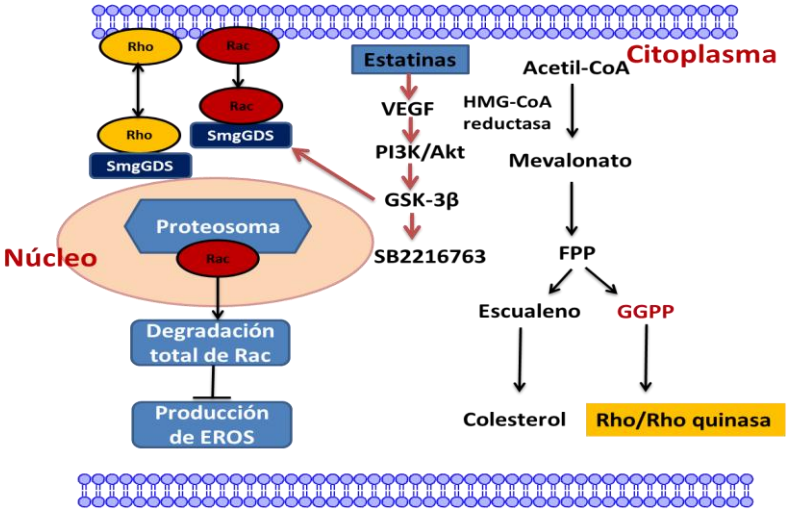


Figura 16. Nuevos mecanismos de los efectos pleiotrópicos de las estatinas. El FPP indica farnesil pirofosfato; GGPP, pirofosfato de geranilgeranilo; HMG-CoA, 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A; y VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular (Tomado y modificado de Tanaka y cols., 2013).

1.14.5 Efecto antioxidante de las estatinas

1.14.5.1 Disminución del estrés oxidativo

Uno de los mecanismos conocidos que presentan las estatinas, es el de poseer propiedades pleiótropicas, que consisten en llevar a cabo la inhibición de intermediarios isoprenoides (fernesilo o geranilgeranilo), necesarios para la función de las proteínas pequeñas G, que también son sintetizadas por la vía del mevalonato (Maragaritis y cols., 2014). A nivel intracelular, las proteínas G pequeñas tales como Ras, Rac1 y RhoA; participan en varias vías de señalización con implicaciones cardiovasculares; siendo la Rac1, una de las vías más relevantes en la producción de EROS vascular que se produce a través de la NADH/NADPH-oxidasa productora de O^{-2}, la cual es capaz de reaccionar con NO del medio y producir peroxinitrito ($ONOO^{-}$), provocando una disminución de NO (Creager y cols, 2003). La atorvastatina tiene la capacidad de bloquear la actividad de Rac1 y su translocación a la membrana, evitando la formación del complejo de la NADPH oxidasa, contribuyendo a un aumento en la biodisponibilidad de NO; mejorando la disfunción endotelial e incrementando la conductancia arterial de la vasodilatación dependiente del endotelio, promoviendo el aumento del flujo sanguíneo a las terminales nerviosas, inhibiendo la apoptosis e isquemia de las fibras autónomas cardiacas y disminuyendo el EO (Ceriello y cols., 2016).

Las estatinas suprimen la actividad de las enzimas prooxidantes (tales como NADPH oxidasa, eNOS desacoplada, y otras) y mejoran la eficacia de los sistemas de defensa antioxidante endógenos en el endotelio vascular, conduciendo a una reducción neta de la biodisponibilidad de EROS (Margaritis y cols., 2014). De hecho, la evidencia reciente sugiere que el tratamiento con atorvastatina, ejerce un efecto antioxidante sistémico dentro de los primeros 3 días de inicio del tratamiento en pacientes con aterosclerosis (Antoniades y cols., 2011).

La activación y translocación de Rac1 a la membrana es necesaria para la activación de los complejos Nox1 y Nox2, que son abundantes en las células vasculares y están implicados en la fisiopatología de la aterosclerosis. Un paso crucial en la activación de Rac1, es su geranilgeranilación por el GGPP, producido a través de la ruta del mevalonato. Las estatinas suprimen la formación de isoprenoides, como GGPP (Margaritis y cols., 2014). Los efectos de las estatinas sobre la NADPH oxidasa, se han examinado en modelos animales que muestran diversos estados de EC. En conejos ateroscleróticos, el tratamiento con fluvastatina previene un aumento de la actividad de p22 phox y gp91 phox inducido por la dieta alta en grasas, mejorando la función endotelial y reduciendo el tamaño de la placa ateroesclerótica (Mitani y cols., 2003). En un modelo de rata de accidente cerebrovascular isquémico, el pretratamiento con atorvastatina previene los aumentos en la generación de EROS y la actividad de la NADPH oxidasa, al reducir los niveles de ARNm de gp91 phox y la translocación de p47 phox a la membrana (Hong y cols., 2006). En un estudio transversal, el tratamiento con estatinas de individuos hiperlipidémicos, se asoció con niveles circulantes reducidos de gp91 phox y marcadores de EO sistémico (Pignatelli y cols., 2010). Se resume los efectos antioxidantes de las estatinas, a través de la modulación de la expresión y actividad de la NADPH oxidasa en el endotelio (**Figura 17**) (Margaritis y cols., 2014).

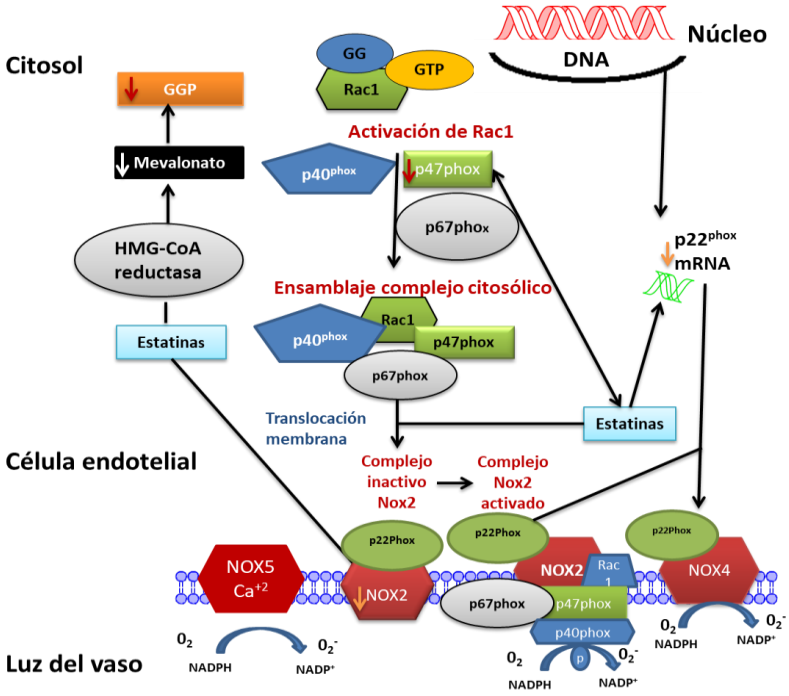


Figura 17. Efectos de las estatinas sobre la NADPH oxidasa en las células endoteliales (CE). Las estatinas suprimen la expresión de p22 phox y reducen los niveles de p47 phox y NOX2. Además, al disminuir la síntesis de GGPP, evitan la activación de Rac1 y translocación a la membrana, lo que impide la activación del complejo Nox2 en el endotelio (Tomado y modificado de Margaritis, 2014).

1.14.6 Efecto cardioprotector de las estatinas

1.14.6.1 Mejoramiento de la función endotelial

Las estatinas mejoran la expresión y actividad de la eNOS, mientras que también mejoran su acoplamiento enzimático. Esto conduce a una mayor biodisponibilidad del NO y a una mejor función endotelial (Margaritis, 2014).

La disfunción endotelial, se caracteriza por una disponibilidad reducida de NO; esta es una molécula gaseosa, que se difunde a las células del músculo liso vascular (CMLV), desencadenando un aumento en el GMP cíclico intracelular e induciendo la vasorelajación. Por lo tanto, tiene un papel importante en la regulación del tono vascular, ya que se opone a las acciones de factores vasoconstrictores como la ET–1. Además, el NO también está implicado en la regulación de otros procesos, como la agregación plaquetaria y la adhesión de leucocitos, desempeñando así un papel integral en la homeostasis vascular (Deanfield y cols.,

2007). La principal fuente enzimática de NO en la vasculatura es la eNOS, que se localiza predominantemente en las CE. La eNOS es un homodímero complejo que utiliza l- arginina y oxígeno molecular (O_2) como sustrato para producir NO y 1- citrulina (Margaritis, 2014).

Se ha demostrado que los efectos pleiotrópicos de las estatinas en la vasculatura están mediados, al menos en parte, a través de modificaciones en la expresión de eNOS, actividad y acoplamiento enzimático (**Figura 18**). Las estatinas inhiben la síntesis de mevalonato, reduciendo el GGPP, previniendo la activación de la vía Rho / ROCK y estabilizando el ARNm de eNOS, debido al aumento en la poliadenilación de ARNm de eNOS, debido a alteraciones en el citoesqueleto de actina, después de la inhibición de Rho (Kosmidou y cols., 2007); aumentando así la expresión de eNOS. Al reducir el contenido de caveolina 1(cav-1) y dimetilarginina asimétrica (ADMA) circulante, y aumentar la fosforilación de eNOS, en los sitios de activación Ser-633 y Ser-1177, a través de las vías AMPK, Akt y PI3K/PKA, las estatinas también aumentan la actividad de eNOS endotelial. Por último, mediante la regulación positiva de la guanosina trifosfato ciclohidrolasa (GTPCH); la cual se encarga de la biosíntesis de tetrahidrobiopterina (BH_4), las estatinas aumentan la disponibilidad de BH_4; el cual es un cofactor esencial, que se une a la eNOS endotelial, para la producción de NO y de esta manera, se restaura el acoplamiento de eNOS endotelial, el cual es esencial para la función fisiológica del vaso humano (Landmesser y cols., 2004) (**Figura 18**).

Se ha demostrado que la geranilgeranilación de la GTP-ase Rho, conduce a la regulación negativa de eNOS en las CE; El tratamiento con estatinas inhibió la formación de Pirofosfato de geranilgeranilo (GGPP); intermediario de la vía del mevalonato, y por lo tanto, condujo a la expresión mejorada de eNOS, que se revirtió mediante co-incubación con GGPP (Laufs y Liao, 1998).

También se ha demostrado que las Lipoproteínas de baja densidad (LDL) endógenas aumentadas, afectan negativamente a la expresión del ARNm de eNOS, en las células endoteliales de la vena de cordón umbilical humano (HUVECs), un efecto que se revierte a nivel postranscripcional después de la exposición a simvastatina (Martínez-González y cols, 2001). En la exposición de HUVECs senescentes inducidas por H_2O_2, las estatinas activaron la vía fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/Akt, incrementando la fosforilación de eNOS y

mejoraron la expresión de eNOS (Ota y cols., 2010). La expresión aumentada de eNOS mediada por estatinas se demuestra en una mejor función endotelial, como se evidencia en modelos animales de disfunción endotelial relacionada con la edad (de Sotomayor y cols., 2005) y dieta alta en grasas (Wilson y cols., 2001).

La exposición de HUVECs a cerivastatina o fluvastatina, conduce a la regulación positiva de la expresión de guanosina trifosfato ciclohidrolasa (GTPCH) y aumenta la biodisponibilidad de BH4, conduciendo a la mejora del acoplamiento de eNOS (Hattori y cols., 2003; Aoki y cols., 2012).

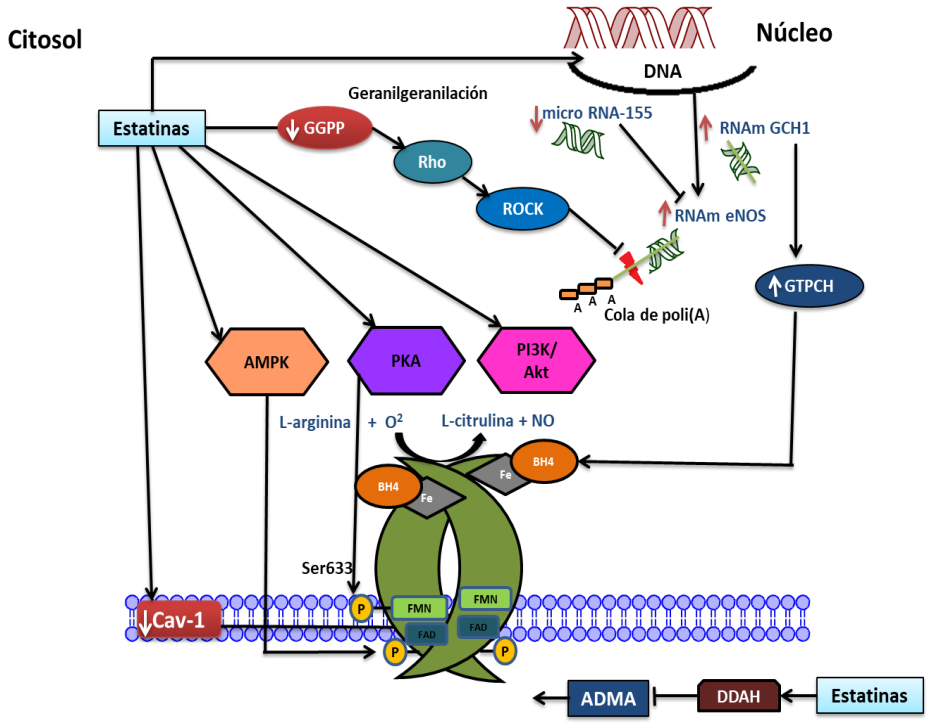


Figura 18. Efectos de las estatinas en la eNOS de las células endoteliales (CE). GGPP, geranilgeranil pirofosfato; ROCK, proteína quinasa asociada a Rho; GTPCH, guanosina trifosfato ciclohidrolasa; AMPK, proteína quinasa activada por adenosina monofosfato; PKA, proteína quinasa A; PI3K, fosfatidilinositol 3-quinasa; ADMA, dimetilarginina asimétrica; DDAH, dimetilarginina dimetilaminohidrolasa; CE, célula endotelial (Tomado y modificado de Margaritis, 2014).

Los mecanismos subyacentes relacionados con el papel cardioprotector de las estatinas están relacionados con numerosas acciones pleiotrópicas, que incluyen la inhibición de los eventos inflamatorios y la mejora de la función endotelial, además de una capacidad efectiva para reducir el colesterol. Estudios recientes llevados a cabo por Balakumar y Mahadevan, (2012)

sugieren una posible interacción entre las estatinas y los factores de transcripción nuclear como los PPAR, que también deberían tenerse en cuenta al analizar el efecto potencial de las estatinas en el tratamiento de las complicaciones cardiovasculares. Las estatinas tienen dos funciones principales: (i) un efecto de la reducción del colesterol a través de la inhibición de HMG-CoA-reductasa; (ii) una propiedad de activación de PPAR recientemente explorada, que podría mediar los efectos pleiotrópicos protectores cardiovasculares de las estatinas, que incluyen propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antifibróticas (**Figura 19**) (Balakumar y Mahadevan, 2012).

La interacción entre las estatinas y los PPAR, además de su efecto reductor del colesterol, puede ser un mecanismo clave de los efectos cardioprotectores que ejercen las estatinas (Balakumar y Mahadevan, 2012). Sheng y cols, (2005) investigaron el efecto de la atorvastatina sobre la hipertrofia inducida por la angiotensina II de los miocitos cardíacos en relación con los cambios en la expresión de ARNm de PPARα y PPARγ. El tratamiento con atorvastatina regulaba positivamente la expresión de PPARα y PPARγ y consecuentemente, inhibía la hipertrofia de los miocitos cardíacos in vitro al disminuir la expresión de ARNm de marcadores de hipertrofia cardíaca, como el péptido natriurético auricular (ANP), el péptido natriurético cerebral (BNP), MMP9, MMP2 e IL-1β (Sheng y cols, 2005). Posteriormente, se informó un potencial anti-hipertrófico in vivo de la atorvastatina. La administración de atorvastatina en ratas con sobrecarga de presión, impidió notablemente el desarrollo de hipertrofia cardíaca (evaluada en términos del aumento de la relación entre el peso cardíaco y el peso corporal, grosor de la pared ventricular izquierda y diámetro de los miocitos) atenuando la regulación negativa del ARNm de PPARγ e inhibiendo la expresión de ARNm de BNP, IL-1β y MMP9 (Ye y cols., 2006). Además, se ha demostrado que los ratones con deficiencia de apolipoproteína E (ApoE - / -) alimentados con "dieta estilo occidental" desarrollaron hipertrofia cardíaca y fibrosis por un aumento en la edad. Sin embargo, el tratamiento con simvastatina, inhibió el desarrollo de hipertrofia y fibrosis cardíaca en ratones ApoE - / - al aumentar significativamente la expresión de PPARα y PPARγ (Qin y cols., 2010). En conjunto, las estatinas tienen un efecto potencial en la prevención de anomalías cardíacas, incluida la hipertrofia cardíaca, a través de una activación pleiotrópica de PPARα y PPARγ en el corazón y la subsiguiente inhibición de la inflamación miocárdica y la fibrosis

cardíaca. En un estudio reciente por Shen y cols, (2010) han demostrado más que el pretratamiento con simvastatina, en un modelo de rata con bypass cardiopulmonar (BCP), disminuyó significativamente la expresión miocárdica de citocinas inflamatorias como TNF-α, IL-6 y MCP-1. Se sugirió que dicho efecto antiinflamatorio del miocardio de la simvastatina está relacionado en parte con la activación de PPARγ y la inhibición de la señalización de NF-κB (Shen y cols., 2010). Este estudio confirma, además, el hecho de que el efecto preventivo de las estatinas sobre la inflamación del miocardio, podría estar mediado por un mecanismo vinculado a PPAR.

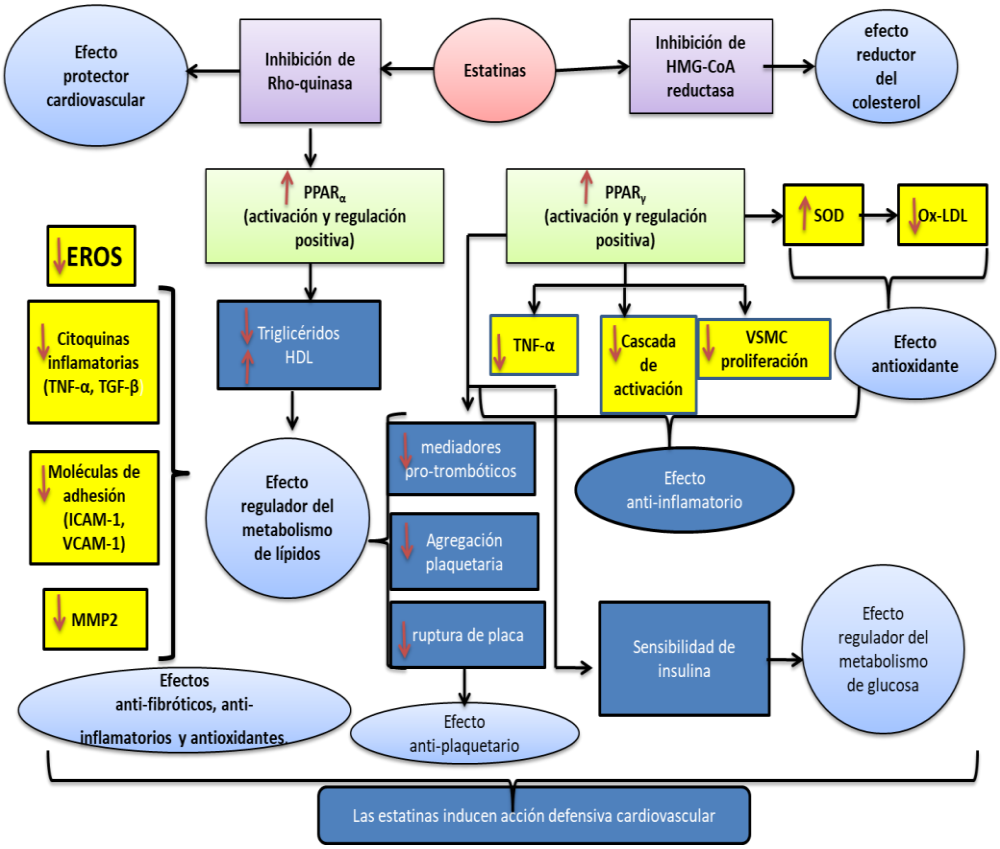


Figura 19. Mecanismos cardioprotectores de las estatinas y la interacción con PPAR (Tomado y modificado de Balakumar y Mahadevan, 2012).

1.14.7 Estatinas y el sistema nervioso autónomo

En la última década se han examinado cómo las neuronas de la RVLM regulan el SNA periférico, cómo se relacionan los sistemas simpático y renina-angiotensina y cómo se puede suprimir el sistema simpático, para prevenir los eventos cardiovasculares. Con base en resultados de estudios de patch-clamp, se ha encontrado que la angiotensina II potenció la actividad de las neuronas en la RVLM, un centro nervioso simpático, mientras que al bloquear

a los receptores de Ang II, se reduce la actividad neuronal de la RVLM (Kumagai y cols., 2012).

Una propiedad pleiotrópica de las estatinas que recibe poca atención, son sus efectos sobre el SNA. El aumento del flujo simpático central y la disminución del tono vagal cardíaco, son alteraciones características de un rango de condiciones cardiovasculares, para las cuales las estatinas ahora se prescriben rutinariamente para reducir los eventos cardiovasculares después del infarto agudo de miocardio (IAM), en la HTA, enfermedad renal crónica (ERC), insuficiencia cardíaca crónica (ICC) y DM (Millar y Floras, 2014). La posibilidad de que las estatinas también reduzcan el riesgo cardiovascular, al rectificar el control nervioso alterado del corazón y la circulación presente en muchas enfermedades ha recibido menos atención (Millar y Floras, 2014).

Las proteínas G están presentes y son funcionalmente activas en los sitios neuronales centrales, implicados en la generación de flujo simpático y parasimpático, como la RVLM, el NTS y el núcleo paraventricular (Millar y Floras, 2014).

En modelos experimentales con HTA o insuficiencia cardiaca (IC), una o más de estas regiones centrales del tallo cerebral, exhiben un EO elevado, con aumento de EROS (Por ejemplo niveles de TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico) y de O_2^- (Kishi y cols., 2004), niveles disminuidos de NO (Hirooka y cols., 2003; Biancardi y cols., 2011) y defensas antioxidantes (Chan y cols., 2006).

En pacientes con HTA, ERC e ICC tratados con estatinas lipofílicas, tales como simvastatina y atorvastatina, han mostrado reducir la actividad nerviosa simpática muscular (MSNA) en un 12 y 30% (Millar y Floras, 2014).

El incremento de EROS, tales como O_2^-, el NO inactivo, una importante molécula de señalización en el cerebro (Garthwaite y cols., 1995) reacciona con O_2^- y produce el $ONOO^-$, altamente reactivo y citotóxico (Vaziri y cols., 2002). Otra de las funciones que presentan las EROS en la RVLM, es el de equilibrar los aminoácidos excitadores e inhibidores, facilitando así la modulación de entrada de neuronas simpáticas premotoras (Nishihara y cols., 2012). Como consecuencia, el inhibidor ácido γ-aminobutírico (GABA), el cual es un

neurotransmisor del sistema nervioso central, se reduce en la RVLM de ratas hipertensas (Shinohara y cols., 2012). Un mecanismo responsable de dicho aumento del EO central, puede ser la activación patológica del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), que regula y actúa sobre los receptores centrales de angiotensina II tipo 1 (AT1), para aumentar la actividad de la NADPH oxidasa y EROS (Zimmerman y cols., 2002; Kishi y Hirooka, 2012). Otro mecanismo que puede estar implicado en el aumento de la actividad oxidante de la NADPH oxidasa, el O_2^-, y la actividad reguladora del receptor AT1, son las citocinas inflamatorias producidas por los macrófagos perivasculares del cerebro (Yu y cols., 2010; Zhang y cols., 2010).

Un mecanismo que interviene en el flujo simpático aumentado y el tono vagalcardíaco, es el desequilibrio neural central entre EROS y NO/antioxidantes. En modelos animales de HTA, la infusión icv (intracerebroventricular) de apocinina, un inhibidor de la NADPH oxidasa, administrado para reducir la producción de EROS a nivel neural central, disminuyen tanto la actividad del nervio simpático renal (RSNA), como la PA (Nagae y cols., 2009).

Por lo tanto, si se logra la entrada de las estatinas en el cerebro, estas podrían ejercer acciones inhibidoras simpáticas centralmente, al reducir el EO central mediado por EROS y al aumentar la producción o la disponibilidad de NO (Gao y cols., 2008). Si es así, estas propiedades podrían tener aplicaciones importantes para pacientes con afecciones como HTA, IAM, ERC, IC y DM, en quienes hay una elevada actividad simpática y una disminución de la modulación de FC (frecuencia cardíaca) vagal, y asociado con un mayor riesgo de hipertrofia ventricular, arritmias y mortalidad prematura (Schlaich y cols., 2003).

Las estatinas difieren con respecto a la lipofilia, lo que influye en su selectividad tisular. Las estatinas hidrofílicas como rosuvastatina y pravastatina, experimentan principalmente absorción hepática por un polipéptido transportador de aniones orgánico mediado por portadores, mientras que las estatinas lipofílicas (simvastatina, atorvastatina, fluvastatina y lovastatina) pueden difundirse pasivamente a través de las membranas celulares extrahepáticas (Hamelin y Turgeon, 1998). En consecuencia, las estatinas lipofílicas tienen un mayor potencial, para cruzar la barrera hematoencefálica e interactuar con las regiones cerebrales centrales implicadas en la generación o modulación de la actividad simpática y parasimpática

eferente (Millar y Floras, 2014). Hasta la fecha, debido a que la mayoría de los estudios que investigan posibles efectos autonómicos han administrado estatinas lipofílicas, los datos relativos a las estatinas hidrófilas son limitados (Millar y Floras, 2014).

1.14.7.1 Estudios experimentales de las estatinas sobre el SNA

La RVLM, es el centro vasomotor que determina la actividad nerviosa simpática basal (Takuya y cols., 2004). Por lo tanto, la integridad funcional de la RVLM es esencial para el mantenimiento del tono vasomotor basal (Takuya y cols., 2004).

En ratas espontáneamente hipertensivas propensas a ataques cerebrales (SHRSPs), a las cuales se les administro 30 días de atorvastatina oral, a dosis altas (50 mg / kg de peso corporal por día), se observó una reducción en la excreción urinaria de NE, a las 24 horas y en la PA (Kishi y cols., 2003). Estos efectos no se observaron en ratas control WKY (Wistar-Kyoto), a pesar de que la atorvastatina redujo el colesterol total y colesterol-LDL en ambos grupos. La atorvastatina aumentó la expresión de eNOS (corteza, cerebelo, hipotálamo, tronco encefálico y aorta) y NOS inducible (iNOS) (corteza, hipotálamo, tronco encefálico y aorta) en los grupos SHRSPs y WKY, pero no se detectó ningún efecto sobre la NOS neuronal (nNOS). El mismo tratamiento redujo los niveles elevados de TBARS en el RVLM y el cerebro completo de los SHRSP, pero no tuvo efecto en los animales WKY (Kishi y cols., 2008).

Está documentado que las estatinas interactúan con los sistemas neurohumorales, particularmente con las vías nerviosas simpáticas (Liao y Laufs, 2005). Los datos de estudios en animales y humanos muestran que las estatinas, pueden disminuir la actividad nerviosa simpática (Liao y Laufs, 2005).

Estudios clínicos han demostrado que la ICC, se asocia con una activación simpática aumentada o simpatoexcitación (Lie y cols., 2005) y función barorrefleja arterial alterada (Thames y cols., 1993). Esta excesiva activación simpática, es un pronóstico de muerte y complicaciones (Francis y cols., 1993) y por lo tanto, se ha considerado un objetivo terapéutico principal en el tratamiento de la ICC. Se ha demostrado que los inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa, como la simvastatina, normalizan el flujo simpático y la regulación del reflejo cardiovascular y restauran el equilibrio simpaticovagal en conejos con ICC inducida por estimulación (Pliquett y cols., 2003).

Estudios llevados a cabo por Zimmerman y cols, (2002) y por Ushio y cols, (1996) han demostrado que las EROS derivadas de la NADPH oxidasa inducidas por la AngII, juegan un papel importante en la regulación central de la actividad autonómica y la función cardiovascular en estados fisiológicos y patológicos (Griendling y cols., 1994).La estimulación del receptor AT_1 por Ang II, conduce no solo a la activación directa de la NADPH oxidasa, generadora de O_2^- , sino también a la expresión de las subunidades que componen esta enzima (Fukui y cols., 1997). La Ang II es un factor predominante que conduce a una mayor producción de radicales libres por la activación de la NADPH oxidasa, por la estimulación del receptor AT_1 (Griendling y cols., 1994).

En un estudio reciente en conejos con ICC llevado a cabo por Gao y cols (2004), demostraron que la expresión génica del receptor de AT_1 y de las subunidades de la NADPH oxidasa (p40 phox, p47 phox, y gp91 phox) y la producción de O_2^-, estaban regulados positivamente en la RVLM y que estos factores juegan un papel crítico en la simpatoexcitación observada en la ICC. Se ha demostrado que la vía NFkB, puede mediar el aumento de la actividad del nervio simpático en la ICC, y que su bloqueo de esta vía reduce el flujo de salida simpático, la expresión del receptor AT_1 y el EO en ratas con ICC (Node y cols., 2003).

Por otro lado, estudios in vivo, han demostrado que el tratamiento con simvastatina, produce efectos beneficiosos en la función autonómica en el estado de la ICC, causando la disminución de la expresión del RNAm del receptor AT_1 y produciendo de esta manera una expresión y actividad regulada negativamente de la NADPH oxidasa (p40 phox , p47 phox , y gp91 phox) y una disminución de O_2^- en la RVLM. Estos datos sugieren que estos mecanismos contribuyen a la inhibición del flujo de salida simpático y la normalización de la regulación barorrefleja cardiovascular en la ICC.

El efecto benéfico de la simvastatina en la función autonómica durante la ICC, se observó en la reducción de la producción de radicales en la RVLM. Por otra parte, se sabe que una fuente primaria de producción de EROS, es el sistema NADPH oxidasa (Rajagopalan y cols., 1996). El O_2^- se produce al ensamblarse las proteínas citosólicas Rac-1, p67phox, p47phox y p40phox con las proteínas transmembrana gp91phox y p22phox (Suh y cols., 1999). La GTPasa Rac1, parece ser crucial para la activación de la enzima NAPH oxidasa. Esto requiere

la translocación de Rac1 del citosol a la membrana celular, como se ha demostrado en los neutrófilos (Rinckel y cols., 1999). Además se ha demostrado que la simvastatina, redujo la translocación de Rac1 del citosol a la membrana celular e inhibió la actividad de Rac1 (Wassmann y cols., 2002), los estudios han sugerido que la modulación de la expresión de la subunidad, es decisivamente importante para la actividad general de la NADPH oxidasa (Lassegue y cols., 2001).

Se han estudiado los efectos simpaticolíticos de las estatinas en diversas poblaciones, utilizando diferentes métodos de análisis de la activación simpática. Los estudios en los que la VFC, se utilizó como el método indirecto de evaluación de la función autonómica, mostraron que después del tratamiento con estatinas, se obtuvo un aumento en el espectro de potencia total de la VFC y reducción de la relación de oscilaciones de baja/alta frecuencia (LF/HF) en el análisis de dominio de frecuencia, así como un aumento en la desviación estándar de lo intervalos RR consecutivos del corazón (DERR); en el análisis del dominio del tiempo (Riahi y cols., 2002). Se realizó un metanálisis de estudios aleatorizados en pacientes con presión arterial normal, hipertensión arterial e insuficiencia cardíaca crónica, controlados con placebo y usando diferentes dosis de estatinas, en el cual utilizaron la microneurografía o llamada también actividad nerviosa simpática muscular (MSNA), para evaluar el efecto simpaticolítico de las estatinas, llevado a a cabo por Lewandowski y cols, (2015). En este estudio, la actividad nerviosa simpática medida por MSNA, fue menor en el grupo con estatinas con respecto al grupo placebo (Lewandowski y cols., 2015). El principal hallazgo del metanálisis, es que las estatinas, en comparación con el placebo, reducen la actividad simpática medida por microneurografía. La microneurografía es un método directo, para medir el flujo simpático, cuyos resultados se correlacionan en gran medida con otros métodos de investigación de la actividad simpática, incluida la liberación de NE en plasma (Grassi y Esler, 1999).

En un estudio con 6 semanas de terapia con atorvastatina en pacientes con enfermedades renales crónicas, dieron como resultado una disminución de MSNA, mientras que la PA no cambió (Siddiqi y cols., 2011). En otro estudio de pacientes con ICC, el tratamiento reiniciado con estatinas, también disminuyó el MSNA, mientras que no afectó a los niveles de NE plasmática ni a la PA (Gomes y cols., 2010). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que en los estudios analizados, solo se investigaron los efectos de la simvastatina y la

atorvastatina. Ambas estatinas son lipofílicas y tienen un mayor potencial para cruzar la barrera hematoencefálica, por lo que pueden incidir fácilmente en las regiones del sistema nervioso central, involucradas en la modulación del equilibrio autónomo (Horwich y cols., 2011).

Un estudio reciente llevado a cabo por Barreto y cols, (2009) mostraron que el aumento de la actividad nerviosa simpática muscular (MSNA), fue un predictor independiente significativo de la mortalidad cardíaca a 1 año en pacientes con IC (Barreto y cols., 2009). La MSNA sigue siendo alta en pacientes con IC, lo que hace que el SNS sea un objetivo farmacológico primario, en el tratamiento de la IC (Deo y cols., 2012).

Estudios en conejos con ICC inducida por taquicardia ventricular crónica, han demostrado que la terapia con estatinas reduce el flujo simpático central, esta disminución inducida por estatinas en la actividad simpática, se debe a una reducción del O_2^- en la RVLM del tronco del encéfalo, el centro primario para el control central de la actividad nerviosa simpática (Zucker y Gao, 2006).

La mejora en la función del sistema nervioso autónomo, con el tratamiento de estatinas, se ha demostrado en modelos animales con ICC (Deo y cols., 2012). Pliquett y cols, (2003) estudiaron la función autonómica en conejos con ICC con respecto a conejos normales (control), evaluando la VFC. Los conejos con ICC, presentaron una VFC disminuida significativamente, la cual se evaluó mediante la DERR y el análisis espectral de potencia, en comparación con los controles. Sin embargo, los conejos con ICC, a los cuales se les dio tratamiento con simvastatina durante tres semanas presentaron una VFC más alta que los conejos con ICC no tratados con simvastatina (Pliquett y cols., 2003). En otro estudio llevado a cabo por Gao y cols, (2005) se demostró que los niveles plasmáticos de NE fueron elevados en conejos con ICC, en comparación con los controles; sin embargo, los niveles de norepinefrina fueron significativamente más bajos en conejos con ICC, que recibieron simvastatina en dosis moderadas a altas en comparación con los animales con ICC tratados con estatinas. La actividad nerviosa simpática renal (RSNA), medida directamente por electrodos implantados quirúrgicamente, también confirmó una simpatoexcitación menor en aquellos conejos con ICC tratados con simvastatina (Gao y cols., 2005).

2. Antecedentes

La diabetes se ha convertido en una epidemia y se mantiene como un importante problema de salud pública. Con el aumento de los costos y la creciente incidencia de la diabetes, es cada vez más importante comprender los mecanismos que conducen a la enfermedad

La hiperglucemia causa daño a diversos tejidos del cuerpo, dando lugar al desarrollo de complicaciones de salud potencialmente mortales, asociadas con disfunción de diferentes órganos, especialmente en ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos (ADA, 2016). La Diabetes afecta a 415 millones de personas a nivel mundial y se estima que en el año 2040, alcance los 642 millones de personas (Whitting y cols., 2015). En México la prevalencia de la diabetes es del 15.8% (20-79 años). Durante las últimas décadas el número de personas que padecen diabetes en México se ha incrementado y actualmente figura entre las primeras causas de muerte (ENSANUT, 2012. Los datos de la ENSANUT 2012 identifican a 6.4 millones de adultos mexicanos que han recibido un diagnóstico de diabetes (Schnell, 2013).

Se ha establecido que el incremento del estrés oxidativo tiene un papel crítico en las complicaciones de la diabetes, provocando un desequilibrio entre la producción de EROS y el sistema de defensa antioxidante (Tesfaye y cols., 2010). Varios estudios han demostrado que el EO posiblemente activado por anomalías vasculares y asociado a la microangiopatía en el nervio, es un proceso patológico clave en la inducción de daño nervioso durante la diabetes tanto en seres humanos como en modelos experimentales (Tesfaye y cols., 2010).

La hiperglucemia y el entorno metabólico adverso en pacientes con DM producen un aumento del estrés oxidativo y nitrosativo, que puede causar daño/disfunción neuronal directa, así como disfunción endotelial que produce isquemia neuronal. Los axones neuronales son ricos en mitocondrias, lo que los hace particularmente susceptibles a los efectos directos e indirectos sobre el estrés oxidativo y nitrosativo (Dimitropoulos y cols., 2014). La neuropatía en la DM puede conducir a anomalías en la respuesta de la vasculatura coronaria a la estimulación simpática, que puede manifestarse clínicamente como taquicardia en reposo o bradicardia, intolerancia al ejercicio, hipotensión ortostática, pérdida de la disminución nocturna en la PA o isquemia miocárdica silenciosa en las pruebas cardíacas. Un indicador temprano de la neuropatía autonómica cardiaca es la reducción de la VFC, que se puede evaluar

cualitativamente en la clínica (Ferranti y cols, 2014). Los datos limitados sugieren que la isquemia miocárdica silenciosa es más común en presencia de NAC (Ferranti y cols., 2014). Las estimaciones de la prevalencia de la NAC en la DM1 varían ampliamente, en parte debido a las diferentes definiciones y métodos de ensayo. La NAC puede afectar hasta el 40% de los individuos con DM1 (Ferranti y cols., 2014).

Se ha demostrado que la reducción de la VFC como marcador de la disfunción autonómica tiene graves consecuencias en términos de morbilidad (Vinik y cols., 2013).

La hiperglucemia de largo plazo es un factor importante en el desarrollo de complicaciones microvasculares (como la nefropatía diabética, neuropatía y retinopatía) y macrovasculares (como la enfermedad arterial coronaria (EAC), complicaciones arterial periférica y el accidente cerebrovascular (Shahbaj y cols., 2015). Las neuropatías se encuentran entre las complicaciones más comunes a largo plazo de la diabetes, que afectan hasta el 50% de los pacientes y es la complicación más común y costosa tanto de la DM1 como de la diabetes DM2 (Shahbaj y cols., 2015). Las Neuropatías diabéticas, incluyendo la NAC, son una complicación crónica común de la DM1 y DM2 y confieren una alta morbilidad y mortalidad de los pacientes diabéticos (Justin y Shuil, 2011).

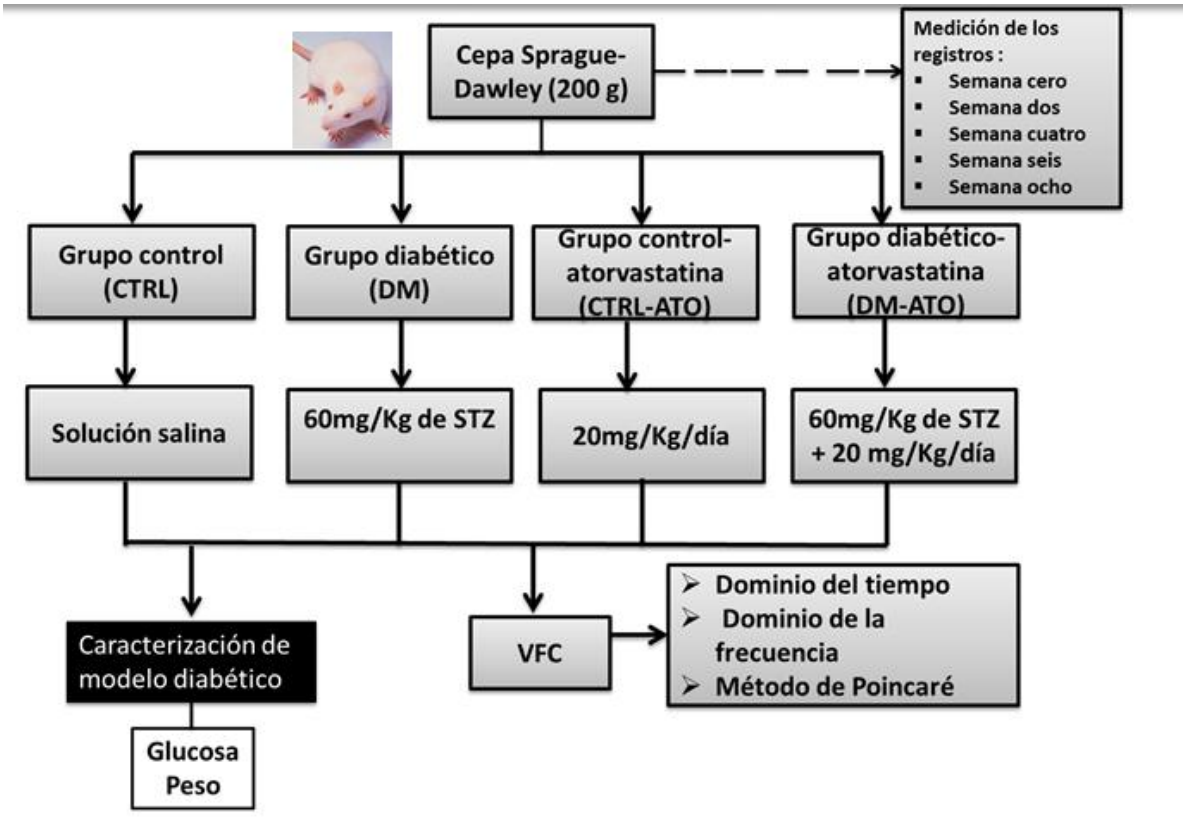
Las primeras manifestaciones de la NAC son el aumento del control simpático, presentando una desregulación del funcionamiento del sistema nervioso autónomo sobre el corazón, disminuyendo la VFC. Estos factores se asocian con mayor riesgo de desarrollar muerte súbita cardiaca. Por lo que un indicador temprano del diagnostico de la NAC es la VFC, que puede evaluarse cualitativamente en la clínica mediante el registro de un ECG (de Ferranti y cols., 2014).

3. Justificación

La hiperglucemia presente en la diabetes ha sido asociada con un mayor riesgo de deterioro cardiovascular, siendo la principal causa de muerte. La neuropatía autonómica cardiaca (NAC) es una de las complicaciones crónicas de la DM. Actualmente no existe un tratamiento específico para el tratamiento de la NAC, sin embargo se han empleado antioxidantes como el ácido α lipoico. En pacientes diabéticos como en modelos animales, se ha demostrado que la

concentración de marcadores de estrés oxidativo como el O^{-2} y malonaldehído (MDA), se encuentran incrementados en el corazón, vasos sanguíneos y las fibras nerviosas periféricas. Los efectos de las estatinas sobre la función del sistema nervioso autónomo se han estudiado en modelos experimentales con enfermedades que derivan a daños cardiovasculares como: hipercolesterolemia (Pelat y cols., 2013), síndrome metabólico (Da-Silva y Cols., 2011), hipertensión (Kishi y cols., 2011) y la diabetes (Matsuki y cols., 2010). En pacientes con hipercolesterolemia (Melenovsk y cols., 2003), así como con diabetes (Raluca y cols., 2014), se han evaluado los efectos terapéuticos de las estatinas sobre la función autonómica. Estos estudios muestran que las estatinas ofrecen un efecto benéfico sobre las funciones autonómicas y cardiovasculares, sin embargo no ha sido completamente dilucidado. Es ampliamente conocido que las estatinas ejercen efectos benéficos sobre la EAC al disminuir las LDL-C, sin embargo, varios efectos potencialmente cardioprotectores se han atribuido a estos medicamentos de forma independiente al efecto hipolipemiente (Bonetti y cols., 2002) llamados pleiotrópicos. Las acciones pleiotrópicas de las estatinas incluyen mejora en las placas de aterosclerosis y la regulación autonómica, las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antitrombóticas (Liao & Laufs., 2005). También se ha reportado que las estatinas modifican las corrientes iónicas y por lo tanto pueden incidir directamente en las propiedades electrofisiológicas del corazón de estados patológicos como en las arritmias. Además, se ha observado que las estatinas aumentan la modulación simpático-vagal de la frecuencia cardíaca y mejoran el nivel de la VFC en pacientes con hipercolesterolemia (Welzig y cols., 2003).Las estatinas independientemente de la disminución de lípidos en la sangre, presentan diversos efectos pleiotrópicos, como antioxidantes, cardioprotectores, anti-inflamatorios, neuroprotectores, entre otros. Por tal motivo se planteó la utilización de estatinas, en particular a la atorvastatina en un modelo animal con DM 1, para estudiar los posibles efectos que presentan la atorvastatina sobre la variabilidad de la frecuencia durante la diabetes. Por esta razón esta tesis se enfatizó inicialmente a la evaluación de la disautonomia diabética cardiaca por medio del análisis de la VFC y posteriormente a la evaluación del efecto de la Atorvastatina sobre la reducción de dicha modulación simpático-vagal presente durante la DM1. Con los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, se podrá estudiar en un futuro los mecanismos bioquímicos y genéticos en los que participa la atorvastatina que expliquen la mejora de la disautonomia cardiaca durante la DM1.

4. Diagrama de trabajo



5. Hipótesis:

La atorvastatina reduce los cambios en la variabilidad de la frecuencia cardiaca inducidos por la DM experimental.

6. Objetivos:

6.1 General:

Evaluar el efecto cardioprotector de la atorvastatina sobre la VFC en un modelo de Diabetes mellitus experimental mediante el registro de un ekg.

6.2 Particulares:

a) Evaluar el efecto protector de la atorvastatina en los cambios en la VFC por el método del dominio del tiempo, método de la frecuencia y el por el diagrama de Poincaré.

b) Evaluar el efecto de la atorvastatina de la VFC sobre el balance simpático vagal mediante el método de la frecuencia.

c) Evaluar el efecto de la atorvastatina sobre el intervalo QT mediante el registro de los intervalos electrocardiográficos.

7. Metodología

7.1 Modelo animal

Para la realización de la parte experimental se emplearón ratas macho de la cepa Sprague-Dawley con un peso de 200 g. proporcionadas por 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 atorvastatina (CTRL ATO) y el grupo diabético con atorvastatina (DM ATO). Los animales tuvieron acceso a comida y agua ad líbitum durante todo el estudio. El uso y cuidado de los animales fue regido por el comité institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio y según la NOM-062-ZOO-1999.

7.2 Modelo experimental de diabetes mellitus

Para la inducción de la diabetes mellitus en las ratas wistar macho, se administró una concentración de 60 mg/kg de peso; ip de STZ, esto se realizó al inicio de la fase experimental; en el día cero. La diabetes fue inducida para el grupo diabético y el grupo diabético atorvastatina. Para el grupo control y control atorvastatina se administró solución salina (0.9%). A las 48 horas después de la inducción con STZ se cuantificarón los niveles sanguíneos de glucosa mediante un glucómetro (Contour®TS, Bayer), empleando una muestra de sangre venosa obtenida por punción de la cola de la rata. Valores de glucosa $\geq$ 350 mg/dL fueron considerados como hiperglucemia (Howart y cols., 2005), es decir presencia de diabetes mellitus en el animal. Para la caracterización del modelo de diabetes mellitus experimental se evaluó la concentración de glucosa en sangre y el peso cada dos semanas a partir de la semana cero, hasta la semana ocho.

7.3 Tratamiento con atorvastatina

El tratamiento con atorvastatina se realizó por vía oral empleando una dosis de 20mg/Kg/día y se inició una vez que los animales presentarón hiperglucemia y se siguió por 8 semanas. Se administró la atorvastatina al grupo diabético atorvastatina (DM ATO) y al grupo control atorvastatina (CTRL ATO).

7.4 Administración oral de la atorvastatina

Para la administración del fármaco se utilizó una sonda esofágica, la cual se colocó en una jeringa de 3mL, posteriormente se tomó la solución del tubo eppendorf con el fármaco (atorvastatina) disuelto. Finalmente, se realiza la administración de la solución del fármaco por vía oral en el roedor.

7.5 Registro de electrocardiograma

El registro del electrocardiograma (EKG), es una medición de la actividad eléctrica del corazón. La cual se realizó colocando electrodos en lugares específicos del cuerpo, para obtener una representación gráfica, o trazado de la actividad eléctrica. Las señales del EKG se registraron para examinar la variabilidad de la frecuencia cardiaca (VFC) y el análisis de la morfología de los parámetros electrocardiográficos, mediante la medición de los intervalos electrocardiograáficos. En el presente trabajo de tesis se realizó el registro del EKG en un horario de 8:00-11:00 a.m, las ratas se trasquilarón desde la región torácica hasta la región epigástrica donde se colocarón los electrodos de acuerdo a la derivación II del plano frontal introducida por Einthoven (electro negativo en la extremidad derecha delantera y el electrodo positivo en la extremidad izquierda trasera) (Tarvainen y cols., 2014).

7.6 Procesamiento del registro de EKG

Posteriormente el análisis del registro de ekg se llevó a cabo mediante la utilización del software de análisis de datos LabChart, el cual detecto la señal eléctrica amplificada del corazón en mV, mediante el Bioamplificador (BIO Amp CF, ADInstrumets), y posteriormente se digitalizo por el equipo Powerlab 4/35 ADInstruments, transmitiéndose finalmente al software LabChart 7 (ADInstruments); donde se capturó el EKG y se realizarón las mediciones como el análisis de los intervalos electrocardiográficos y el análisis de la VFC.

El registro del EKG fue efectuado previo a la administración de STZ; semana cero, semana 2, semana 4, semana 6 y semana 8. En cada caso, el registro del EKG contó con una duración de 60 minutos.

7.7 Obtención de los parámetros electrocardiográficos

Se cuantificarón los intervalos PR, QRS y QT del EKG. Todos ellos fueron medidos con ayuda del software LabChart 7 (ADInstruments) y fueron expresados en milisegundos (ms). Para cada caso, se consideró como valor real la media de tres mediciones obtenidas a partir de

tres ciclos cardiacos consecutivos. Estos análisis electrocardiográficos consistieron en la medición del intervalo PR, el cual consiste en la medición a partir del principio de la onda T, hasta el terminó de la onda R. Después se midio el complejo QRS, el cual se mide a partir de la onda Q hasta el termino de la onda S. Y por último se mide el intervalo QT, el cual se mide a partir del inicio de la onda Q, hasta el término de la onda T (**Figura 20**).

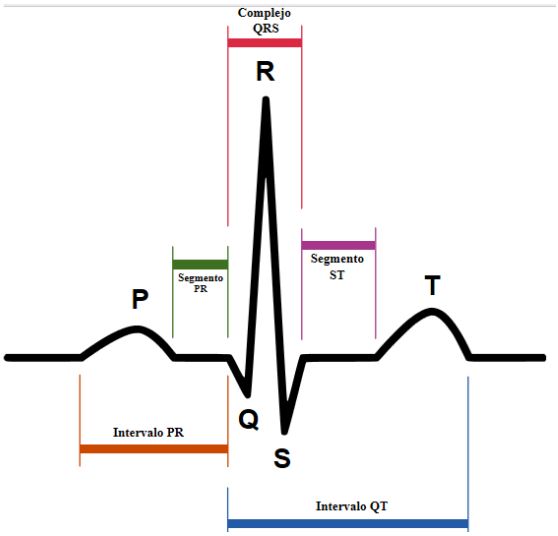


Figura 20. Señales típicas de un electrocardiograma la onda P, el complejo QRS, onda T y los intervalos eléctrocardiográficos (PR, QRS y QT) (Tomado y modificado de Howart y cols., 2009).

A continación se explican que representan cada uno de los intervalos electrocardiográficos y como se miden:

Intervalo PR: Representa la propagación de la despolarización de las aurículas hacia los ventrículos cardiacos. El intervalo PR se determina midiendo el tiempo desde el comienzo de la onda P hasta el comienzo del complejo QRS (**Figura 20**). El análisis de la duración del intervalo PR es crucial en el diagnóstico de los bloqueos auriculoventriculares (Sugiyama y cols., 2005).

Intervalo QRS: Muestra el tiempo de propagación de la despolarización a través de los ventrículos (**Figura 20**). El análisis de la longitud de los complejos QRS proporciona datos importantes sobre la actividad eléctrica del corazón (Sugiyama y cols., 2005).

Intervalo QT: Representa la despolarización y la repolarización de los ventrículos (**Figura 20**) La duración de este intervalo puede indicar alteraciones en la actividad eléctrica del corazón debido y también puede prologarse a diversos factores como a la presencia de problemas cardiovaculares, como infarto al miocardio, isquemia, incluido el síndrome de QT prolongado (Sugiyama y cols., 2005).

7.8 Análisis de la variabilidad de la frecuencia cardiaca

La variabilidad de la frecuencia cardiaca describe las variaciones entre los latidos cardiacos consecutivos con respecto al tiempo (Shaffer y Ginsberg, 2017).El ritmo del corazón es controlado por el nodo sinoatrial (SA), el cual es modulado tanto por la fibras del sistema parasimpático y simpático del sistema nervioso autónomo, por tal motivo la VFC evalúa el funcionamiento del SNA sobre el corazón (Tarvainen y cols., 2014).

En individuos normales, la frecuencia cardiaca tiene un alto grado de variabilidad de la frecuencia cardiaca (VFC) latido a latido, mientras que la variabilidad de la frecuencia cardiaca se puede disminuir por alguna patología como la neuropatía autonómica cardiaca y el envejecimiento (Kleiger y cols., 1987). En términos generales, la actividad simpática tiende a aumentar la FC y disminuir la VFC, mientras que la actividad parasimpática tiende a disminuir la FC y aumentar la VFC (Tarvainen y cols., 2014). La disminución de la VFC se asocia con un mayor riesgo de mortalidad en pacientes con problemas cardiovasculares (Pereira-Junior y cols., 2008).

Para la realización del análisis de la VFC, se capturarón 20 minutos de cada registro del EKG obtenidos del Labchart, que posteriormente se analizarón en el software Kubius HRV 2.1 (University of Eastern Finland). El Kubios HRV 2, es un software avanzado y fácil de usar para el análisis de la variabilidad de la frecuencia cardíaca (VFC). El software admite varios formatos de datos de entrada para los datos del electrocardiograma (ECG) y los datos del intervalo ntre cada latido del corazón. Incluye un algoritmo adaptativo de detección de QRS y de herramientas para corrección de las señales y selección de muestras de análisis (Pop-Busui, 2010). El software calcula todos los parámetros de la VFC en el dominio de tiempo, dominio de la frecuencia, así como parámetros no lineales como el diagrama de Poincaré. Los

diferentes métodos que evalúan la VFC se explican a continuación (Tarvainen y cols., 2014; Pop-Busui, 2010).

7.8.1 Análisis de la VFC en el dominio del tiempo

Para análisis de la VFC por el método en el dominio del tiempo son computacionalmente simples y se aplican directamente a la serie de sucesivos valores de intervalos RR. Los parámetros que evalúan la VFC, incluyen el intervalo RR, la desviación estándar de los intervalos RR (DERR); que refleja la variación general (tanto a corto como a largo plazo) dentro de la serie de intervalos RR, y la raíz cuadrada de la media de las diferencias de los intervalos RR adyacentes al cuadrado (RMSSD); que se utiliza como una medida de la variabilidad a corto plazo, ambos índices fueron expresados en milisegundos. Estos parámetros estadísticos se realizarón mediante las siguientes ecuaciones por el programa Kubius HRV 2.1 (University of Eastern Finland):

La desviación estándar de los intervalos RR consecutivos del corazón (DERR)

$$\textbf{DERR (ms)} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n} (RRi - RR)^2}$$ (Rajendra y cols., 2006),

Donde:

RR_i= Valor de cada intervalo RR

RR= Media de los intervalos RR

La DERR refleja en general tanto a corto plazo como a largo plazo la variación dentro de la serie de intervalos RR consecutivos del corazón.Esta medida evalua la magnitud de las variaciones temporales en el ritmo cardiaco modulado de forma autónoma (Wang y Huang, 2012).

La variabilidad del ritmo cardíaco, es una medida que indica la cantidad de variación que hay en los latidos de su corazón dentro de un marco de tiempo específico. La unidad de medida es milisegundos (ms) (Vesterinen y cols., 2013). Si los intervalos entre los latidos del corazón son bastante constantes, la VFC es baja. Sin embargo cuando la longitud de los intervalos RR

con respecto al tiempo varía, la VFC es alta (Huatala y cols., 2006; Vesterinen y cols., 2016; Vesterinen y cols., 2013).

El otro parámetro estadístico de la VFC en el dominio del tiempo es la RMSSD, el cual se define como la raíz cuadrada de la media de las diferencias de los intervalos RR adyacentes al cuadrado (RMSSD) dada por la ecuación siguiente:

$$\textbf{RMSSD} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n} (RRi - RRi + 1)^2}$$ (von Borell y cols., 2007),

Donde:

RRi= Valor de cada intervalo RR

RRi+1= Valor del intervalo RR siguiente

El RMSSD es una medida de la VFC a corto plazo de los intervalos RR, que refleja la integridad del control autónomo del corazón, mediada por el nervio vago (Rodas y cols, 2008; DeGiorgio y cols, 2010).

7.8.2 Análisis de la VFC mediante el registro del intervalo RR mediante un tacograma

Para análisis del intervalo RR, este se midió a partir del inicio de la onda R con respecto a la siguiente onda R o latido cardiaco consecutivo (**Figura 21**). El intervalo RR es el tiempo transcurrido entre dos ondas R consecutivas en el EKG.

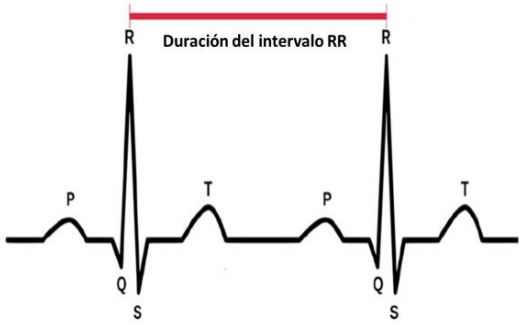


Figura 21. Duración del intervalo RR del corazón. Cada onda R indica un latido cardiaco, por lo que el intervalo entre dos ondas (R-R); es el intervalo entre dos latidos cardiacos (Tomado y modificado de Cancino, 2011).

Posteriormente la variación de la duración de los intervalos RR con respecto al tiempo, es decir la medición de cada uno de ellos, se transportaron en un tacograma donde se graficaron en las abcisas la duración de cada uno de los intervalos RR cosecutivos y en el eje de las ordenadas; el número de intervalos RR consecutivos del corazón (**Figura 22**).

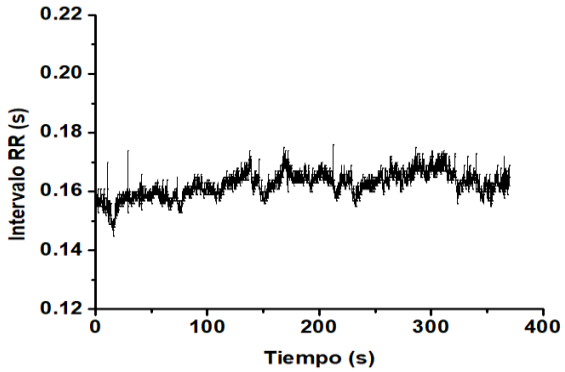


Figura 22. Tacograma de intervalo RR de una señal del EKG en función del tiempo de una rata control de semana cero.

7.8.2 Análisis de la VFC en el dominio de la frecuencia

El análisis de la VFC en el dominio de la frecuencia evalúa el control del SNA sobre el corazón. Este análisis consiste en la medición del espectro de frecuencias de la VFC, la cual se obtiene a partir de la transformada rápida de Fourier, la cual transforma la energía (potencia) de la señal RR en diferentes componentes frecuenciales; estos diversos componentes espectrales se correlacionan con los diferentes componentes del sistema nervioso autónomo; llamados oscilaciones de baja frecuencia (LF) y oscilaciones de alta frecuencia (HF) (Tarvainen y cols., 2014;Ribeiro y cols., 2016). Las oscilaciones de HF (0.15-0.40 Hz) está

modulada por el sistema nervioso parasimpático y las oscilaciones de LF (0.04-0.15 Hz) reflejan la modulación simpática, mientras que la modulación simpático-vagal se evalúa midiendo la proporción simpático/parasimpático (LF/HF) (Ribeiro y cols., 2016;Tarvainen y cols., 2014).

Para cada uno de los componentes frecuenciales se obtuvo el poder total expresado en % y solo para LF y HF se obtuvo el poder total expresado en unidades normalizadas (un). La representación de LF y HF en unidades normalizadas; enfatiza el comportamiento controlado y equilibrado de los sistemas del sistema nervioso autónomo (Task Force of the European Society of Cardiology, 1996).

Los porcentajes se calcularon en base a las contribuciones de cada componente con respecto al poder total y las unidades normalizadas (UN) se calcularon en base a la ecuación siguiente:

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

Asimismo se obtendrá el cociente LF/HF a partir de los valores expresados en UN para la medición del balance simpático vagal.

7.8.3 Análisis de la VFC en el método no lineal de Poincaré

El método no lineal implementado en el software, es el diagrama de Poincaré que evalúa la VFC, la cual representa la variabilidad de latido a latido.El diagrama de Poincaré proporciona una representación visual de los datos RR, en el cual se grafica en el eje X, el RR_n (ms) y en el eje Y, el RR_{n+1}(**Figura 23**). El análisis de la VFC computarizado por el software kubius ajustó una elipse alrededor de la nube de distribución de puntos (intervalos RR), orientados a lo largo de la línea de identidad (LI) (LI; línea donde $RR_n = RR_{n+1}$ (Tarvainen y cols., 2014). El ancho y la longitud de la elipse están determinados por las desviaciones estándar de los puntos perpendiculares a lo largo de la LI y se indican con SD1 y SD2, respectivamente (Tarvainen y cols., 2014). La desviación estándar SD1 representa la variabilidad instantánea de latido a latido de los datos a corto plazo, mientras que la desviación estándar SD2 proporciona una cuantificación de los intervalos RR continuos a largo plazo. Considerando que SD1 mide la variabilidad a corto plazo, mientras que SD2 mide la variabilidad a largo plazo; respectivamente dados por las ecuaciones siguientes:

$$SD1 = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n} (DiM)\,2} \qquad SD2 = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n} (Dim\ )\,2}$$

(Brennnan y cols., 2001).

Donde:

DiM: Distancia de un punto con respecto al eje mayor de la elipse

Dim: Distancia de un punto con respecto al eje menor de la elipse

Ambos índices fueron expresados en milisegundos (ms).

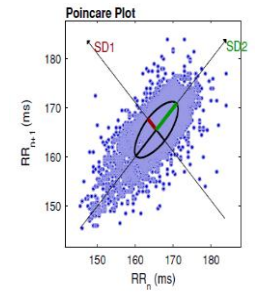
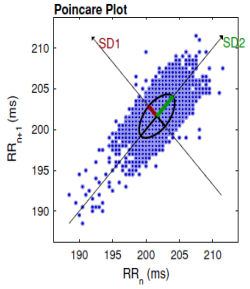
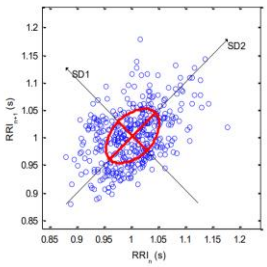
	
A)Rata control	B) Rata diabética
SD1: 3.1 ms SD2: 7.6 ms	SD1: 1.7 ms SD2: 3.4 ms

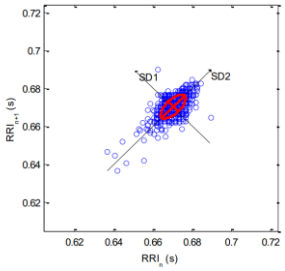
Figura 23. Análisis de la VFC por el Diagrama de Poincaré mediante el uso del software Kubius 2.1, para una rata control A) y una rata diabética B); con sus respectivos paramétros estadísticos SD1 y SD2.



A) Persona sana

SD1: 37.4 ms

SD2: 60.0 ms



B) Persona enferma

SD1: 3.8 ms

SD2: 8.2 ms

Figura 24. Análisis de la VFC por el Diagrama de Poincaré mediante el uso del Software 2.1, para una persona sana A) y una persona con enfermedad cardiaca B); con sus respectivos parámetros estadísticos SD1 y SD2.

7.9 Análisis estadístico

Para la evaluación del modelo diabético, en el cual se cuantificaron los parámetros de peso y glucosa, los cuales se graficaron mediante el promedio ± EEM para el grupo control y diabético (t student, *$p<0.05$), utilizando el programa GraphPad Prims 6.0, el cual proporcionó los datos estadísticos y las gráficas.

Los datos de la VFC para el dominio del tiempo y de la frecuencia se llevo acabo empleando el promedio ± EEM t-student, *$p<0.05$), para los grupos control, diabético y diabético atorvastatina comparándolo entre dos grupos. Las graficas obtenidas se realizaron utilizando el programa Origin.

Para la obtención de los resultados de los intervalos electrocardiográficos se llevo a cabo el promedio ± EEM, ANOVA de una vía, post test Bonferroni, ***$p<0.001$ para cada unos de los grupos experimentales (grupo control, grupo diabético, grupo control atorvastatina y grupo diabético atorvastatina). La gráfica y el análisis estadístico se llevo a cabo en el programa GraphPad Prims 6.0.

8. Resultados

8.1 Características generales del modelo experimental de Diabetes Mellitus inducida por Estreptozotocina

8.1.2 Peso y glucosa

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. El registro de peso fue de 334.3 ± 9.257 g para el grupo CTRL y 183.4 ± 3.5g para el grupo DM (**Figura 25**), mientras los valores de glucosa plasmática fueron de 128.6 ± 4.0 mg/dL vs 427.4 ± 7.8 mg/dL, en los grupos CTRL y DM respectivamente (**Figura 25**) y **Tabla 2**.

A) B)

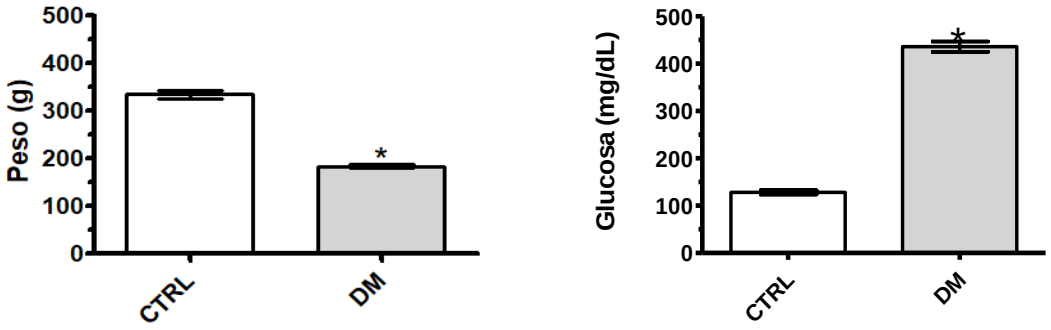


Figura 25. Registro de peso (A) del grupo control (CTRL) y grupo diabético (DM) al inicio de la fase experimental (semana cero) y en la semana ocho y registro de la concentración de glucosa (B) del grupo control (CTRL) y el grupo diabético (DM) a las 0 horas y 48 horas después de la administración de STZ. Para cada caso los datos graficados se representan como la media ± el EEM para el grupo control (CTRL) y diabético (DM) (t student, *p<0.05).

	Peso (g)	**Glucosa (mg/dL)**
Control (CTRL)	334.3 ± 9.257	128.6±4.0 mg/dL
Diabético (DM)	183.4 ± 3.5g *	427.4±7.8 mg/dL *

Tabla 2. Caracterización del modelo de diabetes mellitus experimental Registro de Peso y glucosa para el grupo control y grupo diabético.

8.2 Análisis de la VFC en el dominio del tiempo

En el tacograma de la **Figura 26** 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-ATOR. El intervalo RR obtenido en el grupo DM presenta un incremento significativo respecto al valor obtenido en el grupo CTRL (**Figura 26**). El intervalo RR fue de 183.4 ± 11.0 ms en el grupo DM y 162.3± 7.5ms en el grupo CTRL. No se obtuvo diferencia significativa en el intervalo RR entre los grupos CTRL y CTRL-ATO (**Tabla 2**). El tratamiento con atorvastatina, en el

grupo DM-ATO resulto en un una disminución del intervalo RR en relación al grupo DM, el cual no recibió tratamiento. En el grupo DM-ATO, el intervalo RR fue de179.5 ± 27.0 ms. Debido a que la frecuencia cardiaca es inversamente proporcional a la duración del intervalo RR, en el grupo diabético se presentó una disminución significativa ($p<0.05$) de la frecuencia cardiaca en relación al grupo control (332.1 ± 20.6 lat/min vs 373.3 ± 15.9 lat/min, respectivamente) (**Tabla 3**).

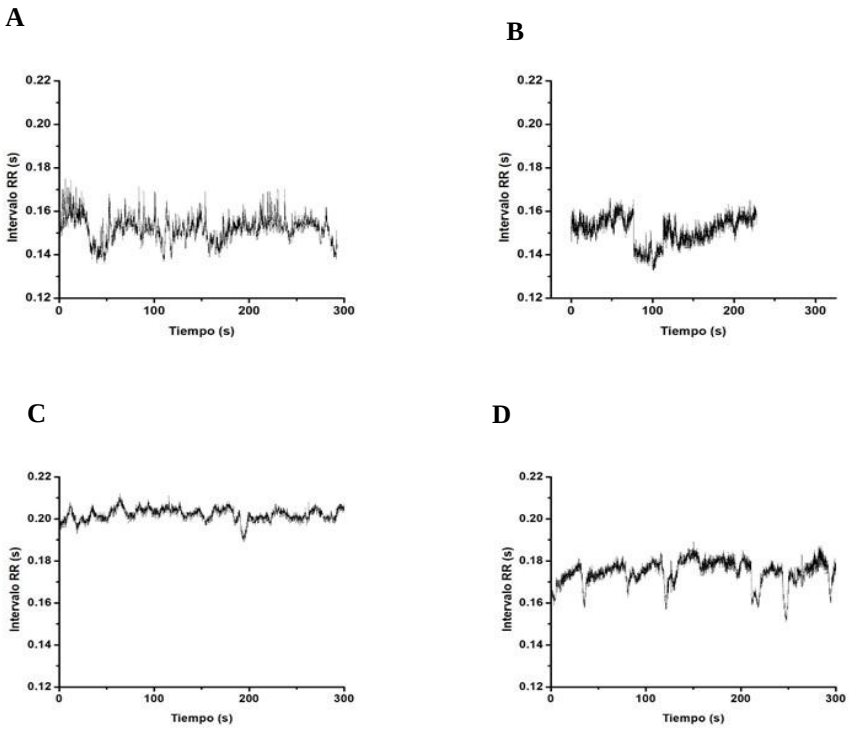


Figura 26. Efectos de la atorvastatina sobre la VFC durante la diabetes mellitus. A) El grupo control (CTRL) en la semana 0 y el grupo (CTRL) semana 8 presentaron una mayor dispersión de los intervalos RR;mayor VFC B); con respecto al grupo diabético (DM) C); en el cual se observó una menor dispersión de los intervalos RR; menor VFC. Sin embargo en el grupo diabético tratado con atorvastatina (DM ATO) D); el efecto de la DM sobre la VFC fue menos evidente.

	Intervalo RR (ms)
Control (CTRL)	162.3 ± 7.5
Diabético (DM)	183.4 ± 11.O

Tabla 3. Valores del intervalo RR para el grupo control y grupo diabético de la semana ocho.

Con respecto a los parámetros estadísticos del dominio en el tiempo (DERR y RMSSD), se encontró que a las ocho semanas de seguimiento, en el grupo de animales con diabetes se presentó un decremento de la DERR y en la RMSSD con respecto al grupo control, mientras que el tratamiento con ATO del grupo de animales con DM, no mostraron diferencia significativa con respecto al grupo control. La 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 (**Figura 27**). En el grupo DM el valor de DERR fue de 2.4 ± 0.1 ms mientras en el grupo CTRL fue de 5.5 ± 0.5 ms. No se obtuvo diferencia significativa en la DERR entre los grupos CTRL y CTRL-ATO. El tratamiento con ATOR, en el grupo DM-ATOR resulto en un incremento en el valor de la DERR en relación al grupo DM (**Figura 27**). En el grupo DM-ATO el valor de DERR fue 4.3 ± 0.4ms.

Por otra parte, se encontraron resultados similares en el valor de RMSSD. En el grupo DM el valor de RMSSD fue de 1.7 ± 0.3 ms mientras en el grupo CTRL fue de 3.5 ± 0.0 ms. No se obtuvo diferencia significativa en la RMSSD entre los grupos CTRL y CTRL-ATO. El tratamiento CON ATO, en el grupo DM-ATO resulto en un incremento en el valor de la RMSSD en relación al grupo DM (**Figura 27**). En el grupo DM-ATO el valor de RMSSD fue 3.3 ± 0.6 ms.

En la presente tesis encontramos que las ratas con diabetes presentaron una reducción del DERR en las 4 y 8 semanas después de la aplicación de la STZ y de forma semejante el RMSSD presentó una reducción, estos cambios reflejan la disminución en la variación del período de tiempo entre latidos consecutivos y una alteración en la actividad parasimpática (Von Borell y cols., 2007) indicando una reducción en control autonómico y por lo tanto podemos decir que estos animales cursan con disautonomia diabética cardiaca. Por otra parte,

el tratamiento crónico con ATO de las ratas con DM no mostraron dicha reducción en la VFC, indicando que dicho medicamento protegió a la rata del desarrollo de la desregulación del sistema nervioso autónomo.

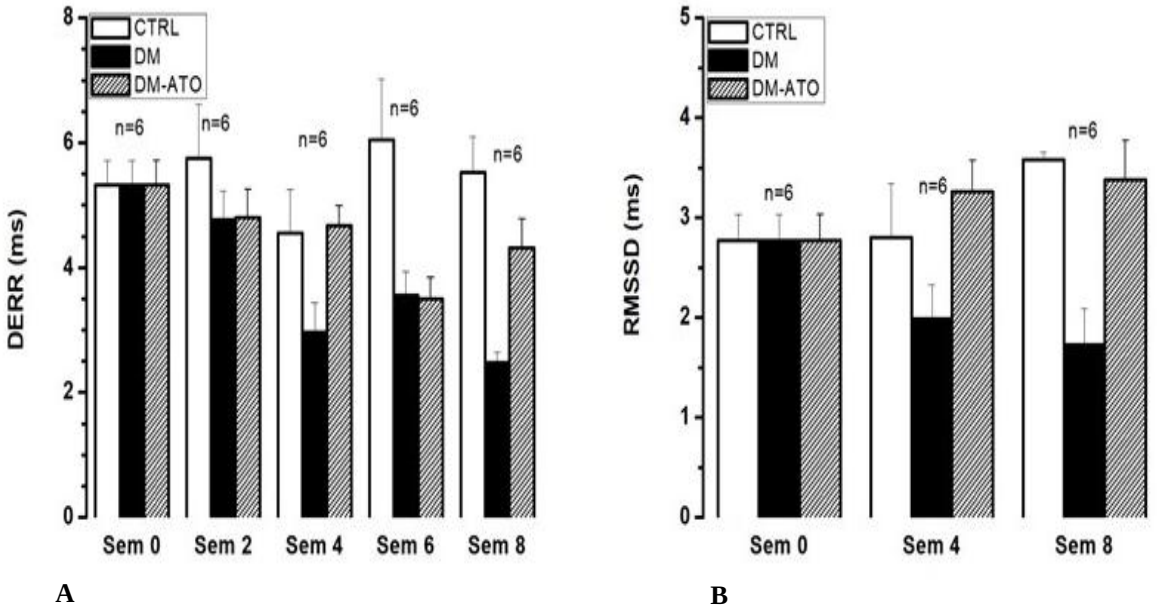


Figura 27. Efecto de la atorvastatina sobre la VFC en el dominio del tiempo durante la diabetes mellitus. A) y B) La administración de la atorvastatina en el grupo DM protege de la disminución de los indicadores DERR y RMSSD de la VFC, los cuales disminuyen de forma significativa en el grupo DM sin tratamiento en relación a lo observado en el grupo control. Los datos se representan como la media ± EEM para cada uno de los grupos estudiados,*p<0.05 (t student); n=6.

8.2.1 Análisis de la VFC en el dominio de la frecuencia

Durante el análisis en el dominio de la frecuencia, encontramos que el grupo de animales con DM presento un incremento en LF, un decremento en HF y un incremento en el cociente LF/HF con respecto al grupo control, mientras que el tratamiento con ATO del grupo de animales con DM no fueron observadas diferencias significativas con respecto al grupo control. El valor de HF fue de 52± 4.1UN en el grupo DM y 66.7 ± 4.9UN en el grupo CTRL. No se obtuvo diferencia significativa en el valor de HF entre los grupos CTRL y CTRL-ATO. El tratamiento aplicado en el grupo DM-ATO resulto en un efecto protector sobre el indicador HF de la VFC en el dominio de la frecuencia. Los valores de HF del grupo DM-ATO no presentaron diferencia significativa respecto a los obtenidos en el grupo CTRL (**Figura 28**).

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 valor de LF del grupo DM presento un incremento significativo en relación al grupo CTRL. El valor de LF fue de 46 ± 3.1UN en el grupo DM y 30.9 ± 4.7UN en el grupo CTRL. El tratamiento aplicado en el grupo DM-ATOR resulto en un efecto protector en el indicador LF de la VFC en el dominio de la frecuencia. Los valores de LF del grupo DM-ATO no presentaron diferencia significativa respecto a los obtenidos en el grupo CTRL (**Figura 28**).

Con respecto a la relación de las oscilaciones de baja frecuencia y alta frecuencia (LF/HF) en el grupo 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 en el 0.8 ± 0.0 para el grupo DM y 0.3 ± 0.0 en el grupo CTRL. Estos datos indican que la DM induce la presencia de un desbalance simpático vagal con disminución del tono simpático. Sin embargo, el grupo de animales diabéticos que recibieron tratamiento con ATOR (DM-ATO), no presentaron incremento en el cociente, mejor aún el valor obtenido fue similar al encontrado en el grupo control.

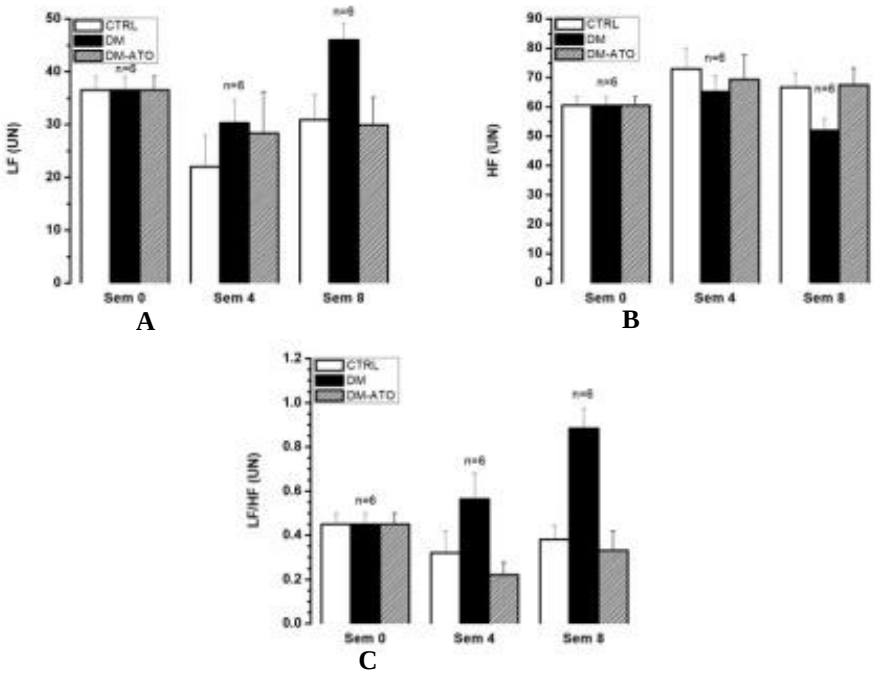


Figura 28. Efecto de la atorvastatina sobre la modulación autómica de la frecuencia cardiaca durante la diabetes mellitus. A) La administración de la atorvastatina en el grupo DM impidió el incremento en las oscilaciones de baja frecuencia (LF), las cuales se encuentran aumentadas durante la DM en relación a lo observado en el grupo control. B) efecto similar se observo para el caso de las oscilaciones de alta frecuencia (HF), las cual disminuyo durante la diabetes. También se observo una disminución de la relación simpático vagal en el grupo diabético tratado con atorvastatina, el cual se encuentra aumentado en el grupo diabético C). Los datos se representan como la media ± EEM para los grupos estudiados, *p<0.05 (t-student); n=6.

8.2.2 Análisis de la VFC en el diagrama de Poincaré

Mediante el gráfico de Poincaré se puede estimar la VFC en base a las contribuciones parasimpáticas o simpáticas sobre la frecuencia cardiaca de acuerdo a la dispersión de los puntos alrededor de la línea de identidad. Esta dispersión puede ser simétrica si no se presenta algún predominio de alguno de los sistemas antes mencionados o asimétrica, si uno de los sistemas domina sobre el otro. El predominio parasimpático se refleja mediante un número mayor de puntos por arriba de dicha línea, siendo lo contrario al presentarse un predominio simpático. En estado no patológico se presenta una asimetría de la VFC con predominio parasimpático.

En el grupo control tanto de la semana cero (**Figura 29**;A) como de la semana 8 (**Figura 29**;B) se observó una gran distribución de los puntos (intervalos RR); reflejando una amplia variación del periodo de tiempo entre intervalos RR sucesivos; estos resultados indican una alta VFC (**Figura 29; A y B)**. Sin embargo durante la DM se presentó una menor dispersión de los puntos a lo largo y ancho de dicha línea de indentidad, indicándonos una menor dispersión del periodo de tiempo entre intervalos RR sucesivos y además la existencia de un determinado número de intervalos RR sucesivos de misma duración, estos resultados indican una disminución de la VFC durante la DM (**Figura 29;C**).

Por otro lado en el grupo de animales diabéticos tratados con atorvastatina (DM ATO) se observo un efecto protector por el tratamiento con la estatina ya que evito la disminución de la VFC, observándose una dispersión de los intervalos RR sucesivos alrededor de la línea de indentidad (**Figura 29;D**).

Al evaluar los índices SD1 y SD2 del diagrama de poincaré para cada uno de los grupos experimentales mencionados en la figura 25 se obtuvieron los siguientes valores (**Tabla 4**).A través del cálculo de los índices SD1 y SD2, asociados a la VFC a corto y a largo plazo respectivamente, se confirmó una disminución significativa ($p<0.05$) de la VFC en el grupo DM al compararse con el grupo CTRL tanto en SD1 como en SD2 (**Tabla 4**). Los valores obtenidos para SD1 fueron, 2.5 ± 0.0 ms vs 1.4 ± 0.2 ms para el grupo CTRL y DM respectivamente; para SD2 los valores obtenidos fueron 7.3 ± 0.8 ms vs 3.3 ± 0.1 ms para los grupos CTRL y DM respectivamente.

Sin embargo, en el grupo de animales diabéticos que recibieron tratamiento con atorvastatina (DM-ATO), se observó un efecto protector del tratamiento, ya que los valores obtenidos en este grupo no presentaron diferencias significativas respecto a los obtenidos en el grupo CTRL. Los valores obtenidos para SD1 y SD2 en este grupo fueron, 2.3 ± 0.4 ms y 5.6 ± 0.6 ms respectivamente (**Tabla 4**) (**Figura 29**).

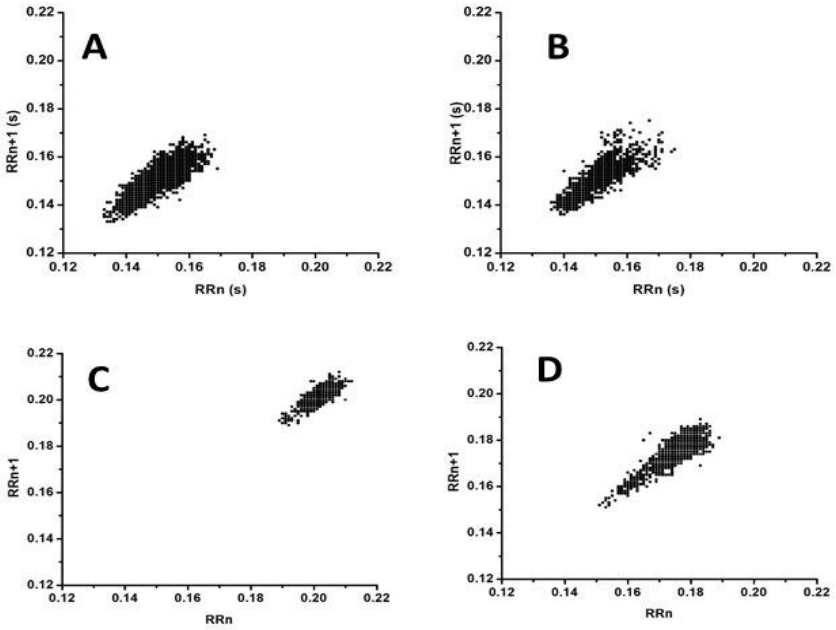


Figura 29. La atorvastatina protege de la disminución de la variabilidad de la frecuencia cardiaca durante la diabetes mellitus. A) El grupo control (CTRL) en la semana 0 y el grupo control (CTRL) semana 8 B) presentaron mayor dispersión de los intervalos RR (puntos en color negro) alrededor de la línea de identidad, indicando una mayor VFC; en el grupo diabético (DM) C) se observo una menor dispersión de los intervalos RR;indicando una menor VFC, sin embargo en el grupo diabético tratado con atorvastatina (DM ATO) se revirtió el efecto del grupo DM, observándose una dispersión o amplia distribución de los intervalos RR consecutivos, mejorándose la VFC, presentándose un aumento de la VFC del grupo diabético tratado con el fármaco;n=1.

Parametros estadísticos	SD1 (ms)	SD2 (ms)
Grupo control (CTRL)	2.5 ± 0.0	7.3 ± 0.8
Grupo diabético (DM)	1.4 ± 0.2	3.3± 0.1
Grupo diabético Atorvastatina (DM ATO)	2.3 ± 0.4	5.6 ± 0.6

Tabla 4. Tabla de parámetros estadísticos del diagrama de poincaré, SD1 y SD2 de los grupos control (CTRL), grupo diabético (DM) y grupo diabético atorvastatina (DM ATO) de la semana ocho.Cada parámetro SD1 y SD2 corresponden para un roedor n=1.

8.3 Parámetros electrocardiográficos

Otro de los parámetros que se midieron en el presente estudio fueron los parámetros electrocardiográficos en la semana ocho. En los intervalos de PR y el complejo QRS de todos los grupos experimentales control (CTRL), diabético (DM), control atorvastatina (CTRL ATO) y diabético atorvastatina (DM ATO) no presentaron diferencias significativas (**Tabla 5**) y **Figura 30**. Sin embargo, se obtuvo un incremento significativo en la duración del intervalo QT en el grupo DM respecto al grupo control.

Intervalos electrocardiográficos	PR (ms)	QRS (ms)	QT(ms)
Grupo control	54.6 ± 1.0	16.1 ± 0.5	73.0 ± 1.7
Grupo diabético	58.0 ± 1.9	16.1 ± 0.6	100.9 ± 0.7 ***
Grupo diabético atorvastatina	58.1 ± 2.3	15.8 ± 0.1	75.8 ± 1.8 ***
Grupo control atorvastatina	53.8 ± 1.1	15.2 ± 0.3	73.6 ± 1.4 ***

Tabla 5. Tabla de intervalos electrocardiográficos de los grupos control (CTRL), grupo diabético (DM), grupo diabético atorvastatina (DM ATO) y grupo control atorvastatina (CTRL ATO) de la semana ocho. Para cada valor de intervalo electrocardiográfico se

realizo por triplicado para una n=5. Los datos se representaron como la ± EEM, ANOVA de una vía, post test Bonferroni, ***p<0.001; n=5.

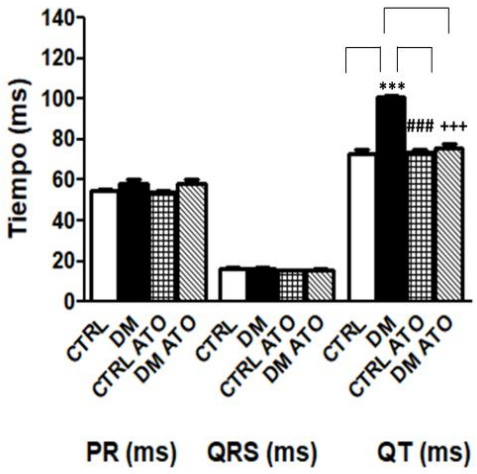


Figura 30. Parámetros electrocardigráficos de los grupos experimentales en la semana 8. Los datos se representaron como la ± EEM, ANOVA de una vía, post test Bonferroni, ***p<0.001; n=5.

9. Discusión

En la presente tesis se analizó el efecto del tratamiento de la Atorvastatina sobre la variabilidad de la frecuencia cardiaca de ratas con diabetes inducida con estreptozotocina. En la presente discusión de resultados, se presentan brevemente los aspectos metodológicos para contextualizar la interpretación de resultados, entre los cuales se discute sobre la elección del animal de experimentación, así como el análisis de la variabilidad de frecuencia cardiaca a través del registro del electrocardiograma. A continuación se presentan antecedentes e hipótesis relacionados con los resultados obtenidos sobre la reducción de la VFC (por el desbalance Simpático-Vagal) y sobre el efecto protector de la Atorvastatina en la disautonomía cardiaca durante la diabetes.

9.1 Modelo de Diabetes mellitus experimental inducido con STZ en rata

Para la realización del proyecto se utilizó como modelo experimental a la ratas debido a que es un roedor ampliamente utilizado para estudios de fisiología y farmacología experimental, ya

que también constituye un importante modelo para el estudio de la VFC, siendo adecuado para investigaciones que involucran en las patologías, enfoques toxicológicos y ambientales (Pereira-Junior y cols., 2010).La colococación de los electrodos a la rata para el registro del ekg y la obtención de la VFC, es un proceso factible. Se utilizó ratas macho en el presente trabajo de investigación con la finalidad de minimizar la posible variabilidad entre sexos, en particular por la diferencia dependiente de la modulación hormonal (Goyal y cols., 2016).

Se han propuesto diversos agentes que inducen modelos de diabetes experiental, uno de ellos es el aloxano, el cual produce efectos tóxicos no sólo a las células β, sino que también afecta a otros órganos del cuerpo (Rohilla y Ali, 2012). Otro agente que induce la diabetes en los modelos animales asociadas con las características clínicas de la diabetes en los seres humanos es la estreptozotocina (STZ). Por tal motivo en el presente trabajo de investigación se planteó la utilización de la STZ, la cual se ha utilizado ampliamente en las últimas tres décadas para inducir la diabetes en diversas especies animales debido a que la STZ es menos tóxica y más especifica y selectiva para las células β pancreáticas, en lugar del alloxano. Goyal y cols, (2016) han propuesto que la STZ se introduce a la célula ß por medio del transportador de glucosa GLUT2, causando la destrucción progresiva de las células ß, induciendo la muerte de las células ß por sus efectos tóxicos en los islotes pancreáticos y entonces al no haber insulina suficiente para facilitar la entrada de glucosa en la célula, el nivel en sangre aumenta. En la literatura, los modelos inducidos por STZ son considerados diabéticos cuando la concentración de glucosa en sangre es $\geq$350 mg/dL (Marangoni y cols., 2014; Howart y cols., 2005); utilizando las sugerencias de la Asociación Americana de Diabetes (ADA) para evaluar a los animales diabéticos.

En el presente trabajo de tesis se evaluaron características de peso y glucosa para evaluar el modelo experimental de diabetes mellitus tipo 1 inducido por STZ y los resultados que se obtuvieron se describen a continuación. Los animales diabéticos de experimentación presentaron un aumento significativo en la concentración de glucosa sanguínea y una reducción del peso corporal, ambos indicadores del cuadro de Diabetes Mellitus Experimental comparable con la diabetes tipo 1 del humano; como se observa en la **Figura 25**.

9.2 Disminución de peso en las ratas diabéticas

Al evaluar el registro de peso para el grupo diabético y grupo control observados en la **Figura 25**, se presentó una dismución de peso en las ratas diabéticas con respecto al grupo control; esto puede ser consecuencia debido a una mayor movilización de los ácidos grasos del tejido adiposo, a una aceleración de la β oxidación hepática, y a la disminución de la enzima lipasa en el tejido adiposo cuando los niveles de insulina están dismuinidos; como lo proponen Akbarzadeh y cols, (2007). Por otro este mismo efecto podría estar implicado en la disminución de la síntesis de proteínas en los tejidos, favoreciéndose la proteólisis, además de alteraciones del metabolismo lipídico, que conllevan a una disminución del peso; como lo menciona Akbarzadeh y cols, 2007. Además el déficit de insulina hace que el anabolismo estimulado por esta, se transforme en un catabolismo de las grasas y las proteínas (Takada y cols., 2008). Estudios llevados a cabo por Wang y cols, (2006) en un modelo animal de deficiencia de insulina, se demostró que existe una proteólisis muscular acelerada y que esto es causado por una disminución de la actividad de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K).

9.3 Aumento de glucosa en el grupo diabético

Otro parámetro que se evaluó para la caracterización del modelo de diabetes mellitus experimental, fue la concentración de glucosa, la cual presentó una disminución en el grupo diabético (**Figura 25**), esto debido al efecto que produjo la administración de STZ.

La STZ, al ser un análogo estructural de la N-acetil glucosamina posee un resto glucosa unido a un grupo citotóxico llamado nitrosourea, las células β son más sensibles a la glucosa, lo que facilita la entrada de STZ en las células β a través del transportador GLUT2, lo que conduce finalmente a la toxicidad de la STZ. La propiedad diabetogénica de la STZ se caracteriza por la destrucción selectiva de las células beta, la deficiencia de insulina, hiperglucemia, polidipsia y poliuria que se asemejan a la diabetes humana (Goyal y cols., 2016). El exceso del metabolismo de la glucosa por la glucólisis, activación de rutas como la del poliol, PKC, hexosamina y la formación de productos finales de glicación avanzada (AGEs) genera radicales libres, tales como especies de oxígeno reactivas (EROS). Esto aumenta el estrés oxidativo en las células beta que favorecen la necrosis y la apoptosis (Goyal y cols., 2016). Cabe mencionar que la administración de STZ en animales experimentales han muestrado un

aumento de superóxido y malondialdehído, de acuerdo a Goud y cols (2015) y también presentan una disminución de los niveles de dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa (Goud y cols., 2015). Por lo tanto, estos mecanismos favorecen a los procesos de peroxidación de lípidos y la disminución de la actividad antioxidante , ocasiondando a las células beta, un aumento del estrés oxidativo inducida por la STZ. Por otro lado la STZ es un agente alquilante genotóxico, que causa la fragmentación del ADN, daño celular, apoptosis y necrosis (Eleazu y cols., 2013); disminuyendo de esta manera la síntesis de insulina debido a la destrucción de las células beta del páncreas y a su vez produciendo hiperglucemia; como se observa en el grupo diabético (**Figura 25**).

9.4 Aumento del intervalo QT en el grupo diabético

En la presente tesis se obuvo un aumento del intervalo QT en el grupo diabético (**Figura 30**). De acuerdo a Christensen y cols, (2007) la diabetes es un trastorno metabólico caracterizado por un aumento de la glucosa en sangre, como resultado de alteraciones en el metabolismo de las proteínas, los lípidos y los carbohidratos (Christensen y cols., 2000; da Silva Costa y cols., 2007). Estas alteraciones aumentan la tendencia al desarrollo de enfermedades cardiovasculares y neuropatías que representan una de las principales causas de muerte de los pacientes (da Silva Costa y cols., 2007; Christensen y cols., 2000). Las alteraciones en el metabolismo de carbohidratos y lípidos, pueden causar modificaciones en la estructura y fisiología cardiovascular, lo que a su vez conduce a alteraciones en el registro electrocardiográfico; dependiendo de las áreas dañadas del corazón, producen una propagación anormal de los potenciales de acción en el músculo cardíaco, el cual modifica las ondas del EKG y sus respectivos intervalos. Siendo el EKG uno de los principales métodos en el diagnóstico de las enfermedades cardiovasculares (da Silva Costa y cols., 2007). Para la medición del intervalo QT en un EKG, el intervalo se mide desde el comienzo del complejo QRS hasta el final de la onda T a medida que regresa a la línea base (Nachimuthu y cols., 2007).

El intervalo QT del EKG representa la suma del potencial de acción (PA) de los miocitos ventriculares. El potencial de acción refleja el flujo de corrientes de iones a través de una membrana celular a través de canales especializados hechos de complejos de proteínas, llamados canales ionicos (Nachimuthu, y cols., 2007). El mal funcionamiento de estos canales

ionicos, puede conducir a un aumento de la corriente hacia el interior o una corriente hacia el exterior reducida. Esto aumenta posteriormente la duración del potencial de acción y, por lo tanto, la prolongación del intervalo QT (Nachimuthu y cols., 2007).

Estudios recientes llevados a cabo por Ninkovic y cols, (2016) han sugerido que la hiperglucemia puede conducir a la prolongación del intervalo QT a través de varios mecanismos, siendo uno de ellos la estimulación de la proteína quinasa C, que conduce a la síntesis y la liberación reducida de óxido nítrico derivado del endotelio; esto conduce a la disminución de la actividad de la bomba Na^+/ K^+ ATPasa, una enzima responsable del mantenimiento del potencial de membrana basal de los miocitos y las células del sistema de conducción (manteniendo una alta concentración de K intracelular y una alta concentración de Na extracelular por el mecanismo del transporte activo) (Ninkovic y cols 2016; Tesfamariam y cols., 1991; Gupta y cols., 1992).

La reducción de la biodisponibilidad de óxido nítrico durante la hiperglucemia probablemente también sea responsable de la disminución de la actividad de Ca^{2+} ATPasa, una enzima en la membrana de miocitos que a través del mecanismo de transporte activo mantiene una baja concentración de iones Ca^{2+} en la célula, esta disminución de la actividad de esta enzima aumenta la entrada de iones Ca^{2+} durante la fase 2 del potencial de acción y el aumento del intervalo QT (Ninkovic y cols., 2016; Davis y cols., 1985).

La bomba Na^+/ K^+ ATPasa, es una enzima presente en la superficie de todas las células eucarióticas, que intercambia iones Na+ y K+ en una proporción de 3: 2, espectivamente.La enzima consta de dos subunidades (alfa y beta), cada una expresada en varias isoformas. Muchas hormonas regulan la actividad de bomba la Na^+/ K^+ ATPasa, siendo una de estas hormonas la insulina, la cual presenta defectos en la vía de señalización fosfatidilinositol-3-quinasa (Sweeney y cols., 1998).

La correlación entre la hiperglucemia y el intervalo QT se ha demostrado en estudios clínicos previos que incluyen pacientes con metabolismo alterado de la glucosa y en individuos aparentemente sanos (Li y cols., 2012; Ninkovic y cols., 2016). Además, tanto estudios clínicos como en modelos experimentales, han sugerido que la hiperglucemia conduce a un intervalo QT prolongado no sólo en sujetos sanos sino también en aquellos con diabetes

(Ninkovic y cols., 2016); este efecto fue similar pero en un modelo animal con diabetes mellitus experimental como se observó en el grupo DM (**Figura 30**). Sin embargo no se han confirmado la asociación de QT prolongado y la NAC en pacientes con diabetes tipo 1 y 2 (Kumar y cols., 2004; Ninkovic y cols 2016).Un metaanálisis que investigó la sensibilidad y especificidad del intervalo QT prolongado para la detección de la NAC en pacientes con diabetes sugirió que el intervalo QT prolongado es un indicador deficiente de la NAC (Whitsel y cols., 2000; Ninkovic y cols 2016). Estudios previos tampoco han demostrado una relación significativa entre el QT y la disfunción autonómica en pacientes diabéticos. Sin embargo existen varios factores de riesgo adicionales para desarrollar el intervalo QT prolongado en la diabetes, incluida la hipertensión, hiperglucemia, complicación diabética microvascular y la enfermedad coronaria y la NAC (Takebayashi y cols., 2002; Ninkovic y cols., 2016). Como factores de riesgo para QT prolongado en la literatura también se informan a la NAC, hipertensión arterial, insuficiencia cardiaca y enfermedad coronaria (Takebayashi y cols, 2003). Ha quedado claro que los factores de riesgo independientes para la prolongación de QT en pacientes con diabetes tipo 1 y tipo 2 son diferentes (Valensi y cols., 2002; Ninkovic y cols., 2016).

De acuerdo a Nachimuthu y cols, (2012) existen mutaciones en los genes que codifican para las proteínas que forman parte de los canales iónicos de potasio (Ikr, Ikv) y canales de Na, dando origen al síndrome congénito de QT largo (SQTL). En el SQTL se debe al bloqueo del canal rectificador de potasio hacia el interior (Ikr), también conocido como canal de hERG, el gen que codifica la subunidad formadora de poros del canal rectificador de potasio (IKr), que es importante para la repolarización cardíaca (Nachimuthu y cols., 2012). La disfunción de hERG causa el síndrome de QT prolongado y muerte súbita. La activación de este canal hERG, lleva a cabo un retraso rápido en la corriente rectificadora de potasio (IKr); una corriente crítica en la repolarización de fase 3 del potencial de acción cardíaco (Roden y Viswanathan, 2005).

9.5 Efecto protector de la atorvastatina sobre el intervalo QT

En el el presente trabajo de investigación no se presento un aumento del intervalo QT para el grupo diabético tratado con la atorvastatina (**Figura 30**). Sugiriendo que el tratamiento con el fármaco protegio a las ratas diabéticas. Se ha demostrado que las estatinas son capaces de

inhibir las corrientes lentas y regresar a un valor normal el periodo QT de animales con insuficiencia cardiaca (Vrtovec y cols., 2005). En esta tesis no se exploró el valor de las corrientes del potencial de acción ventricular, por lo tanto podemos comentar que están involucradas las corrientes mencionadas en el incremento del periodo QT. Por lo tanto tampoco podemos precisar el mecanismo por el cual la ATO protege al ventrículo de los cambios en la duración, sin embargo este efecto protector cobra relevancia cundo se consideran los riesgos para la inducción de una arritmia ventricular por un QT largo.

Estudios llevados a cabo por Vrtovec y cols, (2005) han demostrado que la terapia con atorvastatina a corto plazo reduce significativamente la prolongación incrementada del intervalo QT en pacientes con insuficiencia cardíaca avanzada; estos hallazgos podrían ser parcialmente explicados por la modulación inducida por las estatinas del tono nervioso autónomo. Los modelos preclínicos han demostrado que la terapia con estatinas es capaz de inhibir las corrientes de Ca transmembrana inducidas por la lisofosfatidilcolina.La prolongación de la duración del potencial de acción ventricular en la insuficiencia cardíaca es causada por la por una regulación negativa funcional de las corrientes de K y la disminución prolongada de las corrientes de Ca de tipo L; al disminuir las corrientes de Ca transmembrana con el tratamiento de atorvastatin que podría acortar la acción ventricular (Vrtovec y cols., 2016).

Yokoyama y cols, (2002) han demostrado que la lipoproteína de baja densidad oxidada (LDL) juega un papel importante en la disfunción endotelial y la lisofosfatidilcolina (LPC) es un componente fosfolípido del LDL oxidado. Cuando LDL se oxida, aproximadamente el 60% de la fosfatidilcolina parece convertirse en LPC, lo que induce actividades aterogénicas, incluida la inducción de moléculas de adhesión, como la molécula 1 de adhesión celular vascular (VCAM-1) y la molécula-1 de adhesión intracelular (ICAM-1) en células endoteliales.LPC también aumenta la concentración de Ca^{+2} intracelular en células endoteliales ($[Ca^{+2}]_i$). El aumento de ($[Ca^{+2}]_i$) consiste en la liberación de Ca^{+2} de las reservas intracelulares de Ca^{+2} y la entrada de Ca^{+2} extracelular a través de la membrana plasmática (Yokoyama y cols., 20016). Sin embargo el incremento de ($[Ca^{+2}]_i$) inducido por la LPC fue abolido mediante la inhibición sobre la LPC por las estatinas; LPC indujo la movilización de Ca y la corriente de membrana a través de una vía PLC dependiente de la activación de Rho en las células

endoteliales, y las estatinas bloquearon estos efectos al evitar la modificación de los lípidos dependiente de GGPP de Rho. DemostrandoYokoyama y cols, (2002) que Rho promueve la estimulación de LPC del movimiento de Calcio.

9.6 Reducción de la VFC durante la DM

Existen varios argumentos para considerar que los resultados en la variabilidad de la frecuencia cardiaca son atribuidos a la hiperglucemia en lugar de una acción directa de la estreptozotocina en la modulación autonómica cardiaca.

En la presente tesis se encontró que las ratas con diabetes mellitus presentarón una disminución de la VFC en el dominio del tiempo; reducción del DERR y RMSSD en las 4 y 8 semanas (**Figura 27**) después de la aplicación con STZ, estos cambios reflejan la disminución en la variación del período de tiempo entre latidos consecutivos y una alteración en la actividad parasimpática (Von Borell y cols., 2007), indicando una desregulación del control autonómico sobre el corazón y por lo tanto podemos decir que estos animales presentarón neuropatía autonómica cardiaca. Sin embargo en el grupo diabético tratado con atorvastatina (DM ATO), no presentó dicha disminución de la VFC, tanto en el parámetro DERR como en el RMSSD, indicando que dicho medicamento protegió a la rata del desarrollo de la desregulación del sistema nervioso autónomo y a su vez previno la aparición de la NAC.

Por otra parte en el análisis de la VFC en el dominio de la frecuencia, el cual evalúa independientemete la activación simpática (LF) o parasimpática (HF) y la modulación simpático vagal (LF/HF) (Park y Watanuki, 2005), en el grupo DM se presento un aumento en las oscilaciones de baja frecuencia LF y en la relación LF/HF (**Figura 28**), mientras que en las oscilaciones de alta frecuencia (HF) se observó una disminución (**Figura 28**). Esto demuestra que el grupo DM presento un aumento en el predominio del sistema nervioso simpático y a su vez una disminución del sistema nervioso parasimpático, y por lo tanto la disminución de la VFC en ambos parámetros del dominio del tiempo (**Figura 27**), indicando que el grupo diabético desarrollo NAC; ya que de acuerdo a Rodica, (2010) el indicador clínico más temprano de la NAC es una disminución de la VFC. En las primeras etapas de la NAC se produce una denervación del corazón a partir de la vértice de los ventrículos hasta la base del corazón, en la cual ya no existe una regulación adecuanda por parte del SNP sobre el corazón, provocándose de esta manera una desregulación del sistema nervioso autónomo

cardiovascular, con un mayor predominio de la actividad simpática (Rodica., 2010; Serhiyenko y Serhiyenko., 2015). Krishna y cols, (2014) han demostrado que la NAC resulta del daño de las fibras nerviosas autónomas que inevan al corazón y vasos sanguíneos, causando anormalidades en el control de la frecuencia cardiaca ys su dinámica vascular. Por otro lado evidencia experimental sugiere que las especies reactivas de oxígeno (EROS) incluyendo el superóxido (O_2^-) y peroxinitrito ($ONOO^-$) podrían contribuir al desbalance simpático-vagal en el tallo cerebral, neuronas periféricas y en cardiomiocitos (Danson y cols., 2006).

Se sabe que el estrés oxidativo induce vías de señalización sensibles al estrés tales como NFKB, p38 MAPK. El NF-KB es un factor de transcripción que juega un papel importante en la mediación de la respuesta inmune e inflamatoria (Rains y Jain, 2011). Estudios llevados a cabo por vinik y cols, (2013) sugieren que la respuesta inflamatoria esta contralada en parte por un circuito neural del SNA, éste circuito neural esta formado por el nervio esplénico y nervio vago, en condiciones normales la activación del nervio vago reduce la respuesta del sistema inmune innato a DAMP y PAMP, disminuyendo de esta manera la liberación de citoquinas y suprimiendo la inflamación. Así como la estimulación del nervio vago puede disminuir la FC, también aumentar la actividad del nervio vago ralentiza la inmunidad innata. Sin embargo en condiciones donde se presenta la pérdida de la actividad del sistema parasimpático (nervio vago), perjudica a este proceso homeostático, provocándose un aumento de liberación de citoquinas y produciendo daño y muerte tisular neural (vinik y cols., 2013).

En el grupo diabético al cual se le administró la atorvastatina se observó que la estatina protegio a las ratas diabéticas inducidas con STZ, ya que no se presento una disminución de de VFC en el dominio del tiempo, evaluando los parámetros DERR y RMSSD (**Figura 27**), por otro lado al evaluar la VFC en el dominio de la frecuencia el indicador LF no presento aumento como se observa en el grupo diabético, y el indicador HF no disminuyó, en cuanto a la modulación simpático-vagal (LF/HF) no presentó aumento (**Figura 28**). De esta manera se puede decir que la atorvastatina produjo un efecto protector en el control de la regulación del sistema nervioso autónomo sobre el corazón, previniendose la aparición de la NAC, la cual si se presento en el grupo diabético (**Figura 27 Figura 28**).

Se ha demostrado que exiten muchos fuentes generadoras de estrés oxidativo, sin embargo la actividad de la NADPH oxidasa se encuentra aumentada en arterias y venas de pacientes

diabéticos, siento la principal fuente generadora de O_2^- (Guzik y cols., 2002). Se ha demostrado que las estatinas presentan diferentes efectos pleiotropicos, como antioxidantes, anti-inflamatorios, cardioprotectores, neuroprotectores, anti-arritmicos, anti-fibroticos y anti-plaquetarios, entre otros independintemente de la dismunición de lípidos en la sangre (Zhang y cols., 2015; Lim y Barter., 2014).

Recientemente se demostrado que el tratamiento a corto plazo con atorvastatina suprime la generación de O_2^- y la actividad tanto de la NADPH oxidasa como de la Rac1 en pacientes con injerto de vena safena sometidos a un bypass de injerto de arteria coronaria (CABG), esto también se acompaña de una reducción en los niveles de malonildialdehído en plasma, un marcador de peroxidación lipídica (Margaritis y cols., 2014). La incubación *ex vivo* de injerto de vena safena humanas con atorvastatina conduce a una reducción en la translocación de p67phox de la NADPH oxidasa y Rac1 a la membrana, efectos que se revierten mediante la coincubación con mevalonato (Margaritis y cols., 2014). De esta manera las estatinas podrian servir como un modelo farmacológico para el desarrollo de nuevas estrategias antioxidantes que tienen como objetivo el control del balance entre la producción y la eliminación de EROS en el endotelio vascular.

El papel de las estatinas como inhibidores potenciales de NF-kb ha sido investigado en modelos celulares, donde la actividad de NF-kb ha sido inducida a través de una variedad de diferentes estímulos. La exposición de células del musculo liso vascular (CMLV) a atorvastatina previene la activación de TNF inducida por angiotensina II y la subsiguiente regulación positiva de mediadores inflamatorios, efectos evitados por FPP Y GGPP (Bustos y cols., 1999). Por otro lado en un ensayo aleatorizado, el tratamiento con atorvastatina 80 mg / día durante 1 mes antes de la endarterectomía, se asoció con una activación reducida de NF-kB en las células mononucleares circulantes y la placa carotídea, junto con la expresión génica inflamatoria reducida y la infiltración celular de la placa (Ortego y cols., 2005).

Estudios *in vivo* han demostrado que la regulación positiva o activación del receptor de lipoproteína de baja densidad oxidado de lectina tipo1 (LOX-1) mediante la liberación de estrés oxidativo, particularmente por la generación de H_2O_2, promueva la apoptosis en cardiomiocitos en corazones de rata sujectos a lesión de isquemia-reperfusión. En este estudio, se examinó que el tratamiento de la atorvastatina (10 µM) inhibia la expresión de LOX-1

inducida por H_2O_2 y la apoptosis de líneas celular H9C2 de cardiomiocitos (Zhang y cols., 2015).

El análisis el digrama de Poincaré es un método geométrico y no lineal para evaluar la dinámica de la VFC (Koichubekov y cols., 2017), en los resultados obtenidos de este análisis se observo una disminución significativa en los índices SD1 (asociados con la VFC a corto plazo) y SD2 (asociada con la VFC a largo plazo) en el grupo diabético (**Figura 29**) (**Tabla 4**), como se informó en estudios previos (Contreras y cols., 2007; Guzik y cols., 2010; Bhaskar y GhataK, 2013; Arrollo-Carmona y cols., 2016) que han demostrado que la disminución de estos parámetros se debe a un desequilibrio simpático-vagal. Los resultados observados por el análisis no lineal de la VFC se relacionan positivamente con los obtenidos en el dominio del tiempo y la frecuencia. Además el tratamiento con la ATO evita cambios en los componentes del diagrama de Poincaré SD1 y SD2 (**Tabla 4**), indicando que dicha estatina mantiene el equilibrio simpático-vagal de la frecuencia cardíaca.

9.7 Posibles mecanismos de acción implicados en la reducción de la VFC durante la DM

Las anormalidades de la función del sistema nervioso autónomo son frecuentes en pacientes diabéticos y pueden exacerbar la disfunción cardiovascular. La neuropatía autonómica cardíaca (NAC) es una de las complicaciones más comunes de la DM y se detecta en aproximadamente 35-65% en pacientes mayores con diabetes prolongada (Spallone y cols., 2011). La NAC resulta del daño a la inervación simpática y parasimpática del sistema cardiovascular, y los efectos más graves de estas complicaciones son un alto riesgo de arritmias ventriculares (AV) y una mayor mortalidad (Vinik y cols., 2011). En humanos se ha demostrado una asociación de diabetes con una disminución en la modulación parasimpática del corazón y un cambio hacia un tono simpático aumentado (Tarvainen y cols., 2014). Varios estudios sugieren que una disminución en la variabilidad de la frecuencia cardíaca (VFC) puede ser el signo más temprano de la NAC en los diabéticos (Chessa y cols., 2002).

La denervación de los nervios autónomos durante la diabetes (Jin y cols., 2015) es multifactorial, y la hiperglucemia juega un papel clave en la activación de varias vías bioquímicas relacionadas con el estado metabólico y / o redox de la célula (Edward y cols., 2008; Kaur y cols., 2104; Fisher A. y Tahrani A., 2017). El aumento del estrés oxidativo da como resultado la activación de poli ADP-ribosa polimerasa que, cuando se combina con otras

vías activadas, incluida la vía del poliol, la producción de productos finales de glicación avanzada, la proteína quinasa C y la hexosamina se cree que contribuyen a la toxicidad de la glucosa (Sifuentes-Franco y cols., 2017; Shah y Brownlee, 2016). Estas diferentes vías pueden inducir cambios en la expresión génica y factores de transcripción que conducen a la disfunción neuronal (Dimitropoulos y cols., 2014). Estas vías también dan como resultado la regulación microvascular alterada y la disfunción endotelial por diferentes mecanismos, incluido el deterioro de las acciones de NO y la reducción de la perfusión neurovascular (Taskiran y cols., 2002; Al-Humaidi y cols., 2018). Con los experimentos realizados en la presente tesis no podemos proponer un mecanismo de acción diferente a los que se han comentado en este apartado, por lo tanto proponemos que en los siguientes estudios se profundicen en los mecanismos fisiopatológicos que afectan la variabilidad de la frecuencia durante la diabetes experimental.

9.8 Evaluación de la modulación simpático-vagal por análisis de la VFC

La VFC se ha utilizado para evaluar la modulación simpático-vagal en la función cardíaca (Auberty cols., 1999, Howart y cols., 2005) y es una herramienta (no invasivo) más utilizada en el análisis y en la evaluación de la actividad cardiaca (Billman, 2011). En una persona sana, los latidos se van produciendo con una frecuencia variable, es decir, el tiempo entre dos latidos varia latido a latido. La manera habitual de medir esta variabilidad es a partir del registro electrocardiográfico, donde se calcula el tiempo entre las diferentes ondas R consecutivas. Este intervalo RR mide el periodo cardiaco y la función inversa mide la FC. La VFC es el resultado, de las interacciones entre el sistema nervioso autónomo (SNA) y el mecanismo intrínseco del funcionamiento del corazón. La actividad del SNA se basa en el equilibrio entre el sistema nervioso simpático (SNS) y el sistema nervioso parasimpático (SNP). La activación del SNS produce un aumento de la frecuencia cardiaca mediante impulsos lentos de baja frecuencia y es el responsable de los cambios en la tasa cardiaca debidos a estrés físico y mental. En cambio, el SNP disminuye la frecuencia cardiaca por impulsos eléctricos vagales de alta frecuencia y gestiona los cambios en la tasa cardiaca debidos a las señales procedentes de los barorreceptores arteriales y del sistema respiratorio.

Los parámetros DERR y RMSSD se han utilizado ampliamente para el análisis de la VFC en el dominio del tiempo. La administración de fármacos como la escopolamina a dosis bajas

para mejorar el flujo cardiaco parasimpático se ha demostrado que aumenta un 49% el RMSSD, lo que sugiere una contribución significativa de la actividad vagal, por lo tanto el parámetro RMSSD informa de las variaciones a corto plazo de los intervalos RR y se utiliza para observar la influencia del SNP sobre el sistema cardiovascular (Turker y cols., 2013).

Con respecto al dominio de la frecuencia existe evidencia que sugiere que la actividad del SNS influye en la banda de baja frecuencia (LF) de la VFC de 0.04 a 0.15 Hz, mientras que el PNS se refleja predominantemente en la banda de alta frecuencia (HF), de 0.15 a 0.4 Hz, y también posiblemente en una proporción de LF (Malik y cols., 1996; von Rosenberg y cols., 2017), se propone que LF era un índice de actividad simpática. El espectro de alta frecuencia (HF) es la potencia en el rango de 0.15 a 0.4 hercios, lo que equivale a ritmos con períodos que ocurren entre 2.5 y 7 segundos. Esta banda refleja la actividad parasimpática o vagal. Se ha descrito que la reducción de ambos parámetros están disminuidos en sujetos con DM (Oliveira y cols., 2017; Khandoker y cols., 2017).

Por otra parte, el análisis de la diagrama de Poincaré se ha propuesto como método geométrico y no lineal para evaluar la dinámica de la VFC (Tarvainen y cols., 2014*;* Koichubekov y cols., 2017). La longitud de la línea longitudinal se define como la SD2 de los datos de la gráfica. La longitud de la línea transversal se define como la SD1 de los datos de trazado en dirección perpendicular. En las "parcelas" de Poincaré, el ancho SD1 refleja la actividad parasimpática; y la longitud SD2 refleja la modulación simpática (Che-Hao y cols., 2012).

9.9 Protección sobre la reducción de la VFC con el tratamiento con atorvastatina

En el grupo diabético tratado con Atorvastatina, el análisis el diagrama de Poincaré, los índices en el dominio del tiempo RMSSD y DERR (**Figura 27**) y los índices en el dominio de la frecuencia LF y HF (**Figura 28**) no mostraron cambios significativos con sus respectivos controles. Esto indica que el tratamiento con la estatina tiene un efecto protector sobre el equilibrio simpático-vagal en animales diabéticos.

Los efectos de las estatinas sobre la función del sistema nervioso autónomo se han estudiado en modelos experimentales con hipercolesterolemia (Pelat y cols., 20103), síndrome metabólico (Da-Silva y Cols., 2011), hipertensión (Kishi y cols., 2003; Kishi y cols., 2011), infarto de miocardio (Lee y cols., 2007), insuficiencia cardíaca (Piquett y cols., 2003; Gao y cols., 2005) y diabetes (Matsuki y cols., 2010). Todos estos estudios muestran que las estatinas

ofrecen un efecto benéfico sobre las funciones autonómicas y su impacto en la función cardiovascular (Milllar y Floras, 2014), sin embargo el mecanismo aún no se ha dilucidado por completo.

9.10 Posibles mecanismos de acción implicados en la protección sobre la reducción de la VFC durante la DM con el tratamiento con atorvastatina

Aunque las estatinas ejercen sus principales efectos sobre la enfermedad de las arterias coronarias (EAC) al disminuir las LDL-C, una multitud de efectos potencialmente cardioprotectores se han atribuido a estos medicamentos (Bonetti y cols., 2002; Davignon, 2004). Sin embargo, existen otros mecanismos cardioprotectores de las estatinas llamados efectos pleiotrópicos. Las acciones pleiotrópicas de las estatinas incluyen mejora en las placas de aterosclerosis y la regulación autonómica, las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antitrombóticas (Bellosta y cols., 1998; Bonetti y cols., 2002; Davignon, 2004; Liao & Laufs, 2005). También se ha reportado que las estatinas pueden ejercer efectos directos sobre las propiedades fisicoquímicas del sarcolema cardíaco dando lugar a modificaciones de los flujos de iones transmembranales y por lo tanto pueden incidir directamente en las propiedades electrofisiológicas del corazón de estados patológicos como en las arritmias supraventriculares.

En relación de la mejora de la función autonómica, se ha descrito que la hiperinervación simpática participa en la aparición de arritmias ventriculares y muerte súbita cardiaca (Caoet y cols., 2000a, 2000b; Rubart y Zipes, 2005) y que la reducción en la VFC vinculada con enfermedad coronaria que se asocia negativamente con la hipercolesterolemia (Quintana y cols., 1997; Huikuri y cols., 1999). Las estatinas aumentan modulación parasimpática de la frecuencia cardíaca y mejora el nivel de la VFC en pacientes con hipercolesterolemia (Welzig y cols., 2003; Pehlivanidis y cols., 2001), sin embargo también aumentan la HRV en pacientes con antecedentes infarto al miocardio de manera independiente a los cambios en los niveles plasmáticos de LDL-C (Riahi y cols., 2002).Como se mencionó anteriormente, por medio de técnicas bioquímicas y de imagen se ha reportado el beneficio del tratamiento con la Fluvastatina sobre el balance simpático-vagal en el modelo de rata diabética (Matsuki y cols., 2010). En la presente tesis aportamos datos sobre la VFC bajo el tratamiento con atorvastatina en un modelo con diabetes experimental. Este hecho cobra relevancia debido a que actualmente en pacientes diabéticos, la atorvastatina mejora la recuperación de la frecuencia

cardíaca después del ejercicio (Tekin y cols., 2006) y la repolarización ventricular (Tekin y cols., 2008). Además, un estudio con 82 pacientes con diabetes tipo 2 tratados con varias estatinas reportan una mejora en la VFC, es decir, hay evidencia clínica que las estatinas protegen los efectos negativos del desbalance autonómico (Raluca y cols., 2014). La presente tesis muestra datos semejantes a este último estudio, pero en un modelo animal, por lo tanto se presenta la oportunidad de realizar para generaciones futuras puedan tener la oportunidad de estudiar con más detalle los mecanismos pleiotrópicos de las estatinas sobre la VFC durante la diabetes.

10. Conclusiones

A) Las ratas diabéticas inducidas con STZ presentaron reducción de la variabilidad de la frecuencia cardiaca como parte del deterioro del balance simpático-vagal.

B) Las ratas dibéticas inducidas con STZ y con tratamiento de atorvastatina previno la reducción de la variabilidad de la frecuencia cardiaca, por lo tanto no presentaron deterioro del balance simpático-vagal.

c) El tratamiento con atorvastatina ejerce un efecto protector sobre los indicadores de la VFC y el intervalo QT previniendo de esta manera el desarrollo de la NAC en ratas con diabetes mellitus tipo1.

11. Perspectivas

A) Profundizar en el mecanismo de deterioro del balance simpático-vagal en ratas diabéticas inducidas con STZ y ratas diabéticas tipo 2.

B) Profundizar en el mecanismo de protección de las estatinas sobre el deterioro del balance simpático-vagal de ratas diabéticas inducidas con STZ y ratas diabéticas tipo 2.

C) Profundizar sobre las bases iónicas de los potenciales de membrana que modifican el intervalo QT y su restaturación por la administración de atorvastatina.

12. Bibliografía

Valensi, P.E.; Johnson, N.B.; Maison-Blanche, P.; Extramania, F.; Motte, G.; Coumel, P. Influence of cardiac autonomic neuropathy on heart rate dependence of ventricular repolarization in diabetic patients.*Diabet Care*.**2002**,25,(5),918–923.
Aghajanian, A.; Wittchen, E.S.; Campbell, S.L.; Burridge, K. Direct activation of RhoA by reactive oxygen species requires a redox-sensitive motif. *PLoS One*. **2009**,4,(11),80-95.
Akbarzadeh, A.; Norouzian, D.; Mehrabi, M. R.; Jamshidi, S.; Farhangi, A.; Verdi, A. A.; Rad, B. L. Induction of diabetes by Streptozotocin in rats. *Indian J. Clin. Biochem*. 2**007**,*22*,(2),60–64.
Albers, J. W.; Pop-Busui, R. Diabetic Neuropathy: Mechanisms, Emerging Treatments, and Subtypes. Current Neurology and Neuroscience Reports. **2014**,14,(8),473.
Al-Humaidi,G.; Sarikaya,I.; Elgazzar, A.; Owunwanne, A. Myocardial perfusion abnormalitiesin asymptomatic type 2 diabetic patients. *J Saudi Heart Assoc*. **2018**,30,3–8.
American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes 2018. *Diabetes Care*.**2018**,41,(1),13–27.

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. **2014**,37,(1),81–90.
Anderson, T.J.; Meredith, I.T.; Yeung, A.C.; Frei, B.; Selwyn, A.P.; Ganz, P. The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. *N. Engl. J. Me.***1995**,332,488-493.
Antoniades, C.; Bakogiannis, C.; Leeson, P.; Guzik, T.J.; Zhang, M.H.; Tousoulis, D.; Channon, K.M. Rapid, direct effects of statin treatment on arterial redox state and nitric oxide bioavailability in human atherosclerosis via tetrahydrobiopterin-mediated endothelial nitric oxide synthase coupling.*Circulation***. 2011**,124,(3),335-345.
Antoniades, C.; Bakogioannis, C.; Tousoulis, D.; Reilly, S.; Zhang, M.; Paschalis, A.; Antonopoulos, A. S.; Demosthenous, M.; Miliou, A.; Marinou, K.; Sfyras, N.; Economopoulos, G.; Casadei, B.; Channon, K.M.; Stefanadis, C. Preoperative Atorvastatin Treatment in CABG Patients Rapidly Improves Vein Graft Redox State by Inhibition of Rac1 and NADPH-Oxidase Activity. *Circulation.***2010**,122,66-73.
Aoki,C.;Nakano, A.;Tanaka, S.;Yanagi, K.;Ohta, S.;Jojima, T.;Kasai, K.,Takekawa, H.; Hirata, K.,Hattori, Y. Fluvastatin upregulates endothelial nitric oxide synthase activity via enhancement of its phosphorylation and expression and via an increase in tetrahydrobiopterin in vascular endothelial cells. *Int J Cardiol*.**2012**,156,55–61.
Arroyo-Carmona, R.E.; López-Serrano, A.L.; Albarado-Ibañez, A.; Mendoza-Lucero, F.M.F.; Medel-Cajica, D.; López-Mayorga, R.M.; Torres-Jácome, J. (2016). Heart Rate Variability as Early Biomarker for the Evaluation of Diabetes Mellitus Progress. *J Diabetes Res.* **2016**,1-8. 10.1155/2016/8483537.
Atlas de la Diabetes de la Federación Internacional de Diabetes, IDF [en línea] 2015, 7ª edición. Disponible en : http://www.fundaciondiabetes.org/upload/publicaciones_ficheros/95/IDF_Atlas_2015_SP_WEB_oct2016.pdf. Fecha de consulta: (4/04/2018).
Aubert, A.; Ramaekers, D.; Beckers, F.;Breem, R.; Denef, C.; Van de Werf, F.; Ector, H. The analysis of heart rate variability in unrestrained rats.Validation of method and results. *Comput Methods Programs Biomed.* **1999**, 60,(3),197-213.
Balcıoğlu, A. S.; Müderrisoğlu, H. Diabetes and cardiac autonomic neuropathy: Clinical

manifestations, cardiovascular consequences, diagnosis and treatment.*World J Diabetes.***2005**,6,(1),80–91.

Barretto, A.C.; Santos, A.C.;Munhoz, R.;Rondon, M.U.; Franco, F.G.;Trombetta, I.C.;Roveda, F.; de Matos, L.N.; Braga, A.M.;Middlekauff, H.R.;Negrao, C.E. Increased muscle sympathetic nerve activity predicts mortality in heart failure patients.*Int J Cardiol.***2009**,135,302–307.

Batista, P.R.; Botelho, T.; Ribeiro, R.F.; Padilha, A.S.; Vassallo, D.V. Treatment with high dose of atorvastatin reduces vascular injury in diabetic rats. *Pharmacol Rev*. **2016**, 68,865-873.

Bhaskar, R. and Sobhendu, G. Nonlinear Methods to Assess Changes in Heart Rate Variability in Type 2 Diabetic Patients. *Arq Bras Cardiol*.**2013**,52,(11),345-360.

Biancardi, V. C.; Son, S. J.; Sonner, P. M.; Zheng, H.; Patel, K. P.; Stern, J. E. Contribution of central nervous system endothelial nitric oxide synthase to neuro humoral activation in heart failure rats. *Hypertension*. **2011**,58,454–463.

Bilheimer, D.W; Grundy, S.M; Brown, M.S; Goldstein, J.L. Mevinolin and colestipolstimulate receptor-mediated clearance of low density lipoprotein from plasmain familial hypercholesterolemia heterozygotes. *Proc Natl Acad Sci*. **1983**,80,4124–4128.

Billman, G. E. Heart rate variability – a historical perspective. *Front Physiol*. **2011**, 2,(86), 1-13.

Bissinger, A. Cardiac Autonomic Neuropathy: Why Should Cardiologists Care about That?. *J Diabetes Res*.**2017**, 34,(4),1-9.

Bissinger, A. Cardiac Autonomic Neuropathy: Why Should Cardiologists Care about That?. *J Diabetes Res*, **2017**, 1-9.

Bond, M.R.; Hanover, J.A. A little sugar goes a long way: the cell biology of O-GlcNAc. J *Cell Bio.***2015**, 208,869–80.

Bonetti, P.O.; Lerman, L.O.; Lerman, A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2003**, 23:168–75.

Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. **2001**, 414,813–820.

Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.*

2001,414,(6865), 813-820.

Bustos, O. M., C, Hernandez-Presa, M.A.; Tunon, J.; Diaz, C.; Hernández, G.;Egido, J. Atorvastatin reduces NF-kappaB activation and chemokine expression in vascular smooth muscle cells and mononuclear cells. *Atherosclerosis*.**1999**,147,253–261.

Cancino, J. VARIABILIDAD DEL RITMO CARDIACO: ¿POR QUÉ EL CAOS PUEDE SER SALUDABLE?. PENSAR EN MOVIMIENTO: Revista de Ciencias del Ejercicio y la Salud, **2011**.9,1,22-32.

Cao(a), J.M., Fishbein, M.C.; Han, J.B.; Lai, W.W.; Lai, A.C.,; Wu, T.J.; Czer, L.; Wolf, P.L.; Denton, T.A.; Shintaku, I.P., Chen, P.S, Chen, L.S. Relationship between regional cardiac hyperinnervation and ventricular arrhythmia. *Circulation.***2000,** 25, 101(16):1960-9.

Cao, J.M.; Lan, S.; Chen, B.H.; KenKnight, T.O.; Moon-Hyoung, L.; Jerome, T.; William, W.L.; Hrayr, S.; Karagueuzian, P.L.; Wolf, M.C.F.; Peng-Sheng, C. Nerve Sprouting and Sudden Cardiac Death, *Circ Res.* **2000b**, 86:816-821

Carter, A. A.; Gomes, T.; Camacho, X.; Juurlink, D. N.; Shah, B. R.;Mamdani, M. M. Risk of incident diabetes among patients treated with statins: population based study. *The BMJ*, **2013**, *346*,26, 65-78.

Ceriello, A.; Testa, R.; Genovese, S. Clinical implications of oxidative stress and potential role of natural antioxidants in diabetic vascular complications. *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Disease*.**2016**,26,285-292.

Ceriello, A.; Testa, R.; Genovese, S. Clinical implications of oxidative stress and potential role of natural antioxidants in diabetic vascular complications. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* **2016**, 26 ,285-292.

Cesare R. Sirtori. The pharmacology of statins. *Pharmacol Res*. **2014**, 88,3–11.

Chan, S. H.; Tai, M. H.; Li, C. Y.; Chan, J. Y. Reduction in molecular synthesisorenzymeactivity of superoxidedismutases and catalasecontributes to oxidative stress and neurogenichypertension in spontaneouslyhypertensiverats. *Free Radical Biol,* Med. **2006**,40,2028–2039

Chen, H.; Ikeda, U.; Shimpo, M.; Shimada, K. Direct effects of statins on cells primarily involved in atherosclerosis. *Hypertens Res*. **2000**, 23,187-192.

Chessa, M.; Carminati, M.; Butera, G.; Bini, R.; Drago, M.; Rosti, L.; Giamberti, A.; Pome

G.; Bossone, E.; Frigiola, A. Early and Late Complications Associated With Transcatheter Occlusion of Secundum Atrial Septal Defect. *J Am Coll Cardiol*. **2002**, 39, 1061–5.
Chien,K.L.; Hsu, H.C.; Sung, F.C.; Su, T.C.; Chen, M.F.; Lee, Y.T. Metabolic syndrome as a risk factor for coronary heart disease and stroke: an 11-year prospective cohort in Taiwan community. *Atherosclerosis*. **2007,** Sep;194(1):214-21.
Christensen, P. K.; Gall, M. A.; Major-Pedersen, A.; Sato, A.; Rossing, P.; Breum, L. QTc interval length and QT dispersión as predictors of mortality in patientswith non-insulin-dependent diabetes. *Scand J Clin Lab Invest*. **2000**,60,323:332.
Cichosz, S. L.; Frystyk, J.; Tarnow, L.; Fleischer, J.Are changes in heart rate variability during hypoglycemia confounded by the presence of cardiovascular autonomic neuropathy in patients with diabetes? *Diabetes Technol Ther*.**2017**,19, (2), 91–95.
Comparato, C.; Altana, C.; Bellosta, S.; Baetta, R., Paoletti, R.; Corsini, A. Clinically relevant pleiotropic effects of statins: drug properties or effects of profound cholesterol reduction?. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*.**2001**,11,328-343.
Contreras, P.; Canetti, R.; Migliaro, E. R. Correlations between frequency-domain HRV indices and lagged Poincaré plot width in healthy and diabetic subjects. *Physiol Meas*, **2007**,28, 85–94.
Corsini, A.; Bellosta, S.; Baetta, R.; Fumagalli, R.; Paoletti, R.; Bernini, F. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacol Ther*, **1999**,84(3):413-28.
Cosentino-Gomes, D.; Rocco-Machado, N.; Meyer-Fernandes, J.R. Cell signaling through protein kinase C oxidation and activation. *Int. J Mo Sci*, **2012**,13,10697–721
Creager, M.A.; Thomas, ; Luscher T.F. Diabetes and Vascular disease Pathophysiology, clinical consequences, and Medical Therapy: Part I. *Circulation*, **2003**,108,1527-1532.
Da da Silva Costa, E. C.; Arcanjo, A. M.; Morgabel, R. G. Effects of Metformin on QT and QTc Interval Dispersion of Diabetic Rats.Sociedad Brasileira de Cardiología. **2007,**23,(4),234-243.
Da Silva, C.A.; Ribeiro, J.P.; Canto, J.C.; da Silva, R.E.; Silva Junior, G.B.; Botura, E.; Malschitzky, M.A. High-intensity aerobic training improves endothelium-dependent vasodilation in patients with metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res*

Clin Pract, **2012**,95,(2),237-45.
Dabelea, D.; Rewers, A.; Stafford, J.M. Search for Diabetes in Youth Study Group. Trends in the Prevalence of Ketoacidosis at Diabetes Diagnosis: The SEARCH for Diabetes in Youth Study. *Pediatrics*.**2014**,133,938–945.
Danson, E.J.; Paterson, D.J. Reactive oxygen species and autonomic regulation of cardiac excitability. *J Cardiovasc Electrophysiol*.**2006**,1,104-112.
Dasu, M.R.; Devaraj, S.; Zhao, L.; Hwang, D.H.; Jialal, I. High Glucose Induces Toll-Like Receptor Expression in Human Monocytes: Mechanism of Activation. *Diabetes*. **2008**,57,3090–3098.
Davignon, J. The cardioprotective effects of statins. *Curr Atheroscler Rep*.**2004,** Jan;6(1):27-35.
Davignon, J.; Jacob, R. F.; Mason, R.P. The antioxidant effects of statins. *Coron Artery Dis*. **2004.**15,251-258.
Davignon, J.; Laaksonen, R. Low-density lipoprotein-independent effects of statins. *Curr Opin Lipidol.* **1999**,10,543–59.
Davis, F.B.; Davis, P.J.; Nat, G. The effect of in vivo glucose administration on human erythrocyte Ca2+-ATPase activity and on enzyme responsiveness in vitro to thyroid hormone and calmodulin. Diabetes.**1985**,34,(7),639–646.
De Sotomayor, M.A.; Pérez-Guerrero, C. Herrera, M.D.; Jiménez, L.; Marin, R.; Marhuenda, E.; Andriantsitohaina, R. Improvement of age-related endothelial dysfunction by simvastatin: effect on NO and COX pathways.*Br J Pharmacol.* **2005**,146,1130–1138.
Deanfield, J.E.; Halcox, J.P.;Rabelink, T.J. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*. **2007**,115,1285–1295.
DeGiorgio, C. M.; Miller, P.; Meymandi, S.; Alex Chin, M. D.; Gordon, S.; Gornbein, J.; Ronald, M. RMSSD, a Meausure of Heart Rate Varibility, Is Associated With Risk Factors For SUDEP: The SUDEP-7 Inventory. Epilepsy Behav. 2010,19,(1),78-81.
Del, P.A.; Zaccagnino, P.; Di, P.M.; Saltarella, M.; Oliveros, C. C.; Nico, B.; Santoro, G.; Lorusso, M. Role of mitocondria and reactive oxygen species in dentritic cell differentiation and functions. *Free Radic Biol Med.* **2008**,44,1443-1451.
Deo, S. H.; Fisher, J. P.; Vianna, L. C.; Kim, A.; Chockalingam, A.; Zimmerman, M. C.;

Fadel, P. J. Statin therapy lowers muscle sympathetic nerve activity and oxidative stress in patients with heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2012,***303*,(3),377–385. Disponible en : https://pubchem.ncbi.ncbi.nlm.nih.gov/compound/atorvastatin#section=Top. Fecha de consulta: (8/01/2018).
Dimitropoulos, G.; TahraniA.; Stevens, M. Cardiac autonomic neuropathy in patients with diabetes Mellitus. *World J Diabetes*, **2014**,5,(1), 17-39.
Drel, V. R.; Pacher, P.; Ali, T. K.; Shin, J.; Julius, U.; El-Remessy, A. B.; Obrosova, I. G. Aldose reductase inhibitor fidarestat counteracts diabetes-associated cataract formation, retinal oxidative enitrosative stress, glial activation, and apoptosis. *Int J MolMed*. **2008**,21,667–676.
Drel, V. R.; Pacher, P.; Stevens, M. J.; Obrosova, I. G. Aldose reductase inhibition counteracts nitrosative stress and poly(ADPribose) polymerase activation in diabetic rat kidney and high-glucose exposed human mesangial cells. *Free Radic Biol Med*. **2006**,40,1454–1465.
Edwards, J.; Vincent, A.; Cheng, T.; Feldman, E. Diabetic Neuropathy: Mechanisms to Management. *Pharmacol Ther*, **2008**,120,(1), 1–34.
Eleazu, C.O.; Eleazu, K. C.; Chukwuma, S.; Essien, U. N.; Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animal, its practical use and potential risk to humans. *J Diabetes Metab Disord*. **2013**,12,60-67.
Endo A. The origin of the statins. *Atheroscler Suppl.* **2004**,5,125–30.
Fiorentini, A, Perciaccante R, Valente R, Paris A, Serra P, Tubani L. The correlation among QTc interval, hyperglycaemia and the impaired autonomic activity. *Auton Neurosci.* **2010**,154,(1–2),94–98.
Fisher,V.; Tahrani, A. Cardiac autonomic neuropathy in patients with diabetes mellitus: current perspectives. *Diabetes Metab Syndr Obes*. **2017**,10, 419-434.
Forman, H. J.; Zhang, H.; Rinna, A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. Mol Aspects Med.**2009**. 30,1,1-12.
Francis, G.S.; Cohn, J.N.; Johnson, G.; Rector, T.S.; Goldman, S.; Simon, A. Plasma norepinephrine, plasma renin activity, and congestive heart failure: relations to survival and the effects of therapy in V-HeFT II: the V-HeFT VA Cooperative Studies

Group. *Circulation.***1993**,87,(7),40–48.
Fukui, T.; Ishizaka, N.; Rajagopalan, S.; Laursen, J.B.; Capers, Q.; Taylor, W.R.; Harrison, D.G.; de Leon, H.; Wilcox, J.N., Griendling, K.K. p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ Res.***1997**,80,45–51.
Gao, D.;Hao, G.; Niu, X. *PPAR Researc*h, **2012**, 1-7. (doi:10.1155/2012/856426)
Gao, L.; Wang, W. ;Zucker, I. H. Simvastatin inhibits central sympathetic outflow in heart failureby a nitric-oxide synthase mechanism.*J Pharmacol Exp Ther.* **2008**,326, 278–285.
Gao, L.; Wang, W.; Li, Y.L.; Schultz, H.D.; Liu, D.; Cornish, K.G.; Zucker, I.H. Superoxide mediates sympathoexcitation in heart failure: roles of angiotensin II and NAD(P)H oxidase. *Circ Res*. **2004**,95,937–944.
Garthwaite, J. and Boulton, C. L. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol*.**1995**,57,683–706.
Giacco, F.; Du, X.; Carratu, A.; Gerfen, G.J.; D'Apolito, M.; Giardino, I.; Rasola, A.; Marin, O.; Divakaruni, A.S.; Murphy, A.N.; Shah, M.S.; Brownlee, M. GLP-1 Cleavage Product Reverses Persistent ROS Generation After Transient Hyperglycemia by Disrupting an ROS-Generating Feedback Loop. *Diabetes*. **2015**,64,3273–84.
Giannoukakis N. Drug evaluation: ranirestat – an aldose reductase inhibitor for the potential treatment of diabetic complications. *Curr Opin Investig Drugs*. **2006**,7,916–923.
Goit, R. K.; Paudel, B. H.; Khadka, R.; Roy, R. K.; & Shrewastwa, M. K. Mild-to-moderate intensity exercise improves cardiac autonomic drive in type 2 diabetes. *J. Diabetes Investig*, **2014**,5,(6),722–727.
Gomes, M.E.; Lenders, J.W.; Bellersen, L.; Verheugt, F.W.; Smits, P.; Tack, C.J. Sympatho inhibitory effect of statins in chronic heart failure. *Clin Auton Res*.**2010**,20,(2),73–78.
Goud, B. J.; Dwarakanath, B. K. Chikka Swamy. Streptozotocin-A diabetogenic agent in animal models. *Int. J. Pharm. Pharm. Res.***2015**,3,253-269.
Goyal, S. N.; Reddy, N. M.; Patil, K. R.; Nakhate, K. T.; Ojha, S.; Patil, C. R.; Agrawal, Y. O. Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes – A clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics. *Chem Biol Interact*.**2016**,244,(25),49-63.
Goyal, S.N.; Reddy, N.M.; Patil, K.R.; Nakhate, K.T.; Ojha, S.; Patil, C.R.; Agrawal, Y.O.

Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes - A clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics.*Chem Biol Interact*.**2016**,25,244,49-63.
Grassi, G.; Esler, M. How to assess sympathetic activity in humans. *J Hypertens*.**1999**,17,(6),719–734.
Griendling, K.K.; Minieri, C.A.; Ollerenshaw, J.D.; Alexander, R.W. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.***1994**,74,1141–1148.
Griendling, K.K.; Minieri, C.A.; Ollerenshaw, J.D.; Alexander, R.W. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.***1994**,74,1141–1148.
Gupta, S.; Sussman, I.; McArthur, C.S.; Tomheim, K.; Cohen, R.A.; Ruderman, N.B. Endothelium-dependent Inhibition of Na+-K+ATPase activity in rabbit aorta by hyperglicemia. Possible role of endothelium-derived nitric oxide.*J Clin Invest.***1992**,90, 727–732.
Guzik, P.; Bartosz, Bychowiec, B.; Jarosław, Piskorski, J.; Wegrzynowski, A.;Krauze, T.; Schneider, R.; Piotr Liszkowski, P.; Wykretowicz, A.;Bogna Wierusz-Wysocka, B.; Wysocki, H. Heart rate variability by Poincaré plot and spectral analysis in young healthy subjects and patients with type 1 diabetes. *ResearchGate.***2005**,23,176–182.
Hall, J.E. Guyton y Hall Tratado de fisiología médica. 13ª edición; Elsevier: **2016**.
Hamada Y. Araki N., Horiuchi S., Hotta N. Role of polyol pathway in nonenzymatic glycation. *Nephrol. Dial. Transplant*.**1996**,11,(5),95–9810.
Hamelin,B. A.; Turgeon, J. Hydrophilicity/lipophilicity: relevanceforthepharmacology and clinicaleffects of HMG-CoAreductaseinhibitors.*Trends Pharmacol. Sci.***1998**.19,26–37.
Hardiville, S.; Hart, G.W. Nutrient regulation of signaling, transcription, and cell physiology by O-GlcNAcylation. *Cell metabol*. **2014**,20,208–13.
Hattori, Y.; Matsumura, M.;Kasai, K. Vascular smooth muscle cell activation by C-reactive protein. *Cardiovasc Res*. **2003**,58,186–195.
Hattori, Y.; Nakanishi, N.; Akimoto, K.; Yoshida, M.; Kasai, K. HMG-CoA reductase inhibitor increases GTP cyclohydrolase I mRNA and tetrahydrobiopterin in vascular

endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2003**,23,176–182.
Heather, L. C. and Clarke, K. Metabolism, hypoxia and the diabetic heart. *J Mol Cell Cardiol*.**2011**,50, 598–605.
Hernández-Presa, M.A.; Ortego, M.; Tunon, J.; Martin-Ventura, J.L. Mas, S.; Blanco-Colio, L.M.; Aparicio, C.; Ortega, L.; Gómez-Gerique, J.; Vivanco, F.; Egido, J. Simvastatin reduces NF-kappaB activity in peripheral mononuclear and in plaque cells of rabbit atheroma more markedly than lipid lowering diet. *Cardiovasc Res*.**2003**,57,168–177.
Hirooka, Y.; Shigematsu, H.; Kishi, T.; Kimura, Y.; Takeshita, A. Reduced nitric oxide synthase in the brain stem contributes to enhance dsympathetic drive in rats with heart failure.*J Cardiovasc Pharmacol.***2003**,42,111–115.
Ho, E. C.; Lam, K. S.; Chen, Y. S.; Yip, J. C.; Arvindakshan, M.; Yamagishi, S.; Yagihashi, S.; Oates, P. J.; Ellery, C. A.; Chung, S. S.; and Chung, S. K. Aldose reductase-deficient mice are protected from delayed motor nerve conduction velocity, increased cJun NH2-terminal kinase activation, depletion of reduced glutathione, increased superoxide accumulation, and DNA damage. *Diabetes*. **2006**,55,1946–1953.
Hong, H.;Zeng, J.S.;Kreulen, D.L.;Kaufman, D.I.;Chen, A.F. Atorvastatin protects against cerebral infarction via inhibition of NADPH oxidase-derived superoxide in ischemic stroke. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2006**,291,2210–2215.
Horwhich, T.; Midelekauff, H. Potential Autonomic Nervous System Effects of Statins in Heart Failure. *Heart Fail Clin*. **2008**,4,163-170.
Horwich, T.B.; Middlekauff, H.R.; Maclellan, W.R.; Fonarow, G.C. Statins do not significantly affect muscle sympathetic nerve activity in humans with non ischemic heart failure: a double-blind placebo-controlled trial, *J CardFail*.**2011**,17,(11),879–886.
Howart, F. C.; Adeghate, E.; Jacobson, M. Heart rate and QT interval in Streptozotocin-induced Diabetes Rat. *J Med Sci*.**2009**,2,(3):108-118.
Howart, F. C.; Jacobson, M.; Shafiuliah, M.; Adeghate, E. Long-term effects of streptozotocin-induced diabetes on the electrocardiogram, physical activity and body temperatura in rats. *Exp Physiol*. 2005.90, 827-835.
Howarth, F.; Jacobson, M.; Shafiullah, M.; EAdeghate, E. Long-term effects of streptozotocin-induced diabetes on the electrocardiogram, physical activity and body

temperature in rats. *Exp Physiol*, **2005**, 90,(6),827–835.
Hsu CH1, Tsai MY, Huang GS, Lin TC, Chen KP, Ho ST, Shyu LY, Li CY. Poincaré plot indexes of heart rate variability detect dynamic autonomic modulation during general anesthesia induction. *Acta Anaesthesiol Taiwan.* **2012**,50,(1),12-8.
Huatala, A. J.; Kiviniemi, A. M.; Makikallio, T. H.; Kinnunen, H.; Huikuri, H. V.; Tulppo, M. P. Individual differences in the responses to endurance and resistance training.*Eur J Appl Physiol*.**2006**,96,(5),535-542.
Huikuri, H.V.; Jokinen, V.; Syvänne, M.; Nieminen, M.S.; Airaksinen, K.E.; Ikäheimo, M.J.; Koistinen, J.M.; Kauma, H.; Kesäniemi, A.Y.; Majahalme, S.; Niemelä, K.O.; Frick, M.H. Heart rate variability and progression of coronary atherosclerosis. Arterioscler *Thromb Vasc Biol*.**1999,** Aug;19(8):1979-85.
Insel, R.A.; Dunne, J.L.; Atkinson, M.A. Staging presymptomatic type 1 diabetes: a scientific statement of JDRF, the Endocrine Society, and the American Diabetes Association. *Diabetes Care*.**2015**,38,1964–1974.
Jin, H.; Baek, H.; Park, T. Morphologic Changes in Autonomic Nerves in Diabetic Autonomic Neuropathy. *Diabetes Metab J*.**2015**, 39, 461-467.
Johansen, J. S.; Harris, A. K.; Rychly, D.; Ergul, A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice.*Cardiovascular Diabetology*.**2005**,4,(5),1-11.
Johnson B. F.; Nesto R. W.; Pfeifer M. A.; Slater W. R.; Vinik A. I.; Chyun D. A.; Law G., Wackers F. J.; Young L. H. Cardiac abnormalities in diabetic patients with neuropathy: effects of aldose reductase inhibitor administration. *Diabetes Care*.**2004**, 27,448–45410.
Julius, S.; Jamerson, K. Sympathetics, insulin resistance and coronary risk in hypertension: the chicken-and-egg question.*J Hypertens*.**1994**,12,495–502.
Kapur, N. and Musunuru, K. Clinical efficacy and safety of statins in managing cardiovascular risk. *Vasc Health Risk Manag.***2008**,4,(2),341–353.
Kaur, N.; Kishore, L.; Singh, R. Diabetic Autonomic Neuropathy: Pathogenesis to Pharmacological Management. *J Diabetes Metab*.**2014**, 5:7.
Kennedy A. L.; Lyons T. J. Glycation, oxidation, and lipoxidation in the development of diabetic complications. *Metab Clin Exp*.**1997**,46,14–2110.

Kerner, W.; Brückel, J. Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus.*Exp Clin Endocrinol Diabetes*. **2014**,122(7):384-6.
Kerr, S.; Brosman, J.; McIntyre, M. Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension.*Hypertension.***1999**,33,1353–1358.
Khandoker, A. H.; Herbert, F. J.; Marimuthu, P. Identifying diabetic patients with cardiac autonomic neuropathy by heart rate complexity analysis. *Biomed Eng*.**2009**, 8, (3), 1-12.
Kimoto-Kinoshita, S.; Nishida, S.; Tomura, T.T. Age-related change of antioxidant capacities in the cerebral cortex and hippocampus of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Neurosci Lett.***1999**, 273, 41–44.
Kishi, T., Hirooka, Y., Shimokawa, H., Takeshita, A. and Sunagawa, K. Atorvastatin reduces oxidative stress in the rostral ventrolateral medulla of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin. Exp. Hypertens.***2008**,30,3–11.
Kishi, T.; Hirooka, Y.; Kimura, Y.; Ito, K.; Shimokawa, H.; Takeshita, A. Increased reactive oxygen species in rostral ventrolatera lmedulla contribute to neural mechanisms of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Circulation*.**2004**,109,2357–2362.
Kishi, T.; Hirooka, Y.; Mukai, Y.; Shimokawa, H.; Takeshita, A. Atorvastatin causes depressor and sympatho-inhibitory effects with upregulation of nitric oxide synthases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*, **2003**, 21,(2),379-386.
Kishi, T.; Hirooka, Y.Central mechanisms of abnormal sympatho excitation in chronic heart failure. *Cardiol Res Pract*. **2012**,4,847-172.
Kishi, Tand Yoshitaka, H. Oxidative stress in the brain causes hypertension via sympatho excitation. *Front. Physiol*, **2012**, 3,(335),1-8.
Kleiger, R.E.; Miller, J.P.; Bigger, J.T.; Moss, A.J. Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction.*Am J Cardiol.* **1987**,59,(4),256-62.
Koichubekov,B.; Riklefs, V.; Sorokina, M.; Korshukov, I.; Turgunova, L.; Laryushina, Y.; Bakirova, R.; Muldaeva, G.; Bekov, E.; Kultenova, M. Informative Nature and Nonlinearity of Lagged Poincaré Plots Indices in Analysis of Heart Rate Variability. *Entropy*. **2017**, 19,10, (523), 1-16.

Konior, A., Schramm, A., Czesnikiewicz-Guzik, M., & Guzik, T. J. NADPH Oxidases in Vascular Pathology. *Antioxidants & Redox Signaling*.**2014**,20,(17),2794–2814.
Kosmidou, I.; Moore, J.P. Weber, M.Searles, C.D. Statin treatment and 3′ polyadenylation of eNOS mRNA. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2007**,27,2642–2649.
Krishna, B. H.; Reddy, M.; Sigh, S.B.; Kumar, K. Cardiovascular autonomic neuropathy in diabetics: Correlation with duration of diabetes. *Biomedical Research*.**2014**,25,(3),307-310.
Kumar, R.; Fisher, M.; Whitaker, R.; Macfarlane, P.W. Effect of controlling hyperglycemia with diet on QT abnormalities in newly diagnosed patients with type 2 diabetes.*Diabet Care.* **2004**,27,2767–2768.
Landmesser, U.; Hornig, B.; Drexler, H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis?.*Circulation*.**2004**,109,II27–II33.
Lassegue, B.; Sorescu, D.; Szocs, K.; Yin, Q.; Akers, M.; Zhang, Y.; Grant, S.L.; Lambeth, J.D.; Griendling, K.K. Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates angiotensin II–induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways.*Circ Res.***2001**,88,888–894.
Laufs, U.; La Fata, V.; Plutzky, J.; Liao, J.K. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors.*Circulation*.**1998**,97,1129-1135.
Laufs, U.;Liao, J.K. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem*. **1998**,273,24266–24271.
Lee, A. Y. and Chung, S. S. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J*.**1999**,13,23–30.
Lee, R.; Margaritis, M.; Channon, K.M. Evaluating oxidative stress in human cardiovascular disease: methodological aspects and considerations. *Curr Med Chem*.**2012,**19,2504-20.
Legarda, M.; Dalmau, J. Utilidad de las estatinas en el tratamiento de la hipercolesterolemia en niños. Unidad de Nutrición y Metabolopatías. Hospital Universitario La Fe. Valencia. España. *An Pediatr Contin*. **2007**,5,(3),155-158.
Lewandowski, J.; Symonides, B.; Gaciong, Z.; Siński, M. The effect of statins on sympathetic activity: a meta-analysis.*ClinAuton Res*.**2015**,25(2),125–131.
Li, X.; Ren, H.; Zhang-rong, X.; Liu, Y-j.; Yang, X-p.; Liu, J. Prevalence and risk factors of prolonged QTc interval among Chinese patients with type 2 diabetes. Exp Diabet Res. 2012.

251,317–324.
Li,D; Chen, H.;Romeo, F.;Sawamura, T.; Saldeen, T.; Mehta, J.L. Statins modulate oxidized low-density lipoprotein-mediated adhesion molecule expression in human coronary artery endothelial cells: role of LOX-1. *J Pharmacol Exp Ther*.**2002**,302,601–605.
Liao, J. K.; Laufs, U. Pleitropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. **2005** 45, 89–118. http://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095748
Liao, J.K. Isoprenoids as mediators of the biological effects of statins. *J. Clin. Invest.* **2002**,110,285-288.
Liao,J.K.;Laufs,U.Pleiotropiceffectsofstatins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.***2005**,45:89–118.
Lie, G.; Wei, W.; Yu-Long, L.; Harold, D. S., Dongmei, L.; Kurtis, G.; Cornish, I.; Zucker, H. Simvastatin Therapy Normalizes Sympathetic Neural Control in Experimental Heart Failure Roles of Angiotensin II Type 1 Receptors and NAD(P)H Oxidase. *Circulation.***2005**,112,1763-1770.
Lim, S.; Barter, P. Antioxidant effects of statins in the management of cardiometabolic disorders. *J Atheroscler Thromb*. **2014**,21,997-1010.
LiverTox. Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury (En Línea) Consultado en: https://livertox.nlm.nih.gov/Atorvastatin.htm fecha de consulta (13/04/2018)
López-López, J. G.; Moral-Sanz, J.; Frazziano, G.; Gomez-Villalobos, M. J.; Flores-Hernández, J.; Monjaraz, E.; Cogolludo, A.; Perez-Vizcaino, F. Diabetes induces pulmonary artery endothelial dysfunction by NADPH oxidase induction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physio.***2008**, *295, 727–732.*
Mahjoub, S.; Masrour-Roudsari, J. Role of oxidative stress in pathogenesis of metabolic síndrome. *Caspian J Intern Med*. **2012**. 3,(1),386-396.
Malik, J.; Stulc, D.; Wichterle, V.; Melenovsky, E.; Chytilova, Z.; Lacinova, Z.; Marek; Ceska, R. Hyperlipidemia is Associated with Altered Levels of Insulin-Like Growth Factor-I *Physiol Res*. **2008**, 57, 919-925.
Malik, M.; Bigger, J. T.; Camm, A. J.; Kleiger, R. E.; Malliani, A.; Moss, A. J. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Eur. Heart J*. **1996**,17, 354–381.
Manasi, S. ;Brownlee, M. Molecular and Cellular Mechanisms of Cardiovascular Disorders in

Diabetes. *Circ Res,* **2016**,118,1808-1829.
Marangoni, M. N.; Brady, S. T.; Chowdhury, S. A. "Th eco-occurrence of myocardial dysfunction and perihereal insensate neuropathy a streptozotocin-induced rat model of diabetes", Cardiovascular Diabetology, vol.13, article 11, 2014.
Margariti, M.; Channon, K.M.; Antoniades, C. Statins as Regulators of Redox State in the Vascular Endothelium: Beyond Lipid Lowering. *Antioxid Redox Signal*. **2014**,20,(8),1198-1210.
Martínez-González,J.;Raposo,B.,Rodriguez,C.;Badimon,L.3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition prevents endothelial NO synthase downregulation by atherogenic levels of native LDLs: balance between transcriptional and posttranscriptional regulation.*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2001**,21,804–809.
Matsuki, A.; Nozawa,T.; Igarashi, N.; Sobajima, M.; Ohori,T.; Suzuki,T.; Fujii,N.; Igawa, A.; Inoue, H. Fluvastatin Attenuates Diabetes-Induced Cardiac Sympathetic Neuropathy in Association With a Decrease in Oxidative Stress, *Circ J*, 2010, **February 25.**
Mazzuco, A.; Medeiros, W. M.; Souza, A. S.; Alencar, M. C.; Neder, J. A.; Borghi-Silva, A. Are heart rate dynamics in the transition from rest to submaximal exercise related to maximal cardiorespiratory responses in COPD?.*Brazilian Journal of Physical Therapy*.**2017**, 21(4), 251–258.
México. Secretaría de Salud (2013). II Guía de Tratamiento Farmacológico de Dislipidemias para el primer nivel de atención. *Revista Mexicana de Cardiología*. **2013,** 24, Suplemento 1, Octubre - Diciembre., S23-S37.
Millar, P. M.; Floras, J.S. Statins and the autonoic nervous sys. Clin Sci. **2014**, 126: 401-415.
Millar, P.J.; McGowan, N.; McCartney, N.; MacDonald, M.J. Isometric handgrip training lowers blood pressure and increases heart rate complexity in medicated hypertensive patients. *Scand J Med Sci Sports*, 2012, **23,5, 620-626, https://doi.org/10.1111/j.1600-0838.2011.01435.x**
Mitani, H.; Egashira, K.; Ohashi, N.; Yoshikawa, M.; Niwa, S.; Nonomura, K.; Nakashima, A.; Kimura, M. Preservation of endothelial function by the HMG-CoA reductase inhibitor fluvastatin through its lipid-lowering independent antioxidant properties in atherosclerotic

rabbits.*Pharmacol*.**2003**,68,121–130.

Montano, N.; Ruscone, T.G.; Porta, A.; Lombardi, F.; Pagani, M.; Malliani A. Power spectrum analysis of heart rate variability to assess the changes in sympathovagal balance during graded orthostatic tilt. *Circulation*. 1994**,90,(4),1826-31.**

Morgan, M.J.; Liu, Z.G. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling.*Cell Res*. **2011**,21,103–115.

Nagae, A.; Fujita, M.; Kawarazaki, H.; Matsui, H.; Ando, K.; Fujita, T. Sympathoexcitationbyoxidative stress in thebrainmediates arterial pressureelevation in obesity-inducedhypertension.*Circulation*.**2009**,119,978–986.

Newton, C.A.; Raskin, P. Diabetic ketoacidosis in type 1 and type 2 diabetes mellitus: clinical and biochemical differences. *Arch Intern Med*. **2004**,164,1925–1931.

NIH.United States National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information. PubChem: Open Chemistry Database. *Artovastatin* (en línea) consultado en: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/atorvastatin fecha de constulta (13/04/2018)

NIH; DailyMed. Información actual sobre medicamentos para la tableta de Lipitor (Atorvastatin Calcium), recubierta con película (Actualizado: noviembre de 2015). Disponible a partir del 28 de octubre de 2016: https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=c6e131fe-e7df-4876-83f7-9156fc4e8228 de HSDB.

Nishihara, M.; Hirooka, Y.; Matsukawa, R.; Kishi, T.; Sunagawa, K. Oxidative stress in the rostral ventro lateral medulla modulates excitatory and inhibitory inputs in spontaneously hypertensive rats.*J Hypertens*.**2012**,30,97–106.

Nishikawa T.; Edelstein D.; Du X. L.; Yamagishi S.; Matsumura T.; Kaneda Y.; Yorek M. A.; Beebe D.; Oates P. J.; Hammes H. P.; Giardino I.; Brownlee M.Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*.**2000**,404,787–79010.

Node, K.; Fujita, M.; Kitakaze, M.; Hori, M.; Liao, J.K. Short-term statin therapy improves cardiac function and symptoms in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy.*Circulation*.**2003**,108,839–843.

Obrosova, I. G.; Minchenko, A. G.; Vasupuram, R.; White, L.; Abatan, O. I.; Kumagai, A. K.;

Frank, R. N.; and Stevens, M. J. (2003). Aldose reductase inhibitor fidarestat prevents retinal oxidative stress and vascular endothelial growth factor overexpression in streptozotocindiabetic rats. *Diabetes*.**2003**,52,864–871.
Obrosova, I. G.; Pacher, P.; Szabo, C.; Zsengeller, Z.; Hirooka, H.; Stevens, M. J.; Yorek, M. A. Aldose reductase inhibition counteracts oxidative-nitrosative stress and poly(ADP-ribose) polymerase activation in tissue sites for diabetes complications. *Diabetes*.**2005**,54,234–242.
Ohtsuki, T.; Matsumoto, M.; Suzuki, K. Mitochondrial lipid peroxidation and superoxide dismutase in rat hypertensive target organs. *Am J Physiol.* **1995**,268,1418–1421.
Oliveira, A. L.; de Azeredo, R.P; Gonçalves, T.; da Silva Soares, P.P. Effects of Hypoxia on Heart Rate Variability in Healthy Individuals: A Systematic Review. *Int J Cardiovasc Sci*, **2017**,30,(3),251-261.
Ortego, M.; Gomez-Hernandez, A.; Vidal, C.; Sanchez-Galan, E.; Blanco-Colio, L.M.; Martin-Ventura, J.L.; Tunon, J.; Diaz, C.; Hernandez, G.; Egido, J. HMG-CoA reductase inhibitors reduce I kappa B kinase activity induced by oxidative stress in monocytes and vascular smooth muscle cells. J Cardiovasc Pharmacol. 2005,45,468–475.
Park, M.K. and Watanuki, S. Specific physiological responses in women with severe primary dysmenorrhea during the menstrual cycle. J. *Physiol. Anthropol Appl Human Sci,* 2005**, 24,601-609.**
Patterson, D., Dick, J. B. C., & Struthers, A. D. Intensive statin treatment improves baroreflex sensitivity: another cardioprotective mechanism for statins? *Heart*, **2002,** *88*(4), 415–416.
Pehlivanidis A.N.; Athyros ,V.G.; Demitriadis, D.S.; Papageorgiou, A.A.; Bouloukos, V.J.; Kontopoulos, A.G. Heart rate variability after long-term treatment with atorvastatin in hypercholesterolaemic patients with or without coronary artery disease. *Atherosclerosis*, **2001,** Aug;157(2):463-9.
Pelat,M.; Balligand, J.L. Statins and hypertension, *Semin Vasc Med*, **2004**, 4(4):367-75.
Pereira-Junior. P. P.; Marocolo, M.; Rodrigues, F. P.; Medei, E. Noninvasive method for electrocardiogram recording in consious rats: feasibility for heart rate variability analysis. Annals of the Brazilian Academy of Sciences.2010. 82,(2),431-437.
Pignatelli, P.;Carnevale, R.;Cangemi, R.;Loffredo, L.;Sanguigni, V.; Stefanutti, C.;Basili, S.Violi, F. Atorvastatin inhibits gp91phox circulating levels in patients with

hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2010**,30,360–367.
Pliquett, R.U.; Cornish, K.G.; Zucker, I.H. Statin therapy restores sympathovagal balance in experimental heart failure. *J Appl Physiol.* **2003**,95,700–704.
Psarros, C.; Economou, E.K.; Koutsilieris, M.; Antoniades, C. Statins as Pleiotropic Modifiers of Vascular Oxidative Stress and Inflammation.*Indian J Crit Care Med*. **2015**,1,(2),43-54.
Quintana, M; Lindvall, K.; Brolund, F.; Storek, N.; Lindblad, L.E.; Rydén, L. Markers of risk after acute myocardial infarction. A comparison of clinical variables, ambulatory and exercise electrocardiography, echocardiography, and stress echocardiography. *Coronary Artery Disease*, **1997**, June.
Rains, J. L.; Sushil, K. J. Oxidative stress, insulin signaling and diabetes. Free Radic Biol Med. 2011.50,(5),567-575.
Rajagopalan, S.; Kurz, S.; Munzel, T.; Tarpey, M.; Freeman, B.A.; Griendling, K.K.; Harrison, D.G. Angiotensin II–mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation: contribution to alterations of vasomotor tone. *Clin Invest.* **1996**,97,1916–1923.
Rajendra, A. U.; Kannathal, N.; Lim, C. M.; Suri, J. S. Heart rate variability: a review. *Med Biol Eng Comput.* **2006**, 44, (12),1031-1051.
Ramasamy, R.; Goldberg, I.J. Aldose reductase and cardiovascular diseases, creating human-like diabetic complications in an experimental model. *Circ Res*. **2010**,106,1449–58.
Ramírez, J. A. *Simposio : Sistema nervioso autónomo y control de la presión arterial* [en línea] 2003;de Rev. Arg. Anest. Disponible en: http://www.anestesia.org.ar/search/articulos_completos/1/1/646/c.pdf. Fecha de cosulta: (09/01/2018).
Ramirez M. A., Borja N. L. Epalrestat: an aldose reductase inhibitor for the treatment of diabetic neuropathy. *Pharmacother*. **2008**,28, 646–655.
Riahi S.; Schmidt, E.B.; Christensen, J.H.; Heath, F.; Pedersen, A.K.; Nielsen, J.C.; Mølgaard, H.; Toft E. Statins, Ventricular Arrhythmias and Heart Rate Variability in Patients with Implantable Cardio verter Defibrillators and Coronary Heart Disease. *Cardiology*, **2005**;104:210–214 https://doi.org/10.1159/000088175
Riahi, S.; Christensen, J.H.; Toft, E.; Skou, H.A.; Schmidt, E.B. HMG-CoA reductase

inhibitors improve heart rate variability in patients with a previous myocardial infarction.*Pharmacol Res.***2002**,45,(6),479–483.
Ribeiro, E.; Ribeiro-Fontes, C. A.; Tavares, P. Heart Rate Profile and Variability in Cross Country Cycling Athletes.Research Gate. 2016. 6, (1),2-8.
Rinckel, L.A.; Faris, S.L.; Hitt, N.D.; Kleinberg, M.E. Rac1 disrupts p67phox/p40phox binding: a novel role for Rac in NADPH oxidase activation.*Biochem Biophys Res Commun.***1999**,263,118–122.
Rodas, G.; Carballido, C. P.; Ramos, J.; Capdevila, L. Variabilidad de la frecuencia cardiaca: concepto, medidas y relación con aspectos clínicos.Archivos de medicina del deporte.2008.123,41-47.
Roden, D.; Viswanathan, P. Genetics of acquired long QT síndrome. J Clin Invest. 2005. 115, 2025-2032.
Rohilla, A.; Ahmad, A.; Khan, M. U.; Khanam, R. A comparative study on the cardioprotective potential of atorvastatin and simvastatin in hyperhomocysteinemic rat hearts.*Eur J Pharmacol*. **2015**,764,48-54.
Rohilla, A.; Ali, S. Alloxan induced Diabetes: Mechanisms and Effects. Int. J. Res. Pharm. Biom. Sci.**2012**. 3, (2), 819-823
Rousselot, P.; Piquet, M-A.; Dao, Thong; Verwaerde, J.C. Cardiac sources of embolism should be routinely screened in ischemic colitis. *Am J Gastroenterol* , **2003**, 98, 1573–1577. doi:10.1111/j.1572-0241.2003.07483.x
Rubart, M.; Zipes, D.P. Mechanisms of sudden cardiac death. *J Clin Invest*. **2005** Sep;115(9):2305-15.
Sanguinetti, M.C.; Keating,M.T. Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell* **2001**,104 (4), 569-580
Schlaich, M. P.; Kaye, D. M.; Lambert, E.; Sommerville, M.; Socratous, F.; Esler, M. D. Relation between cardiac sympathetic activity and hypertensive left ventricular hypertrophy. *Circulation*.**2003**,108,560–565.
Schmidt A. M.; Hori O.; Brett J.; Yan S. D.; Wautier J. L.; Stern D. Cellular receptors for advanced glycation end products. Implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. *Arterioscler Thromb*. **1994**,14,1521–

152810.
Seyed,K. S.; Mohebb, M. Support vector machine-based arrhythmia classification using reduced features of heart rate variability signal. *Artif Intell Med*,**2008**,44,51—64.
Sha, M. S.; Brownlee, M. Molecular and Cellular Mechanisms of Cardiovascular Disorders in Diabetes. *Circ Res.* **2016**, 118,(11),1808-29.
Shaffer, F.; Ginsberg, J. P. An Overview of Heart Rate Variability Metrics and Norms. Front Public Health.2017.5,(258),1-17.
Shah, M. S., & Brownlee, M. Molecular and Cellular Mechanisms of Cardiovascular Disorders in Diabetes. *Circ Res*, **2016,***118*(11), 1808–1829. http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.306923
Shiba, T.; Inoguchi, T.; Sportsman, J.R.; Heath, W.F.; Bursell, S.; King, G.L. Correlation of diacylglycerol level and protein kinase C activity in rat retina to retinal circulation. *Am J Physiol.* **1993**,265,783–93.
Shimoni Y, Ewart HS, Severson D. Type I and II models of diabetes produce different modifications of K^+currents in rat heart: role of insulin. *J. Physio,* **1998**, 507:485–496.
Shinohara, K.; Hirooka, Y.; Kishi, T.; Sunagawa, K. Reduction of nitric oxide-mediated γ - amino butyric acid release in rostral ventro lateral medullais involved in superoxide-induced sympatho excitation of hypertensive rats. *Circ. J*.**2012**, 76, 2814–2821.
Shitara, Y.; Sugiyama, Y. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: Drug–drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. *Pharmacol Ther*. **2006**,112,71-105.
Siddiqi, L.; Joles, J.A.; Oey, P.L.; Blankestijn, P.J. Atorvastatin reduces sympatheticactivity in patients with chronic kidney disease. *J Hypertens.***2011**,29,(11),2176–2180.
Sifuentes-Franco, S.; Pacheco-Moisés, F.; Rodríguez-Carrizalez, A.; Miranda-Díaz, A.The Role of Oxidative Stress, Mitochondrial Function, and Autophagy in Diabetic Polyneuropathy. *J Diabetes Res*. **2017**, 1-15.
Skyler, J.S.; Bakris, G.L.; Bonifacio, E. Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis. *Diabetes*. **2017**,66,241–255.
Spallone, V.; Ziegler, D.; Freeman, R.; Bernardi, L.; Frontoni, S.; Pop-Busui, R.; Stevens,

M.; Kempler, P.; Hilsted, J.; Tesfaye, S.; Low, P.; Valensi, P. Cardiovascular autonomic neuropathy in diabetes: clinical impact, assessment, diagnosis, and management. *Diabetes Metab Res Rev*, **2011**, 27, 639–653.

Stancu, C.; Anca, S. Statins: mechanism of action and effects. *J.Cell.Mol.Med.* **2001**,5,(4),378-387.

Sugiyama, A.; Takahara, A.; Honsho, S.; Nakamura, Y.; Hashimoto, K. A simple in invo atrial sibrillation model of rat induced by transesophageal atrial burst pacing. J Pharmacol Sci. 2005.98,315-318.

Suh, Y.A.; Arnold, R,S.; Lassegue, B.; Shi, J.; Xu, X.; Sorescu, D.; Chung, A,B.; Griendling, K.K.; Lambeth, J.D. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature*.**1999**,401,79–82.

Sweeney, G.; Klip, A. Regulation of the Na+/K+-ATPase by insulin: why and how?. Mol Cell Biochem. 1998.182,(12),121-33.

Szkudelski, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*, **2001**,50,(6),537-46.

Szramka, M.; Harriss, L.; Ninnio, D.; Windebank, E.; Brack, J.; Skiba, M.; Krum, H. The effect of rapid lipid lowering with atorvastatin on autonomic parameters in patients with coronary artery disease. *Int J Cardiol*, **2007,** Apr 25;117(2):287-91. Epub 2006 Aug 4.

Takebayashi, K.; Aso, Y.; Sugita, R.; Takemura, Y.; Inukai, T. Clinical usefulness of corrected QT intervals in diabetic autonomic neuropathy in patients with type 2 diabetes. Diabet Metab. 2002.28,(2),127–132.

Takebayashi, K.; Sugita, R.; Tayama, K.; Aso, Y.; Takemura, Y.; Inukai, T. The connection between QT dispersion and autonomic neuropathy in patients with type 2 diabetes. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2003.111,(6),351–357.

Takuya, K.; Yoshitaka, H.; Yoshikuni, K.; Koji, I.; Hiroaki, S.; Akira, T. Increased Reactive Oxygen Species in Rostral Ventrolateral Medulla Contribute to Neural Mechanisms of Hypertension in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. *Circulation*.**2004**,109,2357-2362.

Tanaka, S.; Nochioka, K.Tanaka, S.; Nochioka, K.; Minami, T.; Kudo. Statins Exert the Pleiotropic Effects Through Small GTP-Binding Protein Dissociation Stimulator Upregulation

With a Resultant Rac1 Degradation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **2013**,33,(7),1-18.
Tang, W. H.; Martin, K. A.; Hwa, J. Aldose Reductase, Oxidative Stress, and Diabetic Mellitus. *Frontiers in Pharmacology*. **2012**,3,87, 1-8.
Tarvainen, M.; Laitinen, T.; Lipponen, J.; Cornforth, D.; Jelinek, H. Cardiac autonomic dysfunction in type 2 diabetes – effect of hyperglycemia and disease duration. Front. *Neuroendocrinol,* 2014**, 5, 1-9.**
Task Force of the European Society of Cardiology the North American Society of Pacing Electrophysiology. Heart Rate Variability. Circulation. 1996.93,1043-1065.
Taskiran, M.; Fritz-Hansen, T.; Rasmussen, V.; Larsson, H.; Hilsted, J. Decreased Myocardial Perfusion Reserve in Diabetic Autonomic Neuropathy. *Diabetes, **2002***,51,3306–3310.
Tekin, A.; Tekin, G.; Sezgin, A.T.; Müderrisoğlu, H. Short- and long-term effect of simvastatin therapy on the heterogeneity of cardiac repolarization in diabetic patients. *Pharmacol Res,* **2008,** May, 57(5):393-7. doi: 10.1016/j.phrs.2008.04.001.
Tekin, G.; Tekin, A; Canatar, T.; Sipahi, I.; Unsal, A.; Katircibaşi, T.; Koçum, T.; Erol, T.; Yiğit; F.; Demircan, S.; Ermiş, N; Sezgin, A.T.; Müderrisoğlu, H. Simvastatin improves the attenuated heart rate recovery of type 2 diabetics. *Pharmacol Res*, **2006,** Dec;54(6):442-6. Epub 2006 Sep 17.
Tesfamariam, B.; Brown, M.L.; Cohen, R.A. Elevated glucose impairs endothelium-dependent relaxation by activating protein kinase C. *J Clin Invest.* **1991**.87,1647–1648.
Teshima,Y.; Takahashi,N.; Nishio, S.; Saito, S.; Kondo, H.; Fukui, A.; Aoki,K.; Yufu,K.; Nakagawa,M.; Saikawa, T. Production of Reactive Oxygen Species in the Diabetic Heart – Roles of Mitochondria and NADPH Oxidase. *Circ J*.**2014**, 78, 300–306.
Thames, M.D.; Kinugawa, T.; Smith, M.L.; Dibner-Dunlap, M.E. Abnormalities of baroreflex control in heart failure.*J Am Coll Cardiol*.**1993**,22,56–60.
Thornalley, P.J.; Battah, S.; Ahmed, N.; Karachalias, N.; Agalou, S.; Babaei-Jadidi, R.; Dawnay, A. Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochem J*. **2003**,375,581–92.
Tinica, G.; Chistol R.O.; Furnica, C.; Luca, C.; Anghel, D.; Grecu, M. Asymptomatic Coronary Artery Disease in Type 2 Diabetes Mellitus Patients Compared to a Non-Diabetic Control Group. *Acta Endo,* 2014, **10 (2): 238-248. doi: 10.4183/aeb.2014.238**

Toledano, M.B.; Leonard, W.J. Modulation of transcription factor NF-kappa B binding activity by oxidation-reduction in vitro. *Proc Natl Acad Sci*.**1991**,88,4328–4332.
Tousoulis, D.; Psarros, C.; Demosthenous, M. Innate and adaptive inflammation as a therapeutic target in vascular disease: the emerging role of statins. *J Am Coll Cardiol*. **2014**,63,2491-502.
Turker, Y.; Aslantas, Y.; Aydin, Y.; Demirin, H.; Kutlucan, A.;Tibilli, H.; Turker, Y.; Ozhan, H. Heart rate variability and heart rate recovery in patients with type 1 diabetes mellitus. *Acta Cardiol,* **2013**, 68,145-150.
Urbich, C.; Dernbach, E.; Zeiher, A.M.; Dimmeler, S. Double edged role of statins in angiogenesis signaling.*Circ Res*.**2002**,90,737-744.
Ushio-Fukai, M.; Zafari, A.M.; Fukui, T.; Ishizaka, N.; Griendling, K.K. p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II–induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*.**1996**,271,23317–23321.
Valensi, P.; Cosson, E. Diabetic Cardiovascular Autonomic Neuropathy. European *Endocrinology*. **2007**.(2),69-7.
Van, A. L.; D'Souza-Schorey, C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev*.**1997**,11,2295-2322.
Varvarovská, J.; Racek, J.; Stetina, R.; Sýkora, J.; Pomahacová, R.; Rusavý, Z.; Lacigová, S.; Trefil, L.; Siala, K.; Stozický, F. Aspects of oxidative stress in children with type 1 diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother*. **2004** ,58,(10),539-45.
Vaziri, N. D.; Ni, Z.; Oveisi, F.; Liang, K. and Pandian, R.Enhancednitric oxide inactivation and proteinnitrationby reactive oxygen species in renal insufficiency. *Hypertension*.**2002**,39,135–141.
Vedantham, S.; Thiagarajan, D.; Ananthakrishnan, R.; Wang, L.; Rosario, R.; Zou, Y.S.; Goldberg, I.; Yan, S.F.; Schmidt, A.M.; Ramasamy, R. Aldose reductase drives hyperacetylation of Egr-1 in hyperglycemia and consequent upregulation of proinflammatory and prothrombotic signals. *Diabetes*. **2014**,63,761–74.
Venugopal, S.K.; Devaraj, S.; Yang, T.; Jialal, I. alpha-Tocopherol Decreases Superoxide Anion Release in Human Monocytes Under Hyperglycemic Conditions Via Inhibition of

Protein Kinase C-alpha. *Diabetes*. **2002**,51,3049–3054.
Vesterinen, V.; Hakkinen, K.; Hynynen, E.; Mikkola, J.; Hokka, J.; Nummela, A. Heart rate variability in prediction of individual adaptation to endurance training in recreational endurance runners. Scand J Med Sci Sports. 2013. 23,(2), 171-180.
Vesterinen, V.; Hakkinen, K.; Laine, T.; Hynynen, E.; Mikkola, J.; Nummela A. Predictors of individual adaptation to high-volume or high-volume or hig-intensity endurance training in recreational endurance runners. Scand J Med Sci Sports. 2016.26,(8),885-893.
Vincent, A. M.; James, W.; Russell, P. L.; Feldman, E. L. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. *Endocr Rev*. **2004**, 25, (4), 1,612–628.
Vincent, A. M.; Russell, J. W.; Low, P.; Feldman, E. L. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy.Endocrine Reviews.2004. 25,(4),612-628.
Vinik, A.; Maser, R.; Ziegler, Z. Autonomic imbalance: prophet of doom or scope for hope?. *Diabet. Med*, **2011**, 28, 643–651.
Vinik, A.I.; Maser, R.E.; Mitchell, B.D.; Freeman, R. Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes Care*.**2003**,26,(5),1553-1579.
Von Borell, E.; Langbein, J.; Després, G.; Hansen, S.; Leterrier, C.; Marchant-Forde, J.; Marchant-Forde, R.; Minero, M.; Mohr, E., Prunier, A.; Balance, D.; Veissier, I. Heart rate variability as a measure of autonomic regulation of cardiac activity for assessing stress and welfare in farm animals -- a review. *Physiol Behav*. **2007**,92,(3),293-316.
Von Borell, E.; Langbein, J.; Després, G.; Hansen, S., Leterrier, C.; Marchant-Forde, J.;Marchant-Forde, R.; Minero, M.; Mohr, E.; Prunier, A.; Valance, D.; Veissier, I. Heart rate variability as a measure of autonomic regulation of cardiac activity for assessing stress and welfare in farm animals a review. *Physiol Behav*. **2007**,92,(3),293-316.
von Rosenberg, W.; Chanwimalueang, T.; Adjei, T.; Jaffer, U.; Goverdovsky, V.; Mandic, D, P. Resolving Ambiguities in the LF/HF Ratio: LF-HF Scatter Plots for the Categorization of Mental and Physical Stress from HRV. *Front Physiol*, **2017**, 8, (360), 1-12.
Vrtovec M.; Vrtovec, B.; Briski, A.; Kocijancic, A, Anderson, R.A.; Radovancevic, B. Chromium supplementation shortens QTc interval duration in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am Heart J,* **2005** Apr;149(4):632-6.
Vrtovec, B., Okrajsed, R.; Golicnik, A.; Ferjan, M.; Starc, V.; Radovancevic, B. Atorvastatin

Therapy Increases Heart rate Variability, Decreases QT Variability, and Shortens QT interval Duration in Patients With Advaced Chronic Heart Failure. Journal of Cardiac Failure. 2005. 11,(9),684-690.
Wagner, A.H., Kohler, T., Ruckschloss, U., Just, I., Hacker, M. Improvement of nitric oxide-dependent vasodilatation by HMGCoA reductase inhibitors through attenuation of endotelial superoxide anion formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **2000**,20,61-69.
Wang, H. M.; Huang, S. C. SDNN/RMSSD as a Surrogate for LF/HF: A Revised Investigation. Research Article.2012.23,(4),1-9.
Wang, W.; Wang, Y.; Long, J,; Wang, J.; Haudek, S.B.; Overbeek, P.; Chang, B.H.; Schumacker, P.T.; Danesh, F.R. Mitochondrial fission triggered by hyperglycemia is mediated by ROCK1 activation in podocytes and endothelial cells. *Cell Metabol.* **2012**,15,186–200.
Wassmann, S.; Laufs, U.; Muller, K.; Konkol, C.; Ahlbory, K.; Baumer, A.T.; Linz, W,; Bohm, M.; Nickenig, G. Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2002**,22:300–305.
Welzig, C.M.; Shin, D.G.; Park, H.J.; Kim, Y.J.; Saul, J.P.; Galper, J.B. Lipid lowering by pravastatin increases parasympathetic modulation of heart rate: Galpha(i2), a possible molecular marker for parasympathetic responsiveness. *Circulation*, **2003** Dec 2;108(22):2743-6. Epub 2003 Nov 17.
Whitsel, E.A.; Boyko, E.J.; Siscovick, D.S. Reassessing the role of QTc in the diagnosis of autonomic failure among patients with diabetes: a meta-analysis. Diabet Care. 2000.23,(2),241–247.
Wiernsperger N. F. Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. *Diabetes Metab*. **2003**,29,579–58510.
Wilson, S.H.; Simari, R.D.; Best, P.J. Peterson, T.E.; Lerman, L.O.; Aviram, M.; Nath, K.A.; Holmes, D.R.;Lerman, A. Simvastatin preserves coronary endothelial function in hypercholesterolemia in the absence of lipid lowering.*Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **2001**,21,122–128.
Wolff S. P.; Dean R. T.Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of "autoxidative glycosylation" in diabetes. *Biochem J.***1987**,245,243–250.

Yao, D.; Brownlee, M. Hyperglycemia-induced reactive oxygen species increase expression of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) and RAGE ligands. *Diabetes.* **2010**,59,249–55.
Yim M. B.; Yim H. S.; Lee C.; Kang S. O.; Chock P. B. Protein glycation: creation of catalytic sites for free radical generation. *Ann N Y Acad Sci*.**2001**,928,48–5310.
Yokoyama, K.; Ishibashi, T.; Onkawara, H.; Kimura, J.; Matsuoka, I.; Sakamoto, T.; Nagata, K.; Sugimoto, K.; Sakurada, S.; Maruyama, Y. HMG-CoA Reductase Inhibitors Suppress Intracelular Calcium Mobilization and Membrane Current Induced by Lysophosphatidylcholine in Endothelial Cells. Circulation. 2002.105, 962-967.
Yu, Y.; Zhang, Z. H.; Wei, S. G.; Serrats, J.; Weiss, R. M.; Felder, R. B. Brainperivascularmacrophages and thesympathetic response to inflammation in ratsaftermyocardialinfarction.*Hypertension*.**2010**,55,652–659.
Zalba, G.; Beaumont, F.J. Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.***2000**,35,1055–1061.
Zhang, Z. H.; Yu, Y.; Wei, S. G.; Felder, R. B. Centrally administered lipopolysaccharide elicits sympathetic excitation viaNAD(P)H oxidase-dependent mitogen-activated protein kinase signaling. *J Hypertens*.**2010**,28,806–816.
Zimmerman, M. C.; Lazartigues, E.; Lang, J. A.; Sinnayah, P.; Ahmad, I. M.; Spitz, D. R.; Davisson, R. L.Superoxide mediates the actions of angiotensin II in the central nervous system.*Circ Res.***2002**,91,1038–1045.
Zucker, I.H.;Gao, L. Statins and sympathetic nerve activity in heart failure. *J Card Fail*.**2006**,12,759,064–2067.