



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

**CARACTERIZACIÓN NEUROCOGNITIVA Y ESTRUCTURAL CEREBRAL
EN SUJETOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 1: DIFERENCIAS SEGÚN
PERCEPCIÓN A LA HIPOGLICEMIA**

Tesis doctoral presentada por
Nicole Stantonyonge Sesnic
para optar al grado de Doctor

Directora de Tesis

Dra. Ana Isabel Chico Ballesteros

Tutora de Tesis

Dra. Rosa Corcoy Pla

Programa de Doctorado en Medicina
Departamento de Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona

2021

AGRADECIMIENTOS

A **Ana**, por guiarme en todo el proceso para que un trabajo de segundo año de residencia se convierta en una tesis doctoral, por creer en mí y animarme a siempre ir a más. Gracias sobre todo por tu dedicación en la última etapa de este trabajo.

A **Rosa**, por tu disposición en todo momento que he necesitado tu ayuda, no sólo durante el desarrollo de esta tesis si no durante todos los años que estuve en Sant Pau.

Las **dos** han sido una inspiración como mujeres investigadoras referentes en diabetes. Ha sido un orgullo haber trabajado con vosotras y espero que podamos continuar haciéndolo en el futuro.

A **Saúl y Fred**, por vuestra disposición y paciencia desde el primer día que planteamos este proyecto y porque literalmente no hubiera podido presentar esta tesis sin vuestra ayuda.

A mi **familia**, mis padres **Gustavo y Nasha**, por su apoyo incondicional y por nunca cortarme las alas. A mi hermana **Ashley**, por tu ayuda reiterada en recursos lingüísticos. A mis abuelos **Olga y Antonio**, porque sin ustedes no estaría aquí.

A **Eneas**, por apoyarme y facilitarme en todo lo posible para que pudiera terminar este proyecto.

Al **Servei d' Endocrinologia i Nutrició de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau**: a mis compañeros durante la residencia, a los adjuntos que me enseñaron y guiaron. Al **equipo de enfermería**, por su ayuda directa durante el período de desarrollo de los estudios, en especial a **María José**. A **todos**, por ser parte de mi familia durante todos estos años.

A **Beatriz, Valle, Belén, Eugenia, Daniel, Laia** por vuestra ayuda para poder llevar a cabo los estudios clínicos incluidos en esta tesis.

A la **Unidad de Endocrinología y Nutrición del Hospital General de Granollers**.
Gracias por acogerme desde el primer día y por hacerme sentir tan a gusto. Estoy muy contenta de ser parte de la UDEN.

A todos los **pacientes** que aceptaron ser parte de los estudios, porque sin vuestra cooperación y buena voluntad, nada de esto hubiera sido posible.

ABREVIATURAS

ADA: Asociación Americana de Diabetes

AHA: Asociación Americana del Corazón

DC: Deterioro cognitivo

DDCT: Diabetes Control and Complications Trial

DM: Diabetes Mellitus

DM1: Diabetes Mellitus tipo 1

DM2: Diabetes Mellitus tipo 2

EA: Enfermedad de Alzheimer

ECV: Enfermedad cardiovascular

HbA_{1c}: Hemoglobina glicada

ECV: Enfermedad cardiovascular

EEG: Electroencefalograma

ERPs: Potenciales evocados relacionados con eventos discretos

HG: Hipoglicemia grave

IAH: Percepción alterada a la hipoglicemia (*Impaired awareness of hypoglycemia*)

IHSG: Grupo Internacional de Estudio de la Hipoglicemia (*International Hypoglycemia Study Group*)

LCR: Líquido cefalorraquídeo

MH: Miedo a la hipoglicemia

MMSE: Mini examen del estado psíquico

NAH: Percepción normal a la hipoglicemia (*Normal awareness of hypoglycemia*)

NfL: Neurofilamento de cadena ligera

PE: Potenciales evocados

PET- TC: Tomografía por emisión de positrones

RMN: Resonancia magnética nuclear

RMNf: Resonancia magnética nuclear funcional

SNC: Sistema nervioso central

VBM: Morfometría basada en voxel

ÍNDICE

Resumen.....	7
Summary.....	9
1 Introducción.....	11
1.1. Hipoglicemia en sujetos con diabetes.....	11
1.1.1. Introducción.....	11
1.1.2. Definición de hipoglicemia.....	12
1.1.3. Síntomas de hipoglicemia.....	12
1.1.4. Causas de hipoglicemia.....	14
1.2. Hipoglicemia grave.....	14
1.2.1. Definición de hipoglicemia grave.....	16
1.2.2. Etiopatogenia de la hipoglicemia grave.....	16
1.2.3. Impacto de la hipoglicemia grave.....	16
1.3. Conceptos clave en neuropsicología.....	20
1.3.1. Funciones cognitivas.....	20
1.3.2. Métodos de evaluación de funcionamiento cerebral.....	24
1.3.2.1 Examen neuropsicológico.....	24
1.3.2.2 Biomarcadores.....	26
1.3.2.2.1 Neuroimagen.....	26
1.3.2.2.2 Bioquímicos.....	27
1.3.2.3 Electroencefalografía.....	28
1.3.3 Deterioro cognitivo.....	30
1.4 Caracterización cerebral en sujetos con DM1.....	31
1.4.1 Evaluación neuropsicológica.....	31
1.4.1.1 DM1 versus controles sanos.....	31
1.4.1.2 DM1 e HG.....	31
1.4.2 Evaluación mediante neuroimagen funcional.....	32
1.4.2.1 DM1 versus controles sanos.....	32
1.4.2.2 DM1 e HG.....	32
1.4.3 Evaluación mediante neuroimagen estructural.....	33
1.4.3.1 DM1 versus controles sanos.....	33
1.4.3.2 DM1 e HG.....	33

1.4.4	Evaluación mediante electroencefalografía.....	34
1.5	Percepción alterada a la hipoglicemia.....	35
1.5.1	Definición.....	35
1.5.2	Fisiopatología.....	35
1.5.3	Diagnóstico.....	37
1.6	Caracterización cerebral en personas DM1 e IAH.....	39
1.6.1	Evaluación neurocognitiva.....	39
1.6.2	Evaluación mediante neuroimagen funcional.....	39
1.6.3	Evaluación mediante neuroimagen estructural.....	40
1.6.4	Evaluación mediante electroencefalografía.....	41
2	Justificación e hipótesis.....	42
3	Objetivos.....	43
4	Compendio de artículos	44
4.1	Artículo Original 1.....	44
4.2	Artículo Original 2.....	54
5	Resumen global de Resultados.....	64
6	Resumen global de Discusión.....	67
7	Conclusiones.....	74
8	Futuras líneas de investigación.....	75
9	Referencias bibliográficas.....	78
10	Anexos.....	88
10.1	Anexo 1.....	88
10.2	Anexo 2.....	94

RESUMEN

Las personas con diabetes mellitus tipo 1 (DM1) tienen mayor riesgo de desarrollar deterioro cognitivo (DC) que la población general. En la etiopatogenia de este DC participarían diferentes factores, en los que se ha propuesto la hipoglicemia grave (HG). Diversos estudios han demostrado que los sujetos con episodios recurrentes de HG presentan menor volumen de sustancia gris en determinadas áreas cerebrales y peor rendimiento en algunas pruebas neurocognitivas. Sin embargo, hasta la fecha no se ha establecido claramente el rol de la HG en el desarrollo de DC en este grupo de pacientes.

El principal factor de riesgo de la HG es la percepción alterada a la hipoglicemia (IAH), que afecta aproximadamente a un cuarto de la población con DM1. Históricamente se ha propuesto que los episodios recurrentes de HG provocarían una alteración en la respuesta hormonal de contrarregulación y en el valor de glicemia en la cual el paciente percibe los síntomas de hipoglicemia. Si bien parece irrefutable que existe un círculo vicioso entre episodios recurrentes de HG e IAH, hay datos que sugieren que existen otros factores implicados en la patogenia de la IAH, aunque no están claramente establecidos. Uno de estos argumentos es que la IAH no afecta uniformemente a todos los sujetos con DM1 e HG y, por otra parte, se han descrito diferencias en la redistribución de flujo sanguíneo en áreas cerebrales específicas durante un episodio de hipoglicemia entre sujetos con IAH y aquellos que las perciben bien (NAH).

El objetivo de los artículos presentados en esta tesis fue determinar si los sujetos con DM1 e IAH presentan diferencias a nivel cerebral en comparación con los NAH, basándonos en la hipótesis de que existe un factor determinante a nivel cerebral que explica que algunos sujetos con DM1 desarrollen IAH y otros no. Para esto, realizamos una extensa caracterización cerebral mediante una evaluación neurocognitiva que incluyó una batería neuropsicológica y una prueba electrofisiológica, además de realizar un análisis estructural a través de RMN cerebral.

Los resultados expuestos evidencian que los sujetos IAH tienen alrededor de 10% menor volumen cerebral en áreas frontales y parietales, especialmente en zonas que participan

en la toma de decisiones e integración de la información, sumado a una menor capacidad de atención y detección de un estímulo novedoso.

En resumen, esta tesis muestra que el cerebro de un sujeto con DM1 IAH es diferente al del NAH a nivel estructural y funcional. Sin embargo, por la metodología de los estudios no podemos determinar una causalidad entre los hallazgos descritos y el desarrollo de la IAH, ni tampoco descartar el rol que tiene la HG en ellos, ya que los sujetos con IAH han tenido mayor exposición a episodios recurrentes de HG que los NAH.

Todavía queda un largo camino que recorrer, pero los datos aportados por esta tesis pueden servir como base de futuros trabajos de investigación que permitan esclarecer los mecanismos fisiopatogénicos de la IAH y quizás en un futuro desarrollar un método de evaluación precoz, que prevenga la exposición reiterada a la HG y el consecuente daño cerebral asociado.

SUMMARY

Subjects with T1D have a higher risk of cognitive impairment (CI) than the general population. Different factors would participate in the pathogenesis of this CI, from which severe hypoglycemia (SH) has been proposed. Several studies have reported that subjects with recurrent episodes of SH show less gray matter volume in certain brain areas and worse performance in some neurocognitive tests. However, to date, the role of SH in the development of CI in this group of patients has not been clearly established.

The main risk factor for SH is impaired awareness of hypoglycemia (IAH), which affects approximately a quarter of the T1D population. Historically, it has been proposed that recurrent episodes of SH would cause an alteration in the counter-regulation hormonal response and in the glycemic value in which the patient is aware of the symptoms of hypoglycemia. Although it seems irrefutable that there is a vicious circle between recurrent episodes of SH and IAH, recent evidence suggests that there are probably other factors involved in the pathogenesis of IAH, which are not clearly established. Some of the arguments are that IAH does not affect uniformly all subjects with T1D and SH. On the other hand, there have been reported differences in the redistribution of cerebral blood flow in specific areas during an episode of hypoglycemia between IAH and normal hypoglycemia awareness (NAH) subjects.

The objective of the articles presented in this thesis was to determine whether T1D IAH subjects have brain differences compared to the NAH group, based on the hypothesis that there is a determinant factor at the cerebral level that explains why only some T1D patients develop IAH. To accomplish this, we carried out an extensive brain characterization through a neurocognitive evaluation that included a neuropsychological battery and an electrophysiological test, in addition to performing a structural analysis through brain MRI.

The results of our work reveal that IAH subjects have 10% lower brain volume in frontal and parietal areas, especially in those that participate in decision-making and information integration, added to a lower capacity for attention and detection of a novel stimulus.

We conclude that the brain of a subject with DM1 IAH is different to the brain of a T1D NAH at a structural and functional level. However, due to the methodology of these studies, we cannot determine a causality between the reported findings and the development of IAH, nor can we rule out the role that SH plays in them, as subjects with IAH have had greater exposure to recurrent SH episodes than NAH.

The findings provided by this thesis may constitute the basis for future research work to clarify the pathophysiological mechanisms of IAH, and hopefully, develop an early evaluation method that could prevent the repeated exposure to SH and the associated brain damage.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Hipoglicemia en sujetos con diabetes

1.1.1 *Introducción*

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad crónica que afecta aproximadamente a 537 millones de personas a nivel mundial entre los 20 y 79 años de edad según la estimación del 2021 de la Federación Internacional de Diabetes (1) de las cuales entre el 5-10% corresponden a DM1 (2).

Los sujetos afectados de DM1 presentan mayor morbimortalidad en comparación con personas sin DM. Ello se debe entre diversos factores a un mayor riesgo de desarrollo de complicaciones microvasculares específicas de la enfermedad, de complicaciones agudas como la cetoacidosis diabética (3) y la hipoglicemia (4) , así como a un aumento del riesgo de hasta 2-4 veces de desarrollar enfermedad cardiovascular (ECV) (5).

El DCCT (*Diabetes Control and Complications Trial*) (6), un ensayo clínico realizado hace más de dos décadas demostró que una intensificación del tratamiento (definido como el objetivo de una HbA_{1c} menor al 6%) se asocia a una reducción aproximada del 60% de riesgo de aparición y/o progresión de complicaciones microvasculares como retinopatía, nefropatía diabética y polineuropatía en sujetos con DM1. En cuanto al desarrollo de complicaciones macrovasculares, el EDIC (*Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications*), el seguimiento observacional posterior del propio DCCT concluyó a su vez que el grupo de pacientes asignados al brazo de control estricto también se asociaba a una reducción de riesgo de ECV de hasta el 42% durante un periodo de seguimiento de 17 años (7). Una valoración más reciente de los sujetos de la misma cohorte inicial, después de 29 años de seguimiento concluyó que el control metabólico crónico óptimo reduce el riesgo de ECV (8).

Basándose en estos datos, la recomendación actual de la ADA así como de la AHA es la consecución de un control glicémico estricto en sujetos con DM, buscando un objetivo global de HbA_{1c} < 7% (9)(10), aunque siempre individualizando y por tanto

recomendando un control menos intensificado según edad, morbilidad y esperanza de vida del paciente.

Sin embargo, alcanzar un objetivo de control glicémico estricto se asocia a un mayor riesgo de hipoglicemia, tanto es así que se considera esta el principal factor limitante de un control glicémico óptimo en sujetos con DM (9). Los pacientes con DM1 tienen entre 2 y 3 veces más riesgo de hipoglicemia que los pacientes con DM2, aumentando el riesgo a mayor tiempo de evolución de la enfermedad (11).

1.1.2 Definición de hipoglicemia

La hipoglicemia en sujetos con DM se definió en un documento de consenso como “cualquier episodio de valor inapropiadamente bajo de glucosa que expone al paciente a un riesgo de daño potencial” (12). Esta definición abierta se basa en que la respuesta fisiológica a una cifra de glucosa “por debajo de lo normal” depende de diversos factores como puede ser el grado de control metabólico crónico (13) o el haber presentado un episodio reciente de hipoglicemia (14), por lo que cualquier definición más específica del valor de glucosa se considera arbitraria.

Sin embargo, debido a la necesidad de unificar la definición de un suceso muy frecuente en la población con DM, se ha consensuado la definición bioquímica de hipoglicemia como un valor de glucosa por debajo de los 70 mg/dL. Esta cifra se basa en que el umbral de glucosa para la activación del sistema hormonal de contrarregulación y la aparición de los síntomas de hipoglicemia se sitúa entre los 65-70 mg/dL (15) (16). En la versión más actualizada de la ADA (9), se identifican tres niveles de hipoglicemia según la cifra de glucosa y gravedad de los síntomas (Tabla 1).

Tabla 1: Clasificación de hipoglicemia según la American Diabetes Association (ADA)

Nivel	Definición
Nivel 1	Glicemia <70 mg/dL y \geq 54 mg/dL
Nivel 2	Glicemia <54 mg/dL
Nivel 3	Evento grave caracterizado por alteración del nivel de conciencia y/o del estado físico que requiere de la asistencia de una tercera persona para la resolución de la hipoglicemia de forma independiente al valor de glicemia.

Por otra parte, en una revisión recientemente publicada, Amiel et al (17) exponen la definición de hipoglicemia utilizada por el IHSG (Tabla 2). La propuesta de este grupo es que no todas las cifras de glucosa por debajo de 70 mg/dL se deben tratar sistemáticamente de la misma forma, sobre todo las cifras que se encuentran entre 63-70 mg/dL, argumentado que no es infrecuente encontrar estas cifras de glucosa en la población general, especialmente niños y mujeres embarazadas. En una publicación posterior del mismo grupo de trabajo, se propone utilizar de manera global el nivel 2 de hipoglicemia (<54 mg/dL) para unificar el concepto de hipoglicemia bioquímicamente significativa en ensayos clínicos (18), basándose en que por debajo de esta cifra existe mayor evidencia de las posibles consecuencias de la hipoglicemia.

Tabla 2: Definición de hipoglicemia según el IHSG

Nivel	Definición
Alerta de hipoglicemia	Glicemia <70 mg/dL Nivel de glucosa en rango límite Generalmente sin síntomas
Hipoglicemia clínicamente importante	Glicemia <54 mg/dL Asociada a alteración cognitiva Episodios recurrentes pueden causar IAH
Hipoglicemia grave	Cifra de glucosa no especificada Alteración de conciencia, requiere de la asistencia de una tercera persona

1.1.3 Síntomas de hipoglicemia

Clásicamente, los síntomas de la hipoglicemia se dividen en dos categorías según si el origen es la activación del sistema nervioso autonómico (neurogénicos) o la privación de glucosa en el sistema nervioso central (neuroglucopénicos) (19) (Tabla 3), aunque la división se puede considerar arbitraria.

Tabla 3: Síntomas de la hipoglicemia

Neurogénicos	Neuroglucopénicos
Temblor	Confusión/Alteraciones conductuales
Sudoración	Dificultad para concentración
Sensación de hambre	Somnolencia
Palpitaciones	Alteraciones del habla
Nerviosismo/Ansiedad	Crisis comicial
	Disminución del nivel de conciencia/coma

1.1.4 Causas de hipoglicemia

La etiología de la hipoglicemia en sujetos con DM es diversa (Tabla 4), siendo la iatrogenia la causa principal.

Tabla 4: Causas de hipoglicemia

Exceso dosis insulina	Reducción ingesta	Supresión endógena de glucosa	Aumento consumo de glucosa	Aumento sensibilidad insulina	Disminución aclaramiento insulina
Error en la prescripción médica o del paciente	Error en la estimación de hidratos de carbono	Ingesta de alcohol	Ejercicio	Pérdida de peso, ejercicio, postparto	Deterioro de la función renal

La hipoglicemia en sujetos con DM1 es muy frecuente. Los datos respecto a la epidemiología son heterogéneos ya que la mayoría provienen de estudios descriptivos, sumado a que como ya se comentó previamente, la definición utilizada en los diferentes estudios clínicos no es uniforme. En un reciente metaanálisis se ha descrito una prevalencia de entre el 1-38% en sujetos con DM1 y una incidencia entre 0,072- 42,980 episodios de hipoglicemia por 1000 personas/año (20).

Si bien la mayoría de los episodios de hipoglicemia son resueltos con la ingesta de hidratos de carbono simples por el propio paciente, hasta un tercio de la población con DM1 ha presentado, al menos, un episodio de HG a lo largo de su vida.

1.2 Hipoglicemia grave

1.2.1 *Definición de HG*

Como ya se ha descrito previamente, la HG o hipoglicemia nivel 3 se define como la aparición de síntomas/signos neurológicos como alteración del nivel de conciencia/ /crisis comicial/coma, que requiere de la asistencia de una tercera persona que administre glucosa y/o glucagón para su recuperación.

1.2.2 *Etiopatogenia de la HG*

La prevalencia de HG en sujetos con DM1 se sitúa entre un 4-36%, con una media de 1,1 episodios de HG por paciente/año (19) (20), independientemente del control metabólico (21). Por otra parte, es importante destacar que la incidencia de episodios de HG en la población de pacientes con DM1 no es uniforme. En un estudio se describe que sólo el 5% de una cohorte de 1000 sujetos con DM1 presentó el 54% de todos los episodios de HG sufridos en el último año (22), lo que hace suponer que no todos los pacientes con DM1 tienen el mismo riesgo de desarrollar un episodio de HG.

La edad avanzada (> 65 años) y la prolongada duración de la DM aumentan las probabilidades de desarrollar un episodio de HG (21). En un estudio prospectivo, se describió que los pacientes con DM1 de menos de 5 años de evolución presentaron durante un período de 12 meses, una media de 1,1 (0,0-2,3) episodios de HG en comparación a los 3,2 (1,6-4,9) episodios que presentaron aquellos con más de 15 años de evolución de DM1 (9). Sin embargo, el principal factor de riesgo (hasta 6 veces más) de la HG es la IAH (21).

1.2.3 *Impacto de la hipoglicemia grave*

La HG puede tener consecuencias que afectan globalmente la vida de un paciente con DM, tales como:

- **Calidad de vida:** Un reciente estudio observó que hasta el 40-50% de sujetos con DM1 presentan miedo a la hipoglicemia (MH) (22). Los pacientes con un episodio previo de HG presentan un mayor grado de MH que pacientes que no han tenido HG (23), lo que se traduce en un efecto deletéreo en la calidad de vida (24) incluso

a edades tempranas (25). A su vez, los pacientes con MH presentan mayores niveles de ansiedad, depresión y distrés asociado a la diabetes (26) (27).

- **Costes económicos:** Un episodio de HG conlleva un considerable gasto sanitario. En un estudio que incluía a más de 20.000 sujetos con DM1 y DM2, se objetivó que el gasto médico directo durante el año posterior al episodio de HG fue más del doble en comparación con el del año anterior, basado en un mayor número de visitas de seguimiento y días de ingreso hospitalario (28).
- **Fracturas óseas:** Los pacientes con DM1 tienen hasta 3 y 5 veces más riesgo de presentar una fractura ósea en comparación a las personas sin DM (29). La hipoglicemia, especialmente los episodios de HG incrementan aún más este riesgo (30) debido al elevado riesgo de caídas (31).
- **Enfermedad cardíaca/cardiovascular:** Se ha descrito que episodios de hipoglicemia pueden desencadenar arritmias (32) y alargamiento del intervalo QT como consecuencia de la respuesta adrenérgica que desencadena la hipoglicemia (33). También se ha reportado la asociación entre hipoglicemia y disfunción endotelial (34) y respuesta inflamatoria (35). En cuanto a la ECV, en una revisión sistemática publicada recientemente (36), se concluye que no existe suficiente evidencia científica para establecer una asociación entre hipoglicemia y ECV por el número de factores de confusión que están involucrados. Sin embargo, se recomienda que, en cada paciente, de forma individualizada, se valoren los riesgos versus los beneficios de la búsqueda de un control glicémico estricto, teniendo en cuenta el mayor riesgo de hipoglicemia que esto conlleva.
- **Mortalidad:** Desde el descubrimiento de la insulina hace 100 años, se conocen los efectos potencialmente mortales que puede tener la hipoglicemia. Un estudio realizado en 1979 atribuyó a la hipoglicemia un 4% de todas las muertes de personas con DM menores de 50 años (37). En un estudio noruego más reciente, se describe una prevalencia de un 8% de mortalidad en sujetos con DM1 menores de 56 años (38).

- ***Daño cerebral:*** A pesar de que el cerebro representa sólo el 2% del peso corporal, consume el 20% de la tasa metabólica basal (39). La principal fuente de energía es la glucosa, que alcanza el sistema nervioso central mediante difusión facilitada por los transportadores GLUT-1 y GLUT 3 (40), lo que lo hace especialmente vulnerable a episodios de hipoglicemia.

La homeostasis de la glucosa es un proceso complejo y los efectos que tiene la hipoglicemia a nivel cerebral no están claramente dilucidados hasta la fecha, pero existe un importante volumen de evidencia que demuestra que la hipoglicemia provoca una serie de cambios adaptativos a nivel cerebral.

Estudios realizados en modelos animales han evidenciado que en respuesta a la hipoglucemia se produce un aumento de la concentración de GLUT-1 para favorecer el transporte de glucosa a través de la barrera hematoencefálica (BHE) (41). Sin embargo, estos hallazgos no se han podido confirmar en humanos ya que los resultados en cuanto a captación de glucosa y metabolismo cerebral en pruebas de neuroimagen funcional son divergentes (42)(43). También se ha descrito que la hipoglicemia provoca una adaptación celular que permite la utilización de otras fuentes de energía alternativas como son el lactato y los cuerpos cetónicos (44) (42). Finalmente, también se ha descrito un aumento del depósito de glicógeno a nivel astrocitario como método de “supercompensación” de energía (44).

En una reciente revisión de las consecuencias de episodios recurrentes de hipoglicemia a nivel cerebral, McCrimmon et al (45) destacan las conclusiones aportadas por Sherwin et al (46) quienes en 2007 propusieron la hipótesis de que a nivel cerebral disponemos de un grupo específico de neuronas para la detección de las variaciones de los niveles de glucosa. Estas neuronas, localizadas principalmente en el hipotálamo ventromedial actuarían de forma similar a las células pancreáticas; es decir, existirían neuronas excitadas por la glucosa (GA) que responderían a la hiperglicemia y neuronas inhibidas por la glucosa (GI) que lo harían a la hipoglicemia. Mediante una serie de factores que participan en la transducción del valor de glucosa (receptor 1 de sulfonilurea, canales ATP sensibles a potasio, glucoquinasa y AMPK (proteína quinasa activada por AMP)), un nivel bajo de glucosa llevaría a la supresión de las neuronas GA inhibitorias “*GABAérgicas*” y a la vez a una activación de las neuronas GI “*glutamatérgicas*” activando finalmente la respuesta de contrarregulación. Tanto la exposición recurrente a la hipoglicemia como a la

hiperglicemia provocarían un cambio en el umbral que desencadena la activación de la respuesta de contrarregulación. Específicamente los autores proponen que episodios recurrentes de HG provocan una desviación hacia la izquierda de los registros neurofisiológicos de las neuronas GA basado en la observación de que un tono “*GABAérgico*” mantenido es más eficiente para preservar la energía a nivel celular (47)(48). Finalmente, sugieren que el efecto que tiene la hipoglicemia a nivel cerebral está influenciado por el control glicémico previo, ya que el efecto de la hipo e hiperglicemia actúan sinérgicamente sobre el estrés oxidativo y la inflamación a nivel cerebral, destacando el rol que tendría la variabilidad glicémica en el daño cerebral de sujetos con DM.

Desde hace más de 90 años, se conoce que la HG puede provocar una alteración del nivel de conciencia que puede evolucionar al coma (49). En 1984, Auer et al (50) concluyeron en un modelo animal, que después de 30 minutos con una cifra de glucosa por debajo de 18 mg/dL, se produce una onda cerebral isoelectrica en el EEG, con la consecuente muerte neuronal. Estudios posteriores realizados en modelos animales han concluido que la muerte cerebral en la hipoglicemia no se produce únicamente por la “falta de combustible”, si no que participan otros factores locales tisulares como son la alcalosis tisular provocada por el déficit de lactato y por el aumento de liberación de amonio resultado del catabolismo de las proteínas, el aumento de aspartato/disminución de glutamato tisular y el aumento del estrés oxidativo, entre otros factores (51). En humanos, estudios histológicos cerebrales obtenidos de autopsias, han evidenciado que la HG se asocia a daño cortical en los lóbulos temporal, parietal y occipital, pero también a nivel de la ínsula, hipocampo, núcleo caudado y putamen (52).

Hasta aquí, se ha hecho una revisión general de la hipoglicemia y del impacto que tiene en los sujetos con DM1. A continuación, se profundizará en la evidencia disponible del efecto de la hipoglicemia a nivel cerebral. Para ello, es necesario entender previamente cómo funciona el cerebro, así como los métodos que existen para evaluarlo, por lo que en las siguientes páginas se revisarán algunos conceptos de neuropsicología.

1.3 Conceptos clave en neuropsicología

La neuropsicología es la rama de la psicología que estudia la relación entre el cerebro y la conducta, centrándose en los efectos que una lesión, daño o funcionamiento anormal de las estructuras del sistema nervioso central (SNC) causa sobre los procesos cognitivos, psicológicos, emocionales y sobre el comportamiento. Su aplicación en la clínica es por tanto evaluar las consecuencias, la forma, la gravedad y el pronóstico del daño cerebral y establecer el diagnóstico sindrómico cognitivo (53) .

1.3.1 Funciones cognitivas

Por funciones cognitivas podemos entender todos aquellos procesos psicológicos que participan en la adquisición del conocimiento, manejo de información y razonamiento, percepción, comunicación, resolución de problemas e interacción con el entorno. A modo de aproximación a la clasificación de las funciones cognitivas más generales, podemos contemplar (54) (55) (56):

- **Memoria:** Corresponde al conjunto de procesos cognitivos que nos permiten adquirir, mantener y evocar información a corto y a largo plazo. Acorde a su tipología y a los procesos implicados, la memoria puede dividirse en distintos tipos:
 - Memoria sensorial: Dura menos de 200-300 milisegundos. Sirve para identificar la información que luego va a ser procesada.
 - Memoria a corto plazo: Es el recuerdo inmediatamente posterior a la presentación, luego pasa a ser memoria operativa o de trabajo la cual permite realizar tareas que implican almacenar y manipular información.
 - Memoria remota/largo plazo: Es el recuerdo de información tras un intervalo en que la atención de la persona se centra en aspectos distintos del objetivo. Dura años, ya que contiene gran parte del conocimiento del individuo. Se divide en:
 - Memoria implícita/ no declarativa: Corresponde al almacenamiento inconsciente, en donde las experiencias previas ayudan a la ejecución de una tarea.
 - Memoria explícita/ declarativa: Es el recuerdo consciente respecto al reconocimiento de personas, lugares y su significado. Se clasifica a su vez en memoria episódica la cual permite recordar acontecimientos con una

referencia temporo-espacial y en memoria semántica que corresponde al almacenamiento general de información, sin que esté relacionado con un tiempo ni lugar específico. Hace referencia al conocimiento o cultura de una persona.

- **Función ejecutiva:** Conjunto de habilidades cognitivas que permiten la anticipación, establecimiento de metas, planificación, razonamiento abstracto, monitorización de la acción y control de otros procesos cognitivos. Implica componentes como la memoria de trabajo, orientación de la atención e inhibición de respuestas automáticas.
- **Lenguaje:** Es la capacidad de los seres humanos para comunicarse con otros. Se compone de diferentes variables como fluencia verbal, comprensión, nominación, gramática y repetición.
- **Sensación/Percepción (gnosia):** Función cognitiva que permite percibir, reconocer y almacenar la información que ingresa por cualquier vía sensorial.
- **Habilidad motora (praxia):** Se define como la habilidad para ejecutar una acción motora aprendida, intencional y dirigida a un propósito. Requiere de la concepción de una idea, la planificación de movimientos y de la ejecución coordinada para llevarlo a cabo. Se basa en la interacción de procesos perceptivos, cognitivos y motores.
- **Atención:** No existe un único concepto para definir la atención. Algunos la definen como un proceso cognitivo y conductual complejo que permite poner el foco en un determinado estímulo, anulando otros distractores del ambiente.

Así como existen diferentes definiciones de atención, también hay diversas subdivisiones. A continuación, se describe el modelo jerárquico de Scholberg y Mateer et al (57) en donde cada nivel de atención requiere del correcto funcionamiento del anterior (Tabla 5).

Tabla 5: Niveles de atención

Nivel	Definición
Alerta	Capacidad de estar despierto y alerta.
Atención focal	Habilidad para enfocar la atención a un estímulo.
Atención sostenida	Capacidad para mantener una respuesta continuada durante un tiempo prolongado. Incluye a su vez la vigilancia y la concentración.
Atención selectiva	Capacidad para escoger una información relevante, inhibiendo otros estímulos.
Atención alternante	Capacidad que permite cambiar el foco de atención entre tareas que requieren procesos cognitivos diferentes.
Atención dividida	Capacidad para atender a dos cosas al mismo tiempo.

Como ya se ha descrito, la atención es un proceso mental complejo de definir, entender y evaluar. Dentro de la habilidad para seleccionar a un estímulo dentro de otros, se ha descrito que el proceso está determinado por dos tipos de información: por las metas, intenciones y objetivos que propone el sujeto (información *top down*) o por la propia información que tienen los estímulos (información *bottom up*) (58), la naturaleza de estos últimos hace que nuestra atención hacia ellos sea involuntaria. Esto es la base para entender cómo funciona el mecanismo que hace que atendamos a la información relevante e ignoremos la irrelevante.

Por otra parte, la aplicación de la neuroimagen en el campo de la neurociencia ha permitido establecer relaciones entre ciertas estructuras anatómicas con determinados procesos mentales (59):

La *corteza prefrontal* participa en la cognición y la función ejecutiva, el *hipotálamo* en la memoria y en la homeostasis mientras que los *lóbulos frontal y parietal* en la habilidad motora y atención. La *amígdala* por su parte está relacionada en la toma de decisiones, miedo y recompensa. A su vez, el *sistema límbico* que está formado por la corteza límbica (giro cingulado y giro parahipocampal), formación hipocampal (giro dentado, hipocampo, complejo subicular), amígdala, área septal e hipotálamo (60) tiene un rol en

la regulación de emociones, olfato, apetito, conducta de alimentación, regulación del sueño, comportamiento sexual, adicción, motivación y memoria (61). Por otra parte, el *sistema reticular ascendente* interviene en el nivel más básico de atención, ya que mantiene el nivel de alerta, mientras que los *ganglios basales*, a los que previamente se les atribuía exclusivamente una función motora, recientemente se ha añadido un rol fundamental en la selección durante la percepción y en las respuestas, al regular la información sensorial antes de que llegue al tálamo. El *tálamo* por su parte participa también en la atención al ser un puente de relevo de toda la información sensorial antes de que pase a la corteza cerebral (62).

La *ínsula*, es considerada como el “centro de operaciones” que está relacionada con la interocepción, procesamiento socioemocional, control autonómico (recibiendo aferencias directas del sistema nervioso simpático y parasimpático), percepción de uno mismo y guía emocional dentro del comportamiento social (63). Dentro de nuestro tema de revisión, destaca el rol de la ínsula en el procesamiento de la información visceral y la regulación autonómica. Estudios realizados mediante neuroimagen funcional han evidenciado que la actividad de la región anterior de la ínsula está aumentada durante periodos de alerta y percepción de cambios en el estado corporal (64)(65). Por otra parte, la *corteza cingular* es la encargada de integrar toda la información atendida junto con la emoción para finalmente seleccionar una respuesta. Se ha propuesto que la corteza frontoinsular orbitaria junto con la corteza cingular anterior, sean considerados como la “red de saliencia” (66) que se define como la capacidad de relacionar las funciones cerebrales de integración para poder realizar una selección entre los diferentes estímulos que se reciben para centrar la atención en lo que realmente interesa y omitir el resto de los estímulos.

En este apartado se han detallado algunos de los procesos mentales más importantes y su relación con ciertas estructuras anatómicas. A continuación, se revisarán diferentes métodos diseñados para la evaluación del funcionamiento cerebral.

1.3.2 Métodos de evaluación del funcionamiento cerebral

1.3.2.1 Examen neuropsicológico

La valoración neuropsicológica tiene como objetivo la búsqueda y descripción de alteraciones asociadas con un daño cerebral, además del análisis de la topografía y extensión del proceso patológico. Para ello existe una extensa diversidad de instrumentos que varían en cuanto a duración y estrategia diagnóstica, por lo que en función de cada paciente se debe decidir la batería neuropsicológica más adecuada según sus condiciones y características. En la tabla 6 se resumen algunas de las pruebas neuropsicológicas utilizadas en nuestro medio. El objetivo en todo caso siempre será el mismo: evaluar el estado cognoscitivo del individuo para descartar la presencia de afasia (alteración del lenguaje), apraxia (alteración en la ejecución de movimientos intencionales), agnosia (alteración en el reconocimiento perceptual) y amnesia (alteración de memoria) entre otras alteraciones.

La exploración neurocognitiva se realiza por una persona entrenada, habitualmente neuropsicólogo (a), y aunque la duración varía en función de las pruebas utilizadas, por lo general es un proceso que dura al menos 45-60 minutos. Por esto, es habitual que en la práctica clínica diaria se utilicen instrumentos más rápidos y sencillos que, aunque no correspondan a un examen neuropsicológico propiamente dicho, sirvan como despistaje ante la sospecha de un déficit cognitivo. El más utilizado en España es el mini examen del estado psíquico (MMSE) (67) que a pesar de tener importantes limitaciones, a través de 30 preguntas evalúa las funciones cognitivas de orientación, lenguaje, memoria inmediata y memoria episódica. Una puntuación menor a 26 sugiere una alteración de la función cognitiva, por lo que se recomienda completar la valoración mediante pruebas neuropsicológicas diseñadas para evaluar funciones cognitivas específicas.

Tabla 6: Resumen de algunas de las pruebas neurocognitivas utilizadas en nuestro medio

Ámbito neuropsicológico	Instrumento neuropsicológico
Función cognitiva global	CERAD (Consortium to Establish a Registry for Alzheimer`s Disease)(68) MMSE
Atención	<i>Trail making test</i> parte “A” (69) Prueba de dígitos
Función ejecutiva	<i>Trail making test</i> parte “B” (69) Fluencia de palabras en 1 minuto
Memoria episódica	Test de alteración de memoria
Lenguaje	Test de denominación de Boston (70) Fluidez verbal
Habilidad visuoespacial	Figura compleja del Rey

Adaptado de la Asociación Americana de Neurología, 2001, p.265

1.3.2.2 Biomarcadores

Un biomarcador se define como una característica biológica objetivamente medible capaz de identificar procesos fisiológicos o patológicos. Idealmente un biomarcador debería ser específico, sensible, predictivo y con suficiente relevancia clínica para modificar las decisiones relativas al proceso que evalúa. Se clasifican según la función que tengan en: diagnósticos, pronósticos o terapéuticos, y de acuerdo a la información que proporcionan en: genéticos, de imagen, clínicos y bioquímicos (71).

1.3.2.2.1 Neuroimagen

El avance tecnológico ha permitido el uso de diferentes técnicas de neuroimagen para explorar el SNC de una forma no invasiva. Dentro de estas técnicas se encuentran la resonancia magnética nuclear (RMN) que se basa en el procesamiento de ondas radiales y permite examinar detalladamente diferentes tejidos como las sustancia blanca y gris y el líquido cefalorraquídeo (LCR). A su vez, la RMN funcional (RMNf) utiliza campos magnéticos muy elevados mediante pulsaciones de radiofrecuencia, comunicando la información a un ordenador y permitiendo evaluar la estructura cerebral específica que controla un proceso mental o el flujo sanguíneo cerebral (72). Ninguna de estas dos técnicas utiliza radiaciones ionizantes.

Por otra parte, la tomografía por emisión de positrones (PET-TC) corresponde a una técnica en la que se administra una sustancia reactiva por medio de una inyección de radioisótopos con el objetivo de detectar el consumo de glucosa cerebral. Esto permite evaluar tanto el funcionamiento de tejidos, el rendimiento de oxígeno en el cuerpo como el flujo sanguíneo cerebral (73).

La utilización de las técnicas de neuroimagen tiene aplicación tanto en la práctica clínica dentro de la evaluación del diagnóstico diferencial de DC (tumor, atrofia, infarto o hemorragia cerebral) así como en el campo de la investigación.

1.3.2.2.2 Bioquímicos

Hace dos décadas se describió por primera vez la medición de la proteína beta-amiloide en LCR como biomarcador relacionado con la enfermedad de Alzheimer (EA) (74). En los últimos años, se han desarrollado diversos biomarcadores bioquímicos que han resultado útiles en el diagnóstico y manejo no sólo dentro del campo de las enfermedades neurodegenerativas si no en otras patologías del SNC como son el traumatismo craneoencefálico, la esclerosis múltiple y neuropatías periféricas, entre otras.

En cuanto a la utilización dentro del campo de la DM, se ha publicado que en comparación con controles sanos, sujetos con DM1 de mediana edad presentan niveles más elevados de una serie de biomarcadores medidos en LCR como proteína tau fosforilada, beta amiloide 42 y forma soluble de LRP1 (*low-density lipoprotein receptor-related protein 1*)(75).

Más recientemente la investigación se ha enfocado en detectar biomarcadores que puedan determinarse en una muestra de sangre (76). La limitación principal de este método diagnóstico es la baja concentración en sangre de proteínas derivadas del SNC y la ausencia hasta hace poco tiempo de una tecnología adecuada que permitiera su detección. Sin embargo, recientemente se ha desarrollado una nueva tecnología SIMOA (Single Molecule Array) que permite detectar proteínas en sangre con una precisión y sensibilidad sin precedentes (rango femtomolar) (77). Mediante esta tecnología se ha podido establecer un biomarcador: el neurofilamento de cadena ligera (NfL), que ha demostrado ser útil para la detección de daño cerebral en el traumatismo craneoencefálico, los accidentes vasculares cerebrales y en enfermedades neurodegenerativas como la EA (78) (79). Sin embargo, actualmente no existen datos de la utilidad de este biomarcador en pacientes con DM.

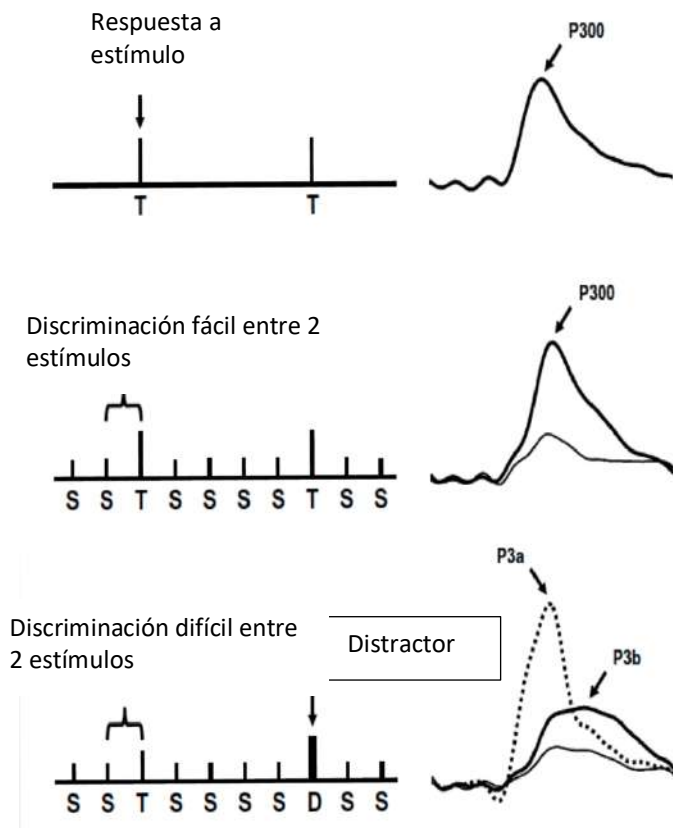
1.3.2.3 Electroencefalografía

La electroencefalografía es una prueba de evaluación funcional del SNC mediante la cual se obtiene el registro de la actividad cerebral espontánea en tiempo real (80). El electroencefalograma (EEG) estándar corresponde al registro de las fluctuaciones eléctricas en el cerebro captadas por electrodos fijados al cuero cabelludo. Es un método diagnóstico indoloro, no invasivo, reproducible y se puede realizar tanto en sueño como en vigilia.

Por otro lado, existen otras técnicas de electroencefalografía que permiten adquirir registros neurofisiológicos relativos a acontecimientos neuronales discretos durante la ejecución de tareas específicas que, entre muchos otros procesos, dan información objetiva de la velocidad de procesamiento de la información. Especialmente útiles y sensibles en este sentido son los potenciales evocados (PE) que corresponden a la actividad neuroeléctrica que deriva del promedio de la señal del EEG frente a un evento determinado. Su función es medir la respuesta neuronal en términos de sincronización de neuronas frente a un estímulo. Por su parte, también se dispone de potenciales evocados relacionados con eventos discretos (ERPs) que corresponden a un equivalente a los PEs pero con la diferencia de que deben ser acompañados de procesos cognitivos y no de la mera exposición al estímulo. Los ERPs permiten la valoración de forma casi simultánea de la actividad neuronal relacionada con un proceso cognitivo (81).

El estudio de la morfología (amplitud y latencia) del componente P300 derivado de los ERPs, específicamente las ondas P3a y P3b han sido estudiados en individuos sanos y con diversas patologías (82)(83)(84)(85). El método utilizado para la obtención de este componente es a través del paradigma “*oddball*”, que consiste en solicitar al paciente la tarea de identificar un estímulo diana (ej: T) entre otros estímulos frecuentes (ej: S) exponiéndolo a su vez a un estímulo novedoso (D) inesperado (Figura 1).

Figura 1: Morfología de Onda P300



Adaptado de Polich et al (86)

La onda P3b corresponde a una deflexión positiva que aparece sobre los 300-600 mS después de la detección de un estímulo diana (ej: T). Tiene su origen en la zona parietal y frontal. Está relacionada con la atención, actualización y velocidad de procesamiento de la información. La onda P3a se origina de la región frontal e insular. Presenta una latencia más breve (250-500 mS) y se relaciona con la respuesta de orientación a la novedad.

En otras palabras, la orientación *voluntaria* de la atención a un estímulo diana (T) provoca un cambio neurofisiológico denominado p3b. Por otra parte, la orientación *involuntaria* de la atención a un estímulo novedoso (D) provoca una onda denominada P3a. Si bien los componentes P3a y P3b no son específicos, el análisis tanto de la latencia como de la amplitud de la onda, tiene una elevada sensibilidad para el hallazgo de daño neuronal, incluso previo a la aparición de DC (87)(88).

1.3.3 Deterioro cognitivo

El DC es un diagnóstico clínico que requiere de una evaluación neuropsicológica, al definirse como la alteración de una o más funciones cognitivas. Existen subdivisiones del DC: el tipo amnésico en el cual el síntoma principal es la pérdida de memoria y el no amnésico en donde predomina la afectación de cualquier otra función cognitiva.

El término “demencia” hace referencia a la pérdida de funciones cognitivas que interfieren con la vida diaria. Debido a que la EA es la causa más frecuente de demencia, es habitual que se considere erróneamente el tipo amnésico como el único tipo de DC, cuando realmente puede verse afectada cualquier función cognitiva. Es importante recordar que existen otras causas de DC como por ejemplo ictus, enfermedades neurodegenerativas, enolismo crónico, tumores cerebrales o daño cerebral secundario a traumatismo craneoencefálico, entre otras (89) (90).

Paralelamente, es importante mencionar el concepto de DC leve (DCL), que se define como la alteración en una prueba neuropsicológica ($-1,5$ desviación típica por debajo de la media de la edad) que no afecta a las actividades de la vida diaria, pero sobrepasa los límites de la denominada alteración de memoria asociada a la edad. En la mayoría de los estudios que se detallarán más adelante, se hace referencia al DCL como hallazgo principal de las diferentes valoraciones neuropsicológicas realizadas.

Hasta aquí se ha explicado conceptos clave en neuropsicología que permiten comprender las relaciones entre las estructuras cerebrales con los procesos mentales, además de los diferentes métodos disponibles para evaluarlos.

A continuación, se revisará la evidencia disponible respecto a las características cerebrales de sujetos con DM1 en comparación con controles sanos sin DM, así como las diferencias de dichas características entre sujetos con DM1 e IAH y sujetos con DM1 y NAH y también del posible papel que tendría la HG en estos hallazgos.

1.4 Caracterización cerebral en sujetos con DM1

1.4.1 Evaluación neuropsicológica

1.4.1.1 DM1 versus controles sanos

Diversos trabajos han evidenciado que los sujetos con DM1 presentan un peor rendimiento neurocognitivo que aquellos sin DM. En un meta metaanálisis que incluyó 33 estudios, Brands et al (91) concluyen que los sujetos con DM1 puntúan peor en pruebas que evalúan velocidad de procesamiento, inteligencia, atención y flexibilidad cognitiva, evidenciando a su vez una asociación con la presencia de retinopatía y neuropatía como potenciales factores de riesgo. A su vez, Tonoli et al (92) en otro metaanálisis concluyen que en niños existe un peor rendimiento en inteligencia y velocidad motora, mientras que en adultos hay un peor desempeño en la evaluación de función ejecutiva, memoria espacial y velocidad motora. Por otra parte, en un estudio observacional, Nunley et al (93) evidenciaron, que en un grupo de sujetos con DM1 de edad media (49 años) pero prolongada duración de la enfermedad (41 años de evolución), la prevalencia de DCL era 5 veces mayor que en sujetos sin DM, sobretodo en pruebas que evaluaban velocidad psicomotora y construcción visual.

En una extensa revisión sistemática de DC en sujetos con DM1, Shalimova et al (94) concluyen que la cada vez mayor esperanza de vida de la población en general, y de los sujetos con DM1 en particular ha permitido evidenciar un mayor riesgo de DC en personas con DM1 así como una mayor velocidad de progresión del mismo. Los mecanismos fisiopatológicos siguen sin estar claramente establecidos, pero alteraciones en el metabolismo cerebral de la glucosa junto con la ECV relacionada con la DM1 jugarían un rol fundamental.

1.4.1.2 DM1 e HG

La causalidad entre HG, alteraciones estructurales/funcionales cerebrales y desarrollo de DC, es un tema debatido. En el único estudio prospectivo de larga duración diseñado con el objetivo de estudiar el DC en sujetos con DM1(DCCT/EDIC) (95), muestra después de 32 años de seguimiento de una cohorte de 1051 sujetos con DM1 (media de 27 años al inicio del estudio y de 59 años al final de éste), que el desempeño en la función

psicomotora y en la agilidad mental fue 5 veces peor tras 18-32 años de seguimiento que en los primeros dieciocho años de este. Una cifra más alta de HbA_{1c}, de tensión arterial sistólica y de número de episodios previos de HG se asociaron a una peor puntuación en las pruebas de agilidad mental y habilidad psicomotora.

De una forma similar, en diversos estudios descriptivos con un menor número de sujetos (96) (97) (98) (99), así como en un metaanálisis (92) también se ha descrito una asociación entre episodios previos de HG y un peor desempeño en diversas pruebas neurocognitivas como función ejecutiva, memoria episódica, lenguaje y velocidad de reacción. En una reciente revisión sistemática (100) se concluye que la edad es un factor importante a tener en cuenta ya que los episodios de HG en personas con DM1 menores de 10 años o mayores de 55 años de edad, tendrían una mayor repercusión sobre la neurocognición, habiéndose detectado un peor rendimiento en memoria verbal, visuoespacial y lenguaje.

Sin embargo, es importante mencionar que el mismo grupo del estudio DCCT/EDIC en 2007 (101) cuando publicó los resultados después de los primeros 18 años de seguimiento, no objetivó ninguna asociación entre alteración neurocognitiva y episodios previos de HG, pero sí con una peor cifra de HbA_{1c}. De forma similar, un estudio prospectivo sueco (102), después de 10 años de seguimiento tampoco evidenció asociación entre nivel neurocognitivo, episodios previos de HG ni con un peor control glucémico.

1.4.2 Evaluación mediante neuroimagen funcional

1.4.2.1 DM1 versus controles sanos

Se han descrito diferencias de perfusión cerebral (tanto aumentada como disminuida) en niños, adolescentes y adultos con DM1 en ganglios basales, cerebelo y lóbulo frontal, habiéndose descrito también su asociación con un peor control glicémico y presencia de retinopatía diabética (103)(104).

1.4.2.2 DM1 e HG

La mayoría de los estudios funcionales cerebrales se han centrado en conocer el efecto de la hipoglicemia aguda sobre el SNC. La utilización de técnicas como la RMNf cerebral o

el PET-TC durante la técnica de clamp insulínico ha permitido la observación inmediata de los efectos de la hipoglicemia sobre el cerebro, a través de observaciones indirectas de parámetros hemodinámicos y/o metabólicos que detectan cambios en la actividad neuronal.

Los hallazgos respecto a la activación de áreas cerebrales durante el episodio de hipoglicemia aguda son diversos. Sin embargo, la mayoría de estudios coinciden en que el tálamo, hipotálamo, ínsula y corteza prefrontal tienen un rol fundamental en la fisiología de la respuesta a la hipoglicemia (105)(106)(107)(108).

1.4.3 Evaluación mediante neuroimagen estructural

1.4.3.1 DM1 versus controles sanos

La utilización de pruebas de neuroimagen como la RMN cerebral ha permitido la caracterización estructural cerebral de sujetos con DM1. Si bien los resultados son heterogéneos respecto a hallazgos en sustancia blanca (109)(110), existe una robusta evidencia científica que demuestra que los pacientes con DM1 presentan menor volumen cerebral en diversas áreas cerebrales en comparación a personas sin DM de similares características (111)(112)(113), especialmente en la corteza frontal y temporal.

En un trabajo publicado recientemente por Filip et al (114) mediante una extensa caracterización estructural y funcional cerebral, concluyen que los sujetos con DM1 presentan diferencias micro y macroestructurales en comparación con controles sanos en áreas relacionadas con la cognición, función motora, ejecutiva y recompensa (tálamo, corteza temporal mesial, cuerpo estriado y putamen), pero no así en el grosor cortical.

1.4.3.2 DM1 e HG

Entre los potenciales factores de riesgo de daño cerebral estructural en el grupo de DM1, Perros et al (115) fueron los primeros en publicar que episodios recurrentes de HG se asociaban a un mayor riesgo de atrofia cortical.

Años más tarde, Musen et al (112), introdujeron dentro de las técnicas de RMN, el análisis por morfometría basada en vóxel (VBM) para estudiar el volumen cerebral de sustancia gris. Esta herramienta tiene una mayor sensibilidad para evidenciar alteraciones de la

sustancia gris, incluso antes de que exista daño cortical propiamente dicho. En este estudio se describe que, en comparación con los sujetos sin DM, los sujetos con DM1 presentaban menor volumen de sustancia gris en diversas áreas como el lóbulo temporal, cerebelo, hipocampo, giro angular, hipocampal y temporal superior. Además, describen una asociación entre menor volumen de sustancia gris y peor control metabólico (mayor cifra de HbA_{1c}) así como con la presencia de episodios previos de HG. Este menor volumen de sustancia gris se observaba sobre todo en las regiones involucradas en memoria, atención y procesamiento del lenguaje (corteza cingulada posterior, giro parahipocampal, hipocampo izquierdo y giro temporal superior).

1.4.4 Evaluación mediante electroencefalografía

Los escasos estudios que han utilizado ERPs para evaluar sujetos con DM1 en comparación con controles sanos son observacionales, incluyen a pocos pacientes (sólo niños y adolescentes) y han mostrado resultados divergentes. Shehata et al (116) evidenciaron que comparado con el grupo control, el grupo de niños con DM1 tenían una latencia de onda P300 más prolongada además de una reducción de la amplitud del componente N2 de la onda P300. Sin embargo, tanto Überal et al (117) como Vitvarová et al (118) no evidenciaron diferencias significativas en cuanto a la amplitud ni la latencia de la onda P300 entre ambos grupos.

1.5 Percepción alterada a la hipoglicemia (IAH)

Como ya se mencionó previamente, la IAH es el principal factor de riesgo para desarrollar episodios de HG.

1.5.1 Definición de IAH

Se define como la incapacidad de reconocer adecuadamente los síntomas durante la aparición de hipoglicemia (119) y afecta aproximadamente a un 25% de los pacientes con DM1 (21).

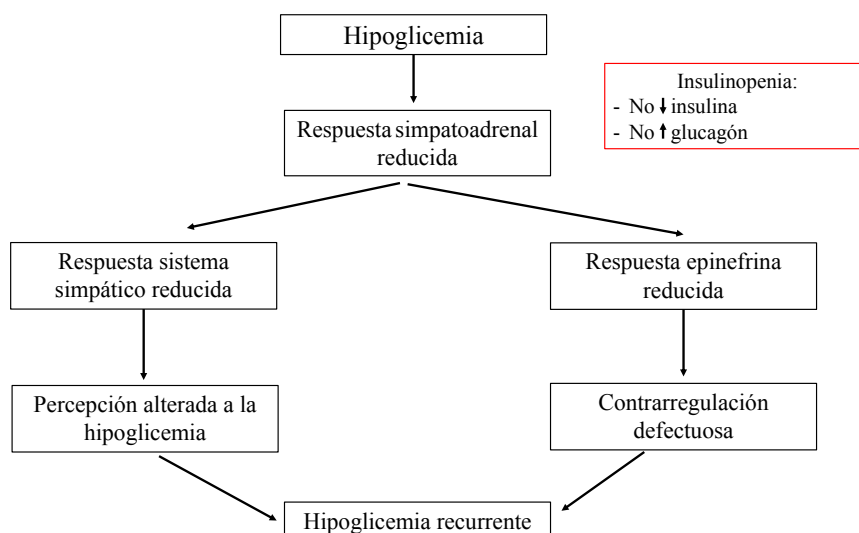
Los factores involucrados en su desarrollo no están claramente establecidos, describiéndose entre ellos la duración de la diabetes, la hipoglicemia recurrente, la edad avanzada y un control glucémico estricto.

1.5.2 Fisiopatología de la IAH

En 1994, Cryer et al (119) introdujeron el concepto de fallo autonómico asociado a la hipoglicemia, una entidad independiente de la neuropatía autonómica clásica (Figura 2), que establece que la hipoglicemia iatrogénica puede causar:

- **Alteración en la contrarregulación de la glucosa:** Respuesta secretora deficitaria del glucagón y adrenalina como respuesta a un determinado valor de hipoglicemia.
- **Percepción alterada a la hipoglicemia:** Reducción o ausencia de desarrollo de los síntomas neurogénicos y simpatoadrenales frente a un cierto valor de glucosa, impidiendo la toma de decisiones para prevenir la HG.

Figura 2: Esquema de fallo autonómico asociado a la hipoglicemia en la DM



Adaptado de Cryer et al (119).

En una revisión más reciente del tema, Amiel et al (17) abordan el concepto de IAH desde un prisma similar. La respuesta fisiológica en sujetos sin DM frente a un episodio de hipoglicemia desencadena una cadena de señales paracrinas y neuroendocrinas que provoca una interrupción en la secreción de insulina junto con un aumento de secreción de glucagón que finalmente estimula la producción hepática de glucosa. En personas con DM1, al no ser posible la disminución de la dosis (ya administrada) de insulina, sumado a la disminución de glucagón por parte de las células alfa pancreáticas, la respuesta frente a la hipoglicemia depende casi exclusivamente de la capacidad hiperglicémica desencadenada por la activación simpática y la liberación adrenérgica; que es lo que va a provocar finalmente que el paciente perciba la hipoglicemia y tome decisiones para revertirla.

Hasta el momento, no están claramente establecidos los mecanismos involucrados en la disminución del umbral de glucosa para desencadenar la respuesta simpatoadrenal, pero sí que se ha descrito que episodios previos de HG se pueden asociar a una

“*downregulation*” de los valores de glucosa que desencadenan la respuesta de contrarregulación (14) (120).

Una conclusión similar es la que aporta McCrimmon (45) en la revisión previamente comentada, proponiendo que episodios recurrentes de HG provocarían una serie de respuestas adaptativas a nivel cerebral, que se convierten en una situación maladaptativa que finalmente lleva a los pacientes a no percibir adecuadamente la hipoglicemia.

1.5.3 Diagnóstico de IAH

Existen diferentes cuestionarios para el diagnóstico de la IAH. A nivel global, los más utilizados son los de Gold (121), Clarke (122) y Pedersen (123). Los 3 cuestionarios corresponden a instrumentos diseñados con el objetivo de identificar a pacientes que refieren no percibir adecuadamente la hipoglicemia.

Se ha comparado la concordancia de los tres métodos para identificar la IAH y los estudios coinciden en que el cuestionario de Pedersen tiende a sobrestimar la prevalencia de IAH, mientras que el de Clarke y Gold tienen una fuerte correlación entre ambos (124) (125). De la misma forma, se recalca que ningún instrumento es completamente fiable para el diagnóstico de IAH, recomendando tanto el uso del cuestionario de Clarke como el de Gold.

Sin embargo, hasta la fecha, sólo el cuestionario de Clarke ha sido validado en español y catalán (126) por lo que es el que se utiliza habitualmente en nuestro país. Mediante 8 preguntas el cuestionario de Clarke (Figura 3), clasifica a los pacientes en: percepción normal a la hipoglicemia (<3 puntos) o percepción alterada a la misma (≥ 4 puntos), mientras que una puntuación de 3 se considera como indeterminada.

Figura 3. Versión validada al castellano del cuestionario de Clarke (126).

1. *Escoja la categoría que mejor le describe (solo una)*
 - a) Siempre tengo síntomas cuando mi azúcar en sangre está bajo
 - b) Algunas veces tengo síntomas cuando mi azúcar en sangre está bajo
 - c) Ya no tengo síntomas cuando mi azúcar en sangre está bajo
2. *¿Ha perdido alguno de los síntomas que solía presentar ante una bajada de azúcar (hipoglucemia)?*
 - a) Sí
 - b) No
3. *En los últimos 6 meses, ¿con qué frecuencia ha tenido episodios de HIPOGLUCEMIA GRAVE SIN PÉRDIDA DE CONOCIMIENTO? (episodios en los que se ha sentido confundido, desorientado, cansado y sin posibilidad de tratar usted mismo la situación de hipoglucemia)*
 - a) Nunca
 - b) Una/2 veces
 - c) Una vez cada 2 meses
 - d) Una vez al mes
 - e) Más de una vez al mes
4. *En el último año, ¿con qué frecuencia ha tenido episodios de HIPOGLUCEMIA GRAVE CON PÉRDIDA DE CONOCIMIENTO? (episodios acompañados de pérdida de conciencia o convulsiones que hayan requerido la administración de glucagón o glucosa intravenosa)*
 - a) Nunca
 - b) Una vez
 - c) 2 veces
 - d) 3 veces
 - e) 5 veces
 - f) 6 veces
 - g) 7 veces
 - h) 8 veces
 - i) 9 veces
 - j) 10 veces
 - k) 11 veces
 - l) 12 veces o más
5. *En el último mes, ¿con qué frecuencia ha tenido lecturas inferiores a 70 mg/dl con síntomas?*
 - a) Nunca
 - b) De una a 3 veces
 - c) 2 o 3 veces/semana
 - d) 4 o 5 veces/semana
 - e) Casi cada día
6. *En el último mes, ¿con qué frecuencia ha tenido lecturas inferiores a 70 mg/dl sin síntomas?*
 - a) Nunca
 - b) De una a 3 veces
 - c) 2 o 3 veces/semana
 - d) 4 o 5 veces/semana
 - e) Casi cada día
7. *¿Hasta cuánto ha de bajar su azúcar en sangre para notar síntomas?*
 - a) 60-69 mg/dl
 - b) 50-59 mg/dl
 - c) 40-49 mg/dl
 - d) Inferior a 40 mg/dl
8. *¿Hasta qué punto puede decir por sus síntomas que su azúcar en sangre es bajo?*
 - a) Nunca
 - b) Casi nunca
 - c) Algunas veces
 - d) Casi siempre
 - e) Siempre

1.6 Caracterización cerebral en personas con DM1 e IAH

Como ya se ha comentado previamente, dentro de la fisiopatología del daño cerebral en sujetos con DM1, los episodios previos de HG tendrían un rol primario.

Al ser la IAH el principal factor de riesgo de la HG, algunos estudios previos se han centrado en determinar si existen diferencias a nivel cerebral entre sujetos con DM1 e IAH en comparación a los que tiene una percepción normal (NAH).

1.6.1 Evaluación neurocognitiva

Muy pocos estudios han comparado el desempeño neurocognitivo en sujetos DM1 según su percepción de la hipoglicemia. Dentro de ellos destaca el de Hansen et al (127), que describen que la IAH se asocia a una menor puntuación en pruebas que valoran aprendizaje, memoria verbal y test de separación. Por otra parte, en el ya mencionado metanálisis de Rama Chandran et al (100), se concluye que la IAH se asocia a un peor rendimiento de memoria global y de velocidad de procesamiento.

1.6.2 Evaluación mediante neuroimagen funcional

Mediante la realización de RMNf cerebral, Mangia et al (128) evidenciaron que durante la provocación de hipoglicemia (50 mg/dL) los sujetos con DM1 e IAH no presentaron el aumento del flujo sanguíneo cerebral a nivel de tálamo que sí que presentó el grupo control sin DM. Por su parte, Wieggers et al (129) mediante una metodología similar pero añadiendo un grupo de sujetos con DM1 NAH, observó la misma ausencia de activación talámica en el grupo de DM1 IAH que sí que estaba presente tanto en el grupo DM1 NAH como en el grupo control sano. Adicionalmente, observó un aumento global del flujo sanguíneo cerebral en el grupo de DM1 IAH.

Utilizando los mismos tres grupos de estudio, pero mediante el análisis de RMNf dependiente de oxígeno sanguíneo, Hwang et al (130) evidenciaron que los sujetos con DM1 e IAH presentaban una ausencia de activación a nivel de los circuitos corticoestriatal y frontoparietal que sí que estaba presente en los otros 2 grupos.

Recientemente, Nwokolo et al (131) mediante el análisis de imagen de RMN de perfusión por marcado arterial de spin, observó que durante la hipoglicemia (47 mg/dL) el grupo

de personas con DM1 e IAH también mostraba una disminución de la respuesta regional en cuanto a flujo sanguíneo cerebral a nivel de tálamo, corteza lateral orbitofrontal y prefrontal dorsolateral derecha, es decir en áreas cerebrales que están relacionadas con la alerta, toma de decisiones y recompensa. Así mismo, evidenció que el grupo IAH presentaban una menor respuesta del nivel de hormonas de contrarregulación frente a la hipoglicemia.

Posteriormente, en una publicación del mismo grupo (132), describen que en sujetos con DM1 e IAH, después de una intervención para restaurar la hipoglicemia mediante un programa educativo específico y el uso de un sistema integrado (bomba de insulina junto con sensor continuo de glucosa), observaron una recuperación del flujo sanguíneo cerebral a nivel de corteza anterior cingulada, pero no en el tálamo ni corteza orbitofrontal. Los autores proponen que en el desarrollo de la IAH están involucradas alteraciones tanto a nivel de la percepción de los síntomas, como de la activación hormonal, tálamocortical y del comportamiento.

Por otra parte, utilizando otra herramienta diagnóstica como es el PET [^{15}O], Dunn et al (133) compararon la activación cerebral durante hipoglicemia en un grupo de sujetos varones DM1 según la percepción a la misma. Evidenciaron que el grupo de IAH presentaba diferencias a nivel de opérculo central, corteza orbital medial y frontal dorsolateral; es decir, áreas involucradas en percepción, emociones, evitación y toma de decisiones.

1.6.3 Evaluación mediante neuroimagen estructural

En cuanto al estudio estructural cerebral en sujetos con DM1 e IAH sólo Bednarik (134) et al han analizado el volumen de sustancia gris mediante la realización de RMN cerebral a un grupo de sujetos DM1 IAH, DM1 NAH y controles sanos. La conclusión del trabajo fue que los pacientes con IAH presentaban menor volumen cerebral global (-7,9%), pero más marcado a nivel de los lóbulos frontal (-9,1%), parietal (-8%) y temporal (-8,2%). En la actualidad no existe evidencia respecto a posibles alteraciones estructurales de sustancia blanca en pacientes con DM1 según el grado de percepción a la hipoglicemia.

1.6.4 Evaluación mediante electroencefalografía

Hasta la fecha, no existen estudios electroencefalográficos realizados en sujetos con DM1 y diferente percepción a la hipoglucemia.

En la tabla 6 se muestran de forma resumida los principales hallazgos de la evaluación del funcionamiento cerebral en sujetos con DM1 versus controles sanos y en sujetos con DM1 IAH versus NAH respectivamente.

Tabla 6: Resumen de las diferencias observadas en la caracterización cerebral en sujetos DM1 vs controles sanos y entre DM1 IAH vs DM1 NAH

	DM1 vs no DM	DM1 IAH vs DM1 NAH
Neuroimagen funcional	<ul style="list-style-type: none">• Diferencias en activación cerebral en tálamo, hipotálamo, ínsula y corteza prefrontal	<ul style="list-style-type: none">• Redistribución del flujo sanguíneo cerebral.• Ausencia de activación talámica, circuito cortico estriatal, fronto parietal, prefrontal dorsolateral, orbitofrontal
Neuroimagen estructural	<ul style="list-style-type: none">• Menor volumen global de sustancia gris cerebral• Más marcado en hipocampo, lóbulo temporal, corteza cingulada, tálamo.• Asociación con HbA_{1c} y HG previas	<ul style="list-style-type: none">• Menor volumen cerebral global (sustancia gris)• Más acentuado en lóbulo frontal, parietal y temporal
Neuropsicología	<ul style="list-style-type: none">• Peor rendimiento en diversas funciones cognitivas• Más riesgo de DC que población general• Asociación con HbA_{1c}, HG previas, tensión arterial sistólica	<ul style="list-style-type: none">• Peor rendimiento en pruebas de aprendizaje, memoria verbal, velocidad de procesamiento

2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

Aproximadamente una cuarta parte de los sujetos con DM1 presentan IAH, siendo esta entidad el principal factor de riesgo para desarrollar un episodio de HG. La HG además de ser el principal factor limitante para lograr un control glicémico estricto, se asocia entre otras cosas, a una peor calidad de vida y un aumento de mortalidad. Adicionalmente, existe evidencia de que episodios recurrentes de HG causan daño cerebral.

Los mecanismos fisiopatológicos que explican el desarrollo de la IAH no están claramente establecidos. Hasta la fecha, la explicación más aceptada es que la exposición a episodios recurrentes de hipoglicemia provoca una alteración en la activación del sistema de contrarregulación, disminuyendo el umbral en el que el paciente percibe los síntomas de hipoglicemia. Esto dificulta la toma de decisiones del paciente para la adecuada resolución de ésta, favoreciendo la presentación de una HG que requiera de la asistencia de una tercera persona para su resolución. Sin embargo, no todos los pacientes que presentan episodios de HG tienen IAH y, por otro lado, entre los sujetos con IAH la frecuencia de episodios de HG no es uniforme.

Con el objetivo de profundizar en la etiopatogenia de la IAH, estudios previos han evidenciado mediante diferentes pruebas funcionales durante hipoglicemia aguda, que los sujetos con DM1 e IAH presentan algunas diferencias a nivel de redistribución de flujo sanguíneo cerebral en áreas relacionadas con la atención, la toma de decisiones y la percepción. Por otra parte, también se ha estudiado si existen diferencias entre sujetos IAH y NAH a nivel neurocognitivo siendo los resultados heterogéneos, mientras que los estudios de neuroimagen estructural cerebral son escasos y los que valoran pruebas de electroencefalografía son inexistentes.

La hipótesis de este estudio es que los sujetos con DM1 e IAH presentan diferencias a nivel cerebral en comparación a los sujetos DM1 y NAH, que podrían explicar el desarrollo de la percepción alterada a la hipoglicemia.

3. OBJETIVOS

Objetivo principal

Realizar una caracterización cerebral global en un grupo de sujetos con DM1, comparando los hallazgos según el grado de percepción a la hipoglicemia.

Objetivos secundarios

- Estudiar si existen diferencias a nivel estructural cerebral mediante el análisis de volumen de sustancia gris y blanca utilizando técnicas de neuroimagen en un grupo de sujetos con DM1 según el grado de percepción a hipoglicemia.
- Estudiar si existen diferencias neurocognitivas mediante una exploración neurocognitiva y neurofisiológica en un grupo de sujetos con DM1 según el grado de percepción a hipoglicemia.

4. COMPENDIO DE ARTÍCULOS

4.1 Artículo original 1

Stantonyonge N, Sampedro F, Méndez J, Martínez-Horta S, Chico A, Gómez-Anson B. **Structural Gray and White Matter Differences in Patients With Type 1 Diabetes and Impaired Awareness of Hypoglycemia.** J Clin Endocrinol Metab. 23 de enero de 2021;106(2):450-8.

doi: 10.1210/clinem/dgaa832

doi: 10.1210/clinem/dgaa832

doi: 10.1210/clinem/dgaa832

doi: 10.1210/clinem/dgaa832

doi: 10.1210/clinem/dgaa832

doi: 10.1210/clinem/dgaa832

doi: 10.1210/clinem/dgaa832

doi: 10.1210/clinem/dgaa832

doi: 10.1210/clinem/dgaa832

4.2 Artículo Original 2

Stantonyonge N, Martinez-Horta S, Sampedro F, Sánchez-Saudinós MB, Chico A.

Defective involuntary attention to novelty in type 1 diabetes and impaired awareness of hypoglycaemia. Diabetes Res Clin Pract. Jun 2021.



Contents available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Diabetes Research
and Clinical Practice

journal homepage: www.elsevier.com/locate/diabres



International
Diabetes
Federation



Defective involuntary attention to novelty in type 1 diabetes and impaired awareness of hypoglycaemia

Nicole Stantonyonge^{a,e,1}, Saul Martinez-Horta^{b,c,d,1}, Frederic Sampedro^{b,c,d},
María Belén Sánchez-Saudinós^{b,c,g}, Ana Chico^{a,e,f,*}

^aDepartment of Endocrinology and Nutrition, Hospital de Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

^bBiomedical Research Institute Sant Pau (IIB-Sant Pau), Barcelona, Spain

^cCentro de Investigación Biomédica en Red-Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain

^dMovement Disorders Unit, Neurology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

^eDepartment of Medicine, Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain

^fCIBER-Bioengineering, Biomaterials and Nanotechnology (CIBER-BBN), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

^gMemory Unit, Neurology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 March 2021

Received in revised form

25 May 2021

Accepted 1 June 2021

Available online 4 June 2021

Keywords:

Type 1 diabetes

Hypoglycaemia

Impaired awareness

Neurophysiology

ABSTRACT

Aim: To determine if there are differences in terms of neurophysiology and neurocognitive functioning in a group of type 1 diabetes (T1D) patients regarding hypoglycaemia awareness.

Methods: 27 patients with T1D were classified according to Clarke score as having impaired awareness of hypoglycaemia (IAH; n = 11) or normal awareness to hypoglycaemia (NAH; n = 16). We measured several clinical and sociodemographic variables and cognitive performance using neuropsychological tests. Electroencephalography was assessed during an auditory oddball task. We compared the groups in terms of clinical/sociodemographic variables as well as two event-related brain potentials (ERPs): The P3a which is associated with automatic orientation of attention to novelty, and the P3b which is associated with target detection and processing.

Results: The IAH group performed significantly worse on the Trail Making Test part A (TMT-A) (p = 0.05). Compared to the NAH group, P3a and P3b amplitudes in the frontal-central sites were significantly lower in the IAH group (p < 0.05). The P3a was strongly associated with worse performance on the TMT-A in the IAH group (r = 0.540; p < 0.005).

Conclusion: IAH is accompanied by decreased neurophysiological activity in ERPs associated with information processing and with the automatic orientation of attention to novelty and environmental changes. These findings suggest a possible framework to better understand the cognitive origin of IAH in this patient population.

© 2021 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Corresponding author at: Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital de Santa Creu i Sant Pau Mas Casanovas, 90 - 08041 Barcelona, Spain.

E-mail address: achicob@santpau.cat (A. Chico).

¹ These authors have contributed equally.

<https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.108898>

0168-8227/© 2021 The Authors. Published by Elsevier B.V.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

In type 1 diabetes (T1D), long-term insulin treatment is not only essential due to the insulinopenic state that defines this group of patients, but it is also required to control glucose levels to reduce the risk of complications derived from chronic hyperglycaemia [1,2]. However, insulin treatment is associated with an increased risk of hypoglycaemic events [2].

These events are characterized by several symptoms of varying severity including spontaneous sweating, dizziness, tremor, increased hunger, and irritability, among others that serve to warn the patient [3]. Patients able to identify these signs can act accordingly and take appropriate measures to address these episodes. Awareness of these signs is vitally important given that failure to prevent and manage hypoglycaemia may lead to hypoglycaemia unawareness and severe hypoglycaemia (SH) [4,5].

SH is defined as a hypoglycaemic event associated with severe and potentially harmful symptoms including loss of consciousness, seizure, or coma requiring the assistance of a third person [6]. It has been reported a median rate of 1.1 episodes for patient-year and a yearly prevalence of 4–36% of SH episodes in T1D [7–10]. The main risk factor for developing an SH-related episode is impaired awareness of hypoglycaemia (IAH), defined as the inability to perceive the symptoms of hypoglycaemia [11]. Compared to individuals with a normal awareness of hypoglycaemia (NAH), T1D patients with IAH have a much greater risk of presenting more SH episodes, and thus of developing complications associated with recurrent episodes of hypoglycaemia [12].

It is widely accepted that diabetes mellitus is associated with an increased risk for cognitive impairment [13]. This association has been extensively studied in patients with type 2 diabetes, in whom various mechanisms contribute to neuronal damage and concurrent cognitive deterioration [14,15]. Although several studies have evaluated the impact of T1D on cognitive function, the results are highly heterogeneous [13,16,17]. The large, prospective Diabetes Control and Complications Trial (DDCT) found no significant differences between patients with T1D and healthy controls in cognitive function over a mean follow-up of 18 years [18]. By contrast, several cross-sectional studies and meta-analyses have found that, compared to healthy controls, patients with T1D generally perform worse on several cognitive domains [16,19–21].

While numerous factors are believed to be involved in the association between T1D and cognitive deterioration, a prior history of SH episodes appears to play a key role [22–24]. Although the exact mechanisms contributing to this association are unknown, it is reasonable to assume that SH episodes may be associated with some degree of neuronal damage, which contributes to cognitive deterioration. Given that IAH is associated with an increased recurrence of episodes of SH, it is plausible to hypothesize that IAH may also be associated with an increased neuronal damage load and thus a greater risk of cognitive deterioration [25–29].

Event-related brain potentials (ERPs) permit the assessment, with high temporal resolution, of the time course of

neural activity associated with various cognitive processes [30]. Of these, the P300 (or P3b) elicited during auditory odd-ball paradigms have been extensively studied in healthy individuals and in patients with several different conditions [31–34]. The P3b is a positive deflection appearing with maximum amplitude in central-parietal sites around 300–600 ms after detection of a target. The functional meaning of the P3b is quite heterogeneous, and the morphology of this component appears to be modulated by several variables (i.e.: older age, disease, etc). However, the P3b is undoubtedly involved in target detection, processing speed and contextual update of information. The P3a or “novelty P3” displays maximum amplitude over frontal-central sites with a latency around 250–500 ms in response to involuntary processing and orientation of attention to novel or relevant stimulus [33,35]. These measures have proven sensitive for the early detection of neuronal damage, even in the absence of clear indicators of cognitive decline [36–38]. This suggests that evaluation of the morphology of these ERPs in T1D-IAH may be an objective and robust approach to exploring the potential presence of signs of neuronal damage in this patient population, and to understand the cognitive mechanisms involved in lack of awareness about hypoglycaemia. Thus, the presence of electrophysiological differences in the absence of a significant cognitive impairment is especially relevant, since these differences could be predictive biomarkers of cognitive decline.

In this context, the main aim of the present study was to assess and compare the morphology of the P3a and P3b components in patients with T1D-IAH and NAH. A second aim was to explore potential associations between neurophysiological findings and clinical parameters.

2. Material and Methods

2.1. Clinical assessments

The following clinical and sociodemographic data were obtained and recorded for all patients: age; years of education; disease duration; body mass index (BMI); type of insulin treatment (multiple insulin injections [MDI] or continuous subcutaneous insulin infusion [CSII]); basal and prandial insulin dose (UI/kg/day); mean HbA1c and number of self-reported SH episodes during last year and last five years defined as a hypoglycaemic event requiring the assistance of a third person; glucose levels during study; and LDL cholesterol.

The Clarke scale was used to assess the participants' awareness of hypoglycaemia [39]. The Clarke test is an 8-item questionnaire (validated for the Spanish population) in which the patient self-evaluates his or her awareness of hypoglycaemia. Based on the Clarke scores, participants were classified as NAH (Clarke score ≤ 2) or IAH (Clarke score ≥ 4) [39]. A score of 3 points on the test was considered indeterminate and thus these patients were excluded from the study.

Mood and cognition were assessed by a battery of neuropsychological assessments. The Beck Depression Inventory (BDI) was used to determine the presence and severity of

depressive symptoms [40]. Global cognitive status was assessed with the Mini Mental- State Evaluation (MMSE) [41], a commonly used instrument that screens for global cognitive status. Scores < 26 points on the MMSE are suggestive of the presence of cognitive impairment of variable severity while scores > 26 suggest cognitive normality. The word learning subtest of the Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD) was used to examine immediate learning, delayed recall, and recognition [42]. Attention and executive functions were assessed with the Trail Making test (TMT) parts A and B [43], the phonetic verbal fluency (words starting with letter P) during one minute, and the semantic verbal fluency (animals) during one minute. Finally, confrontation naming was assessed with the short version of the Boston Naming Test [44]. Raw scores were adjusted using the normative data for Spanish population [45].

2.2. Auditory oddball task

A standard auditory oddball task with a set of frequent, infrequent, and novel stimuli was used. Frequent stimuli (1500 Hz, duration: 60 ms) occurred with a probability of 0.8, infrequent stimuli (1620 Hz; 60 ms) occurred with a probability of 0.1, and novel sounds (e.g., a key or a door closing) occurred with a probability of 0.1 at 60 dB for 60 ms. Over a period of 15 min, participants were requested to respond as quickly as possible to infrequent (target) sounds with their right index finger and to ignore all other sounds. The percentage of correct responses to the target sound and the percentage or responses to non-target novel stimuli were registered.

2.3. EEG recording

An electroencephalogram (EEG) was recorded with the BrainAmp system and Brain Vision Recorder Software (Brain Products GmbH, Germany) at 19 standard scalp sites (Fp1/2, F3/4, C3/4, T3/4, T5/6, P3/4, O1/2, F7/8, Fz, Cz, Pz) referenced to the two mastoid leads. Vertical eye movements were recorded using a bipolar montage with two electrodes linked together and placed below each eye, which were referenced to a third electrode placed centrally above the eyes. To monitor horizontal eye movements, two electrodes were placed on the external canthi of each eye. Electrode impedances were kept below 5 kOhm. The electrophysiological signals were filtered with a bandpass of 0.1–35 Hz and digitized at a rate of 250 Hz.

To maximize the information available for the subsequent ERPs, raw EEG signals were subjected to an ocular artifact minimization algorithm based on an eigenvalue decomposition of time-delayed covariance matrices. After identifying the source signals associated with eye movements, we obtained corrected EEG signals from the remaining components. The algorithm was implemented using Brain Vision Analyzer (Brain Products GmbH; Germany).

2.4. P3a and P3b analysis

In the auditory oddball task, the continuous EEG recording was segmented in epochs of 1000 ms starting 100 ms before the stimulus presentation and continuing until 900 ms post-

stimulus. Epochs were baseline-corrected, subtracting the mean amplitude in the 100 ms before stimulus presentation. A two-step artifact rejection procedure was then applied. The first epochs were rejected if the signal in any of the 19 channels showed amplitude values > $\pm 300 \mu\text{V}$. Subsequently, additional epochs were excluded if amplitude values were > $\pm 40 \mu\text{V}$ in Fz, Cz or Pz channels. After these preprocessing steps, three types of trials—epochs containing frequent, infrequent, and novel stimuli—were averaged separately. These averages were obtained for each participant and the ERP components were identified and quantified. The P3b was the most positive deflection in the ERP between 300 and 650 ms post-stimulus in the infrequent trials while the P3a was the most positive deflection in the ERP between 240 and 500 ms post-stimulus in the novel trials. The mean amplitude was calculated in the time-window defining each ERP and introduced into the statistical analysis.

2.5. Statistical analysis

For the clinical and sociodemographic variables, independent t-test comparisons between the two groups were performed for continuous variables and the χ^2 test for categorical variables. ERP effects were quantified for the three midline electrodes (Fz, Cz, and Pz); these data were then evaluated by repeated-measures analysis of variance (ANOVAs), applying the Greenhouse-Geisser correction when necessary. Post-hoc comparisons were performed using paired and independent t-test comparisons.

3. Results

The sample was comprised of 27 adults (12 females and 15 males), with a mean \pm standard deviation (SD) age of 58.5 ± 10.8 years. The mean disease duration was 30.1 ± 9.9 months. Mean basal daily insulin dose (UI/kg) was 0.28 ± 0.11 and mean prandial daily insulin dose (UI/kg) was 0.27 ± 0.17 .

The mean Clarke score was 2.56 ± 2 . Of the 27 patients, 16 were classified as IAH and 11 as NAH. The two groups were similar for nearly all sociodemographic and clinical variables of interest (Table 1). However, the IAH group presented significantly higher values on several parameters, as follows: mean basal daily insulin doses [$t(27) 2.88$; $p < 0.01$]; total number of SH episodes in the last year [$t(27) = -2.1$; $p < 0.05$] and last five years [$t(27) = -2.57$; $p < 0.05$]. Table 2.

Patients in the IAH group scored significantly higher on the BDI ($t(27) < 0.005$), indicating worse depressive symptoms. On the cognitive measures, no significant between-group differences were observed in the MMSE and moreover, the scores obtained in this test were in the normal range (MMSE > 26). Similarly, no significant differences were observed in the total corrected scores or in the percentage of cases in each group scoring in the clinical range ($z < -1.5$) for any of the measures. However, a slight difference [$t(27) = 2.03$; $p = 0.05$] was found in the TMT-A regarding the percentage of cases scoring in the clinical range. This difference was found in relation to a higher proportion of patients scoring in the clinical range in the IAH group (IAH = 27.3% vs NAH = 6.3%).

Table 1 – Clinical and sociodemographic data.

	IAH (n = 11)	NAH (n = 16)	p
Age (years)	57 ± 12.8	59.5 ± 9.4	0.570
Gender (% female)	58.3	41.7	0.096
Education (years)	13.2 ± 6.3	14.7 ± 4.5	0.478
BMI (kg/m ²)	25.7 ± 6.8	27.5 ± 3.7	0.407
Disease duration (years)	29.6 ± 12.6	30.5 ± 8.1	0.818
MDI/CSII (%)	61.1/38.9	73.7/26.3	0.315
Clarke score	4.8 ± 0.8	1 ± 0.7	<0.001
Basal insulin dose (UI/kg/day)	0.21 ± 0.4	0.32 ± 0.1	0.020
Prandial insulin dose (UI/kg/day)	0.22 ± 0.1	0.31 ± 0.21	0.129
HbA1c (%)	7.7 ± 1	6.8 ± 3.2	0.364
	Last year	7.5 ± 0.9	0.949
	Last 5 years	7.5 ± 0.8	0.811
SH episodes in previous year	0.6 ± 1	0.06 ± 0.2	0.097
SH episodes in last 5 years	2.1 ± 3	0.1 ± 0.3	0.059
DKA episodes in previous year	0.1 ± 0.5	0.07 ± 0.2	0.829
DKA episodes in last 5 years	0.3 ± 0.6	0.1 ± 0.3	0.262
Retinopathy (% prevalence)	23.1	35.3	0.377
Glycaemia at study (mg/dL)	134.5 ± 85.1	154.5 ± 80.1	0.546
LDL cholesterol (mg/dL)	186.3 ± 29.9	159.7 ± 51.7	0.138
MMSE (score)	29.5 ± 0.6	29.3 ± 1.2	0.676
BDI (score)	10 ± 5.5	4.3 ± 3.7	0.004

Abbreviations: IAH, impaired awareness of hypoglycaemia; NAH, normal awareness to hypoglycaemia; BMI, body mass index; ²Multiple daily insulin injections/continuous subcutaneous insulin infusion; SH, severe hypoglycaemia; DKA, diabetic ketoacidosis; MMSE, Mini-mental State Examination; BDI, Beck Depression inventory.

Table 2 – Neuropsychological assessment data.

	IAH (n = 11)	NAH (n = 16)	p
CERAD word list memory	8.18 ± 1.6	7.8 ± 1.8	0.660
Corrected standardized score	-	-	
% cases scoring z < -1.5	18.2	12.5	0.545
CERAD word list recall	6.2 ± 1.8	5.5 ± 2.3	0.408
Corrected standardized score	-	-	
% cases scoring z < -1.5	9.1	12.5	0.643
CERAD word list recognition	19.4 ± 1	19.4 ± 1.2	0.864
Corrected standardized score	-	-	
% cases scoring z < -1.5	0	6.3	0.398
TMT-A ²	52.9 ± 20.3	42.4 ± 15.9	0.144
Corrected standardized score	6.73 ± 2.5	9.2 ± 3.4	0.053
% cases scoring z < -1.5	27.3	6.3	0.131
TMT-B ²	125.8 ± 81.3	95.1 ± 60.8	0.271
Corrected standardized score	7.5 ± 2.1	9 ± 2.5	0.119
% cases scoring z < -1.5	9.1	12.9	0.643
Phonetic verbal fluency	15.3 ± 4.5	15.1 ± 4.9	0.899
Corrected standardized score	10 ± 1.6	9.5 ± 2.7	0.569
% cases scoring z < -1.5	0	12.5	0.342
Semantic verbal fluency	19.8 ± 4.9	19.6 ± 5.7	0.929
Corrected standardized score	9.1 ± 2.8	8.5 ± 2.7	0.537
% cases scoring z < -1.5	9.1	18.8	0.488
Boston naming test	12.3 ± 1.2	13 ± 1.6	0.282
Corrected standardized score	9.9 ± 1.8	10.8 ± 3.1	0.368
% cases scoring z < -1.5	0	6.3	0.398

Abbreviations: IAH, impaired awareness of hypoglycaemia; NAH, normal awareness to hypoglycaemia; BMI, body mass index; CERAD, Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease; TMT, Trail Making Test parts A and B.

3.1. Auditory oddball task

No between-group differences in the number of averaged epochs or correct responses (response to target signal) were observed. Repeated measures ANOVA in the overall sample

using the factors “electrode” (Fz, Cz, Pz) and “condition” (frequent/infrequent) showed significant effects at Pz [F(1,26) = 15.9; p < 0.001] driven by significant increased positivity at Pz [t = -3.99; p < 0.001] around 400 ms after delivery of an infrequent stimulus (P3b). When novel stimuli were added to

the factor “condition”, significant effects were found at Fz [$F(1,26) = 27.1$; $p < 0.001$], Cz [$F(1,26) = 11.2$; $p < 0.005$], and Pz [$F(1,26) = 21.08$; $p < 0.001$], driven by a significantly increased positivity at Fz [$t = -5.2$; $p < 0.001$], Cz [$t = -3.3$; $p < 0.005$] and Pz [$t = -4.5$; $p < 0.001$] around 250 ms–400 ms following the novel stimulus (P3a) (Fig. 1) (see Fig. 2).

Repeated measures ANOVA using the factors “group” (IAH; NAH) and “condition” (frequent; novel) showed a significant group \times condition interaction for the P3a at Fz [$F(1,26) = 5.02$; $p < 0.05$], and Cz [$F(1,26) = 4.59$; $p < 0.05$]. Post-hoc t -test comparisons showed that this effect was driven by a significant reduction in P3a in the IAH group at Fz [t

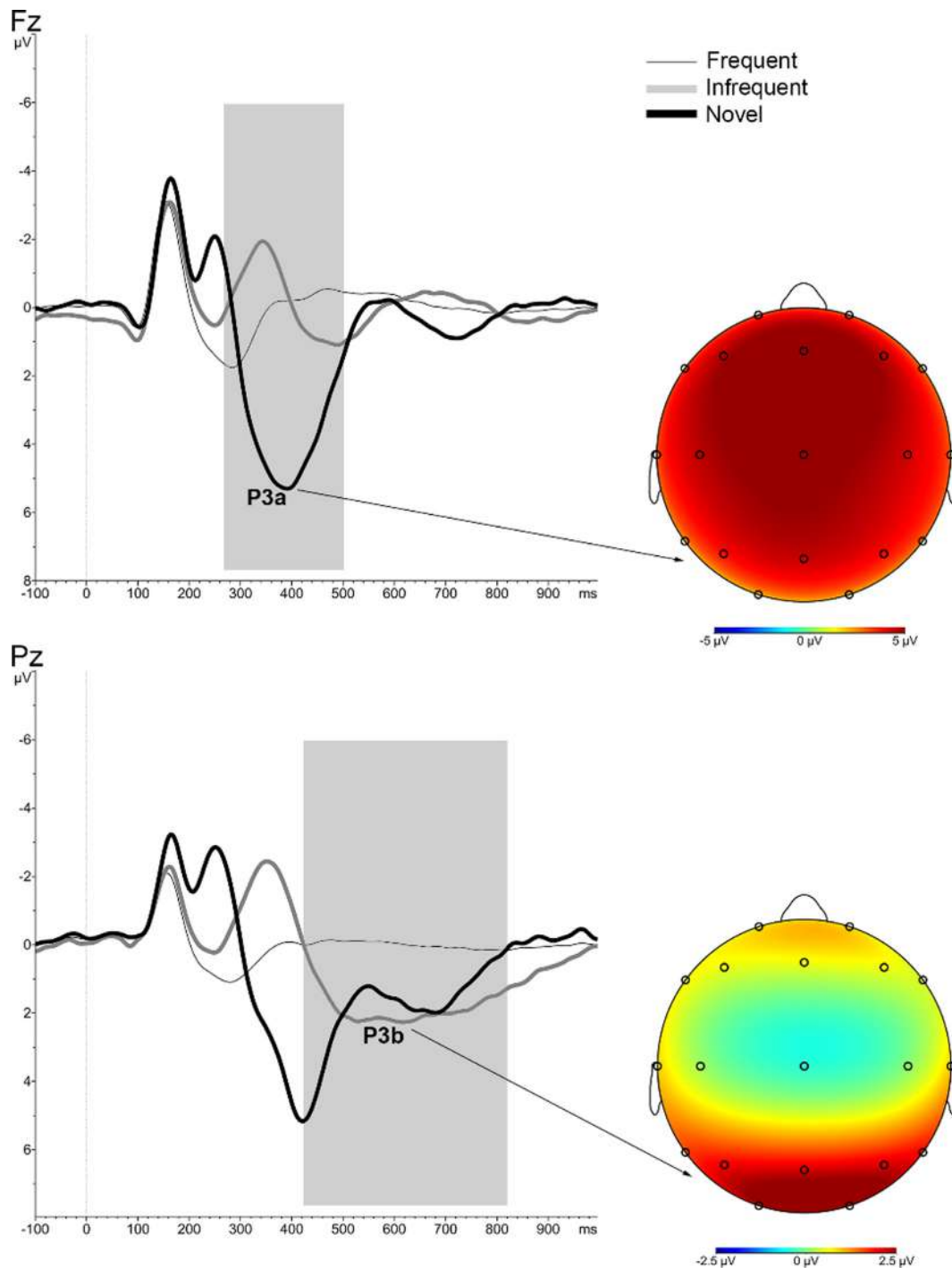


Fig. 1 – Stimulus-locked grand average ERPs for the whole sample. Grand average at Fz and Pz electrodes depicting the ERPs for frequent (thin line), infrequent (grey line) and novel (black line) stimuli. The P3a was identified as the most positive ongoing deflection between 240 and 500 ms (grey area) post-stimulus in the novel trials. The P3b was identified as the most positive deflection in the ERP between 400 and 800 ms (grey area) post-stimulus in the infrequent trials. The topographical map shows the frontal-central distribution of the P3a, and the central-parietal distribution of the P3b.

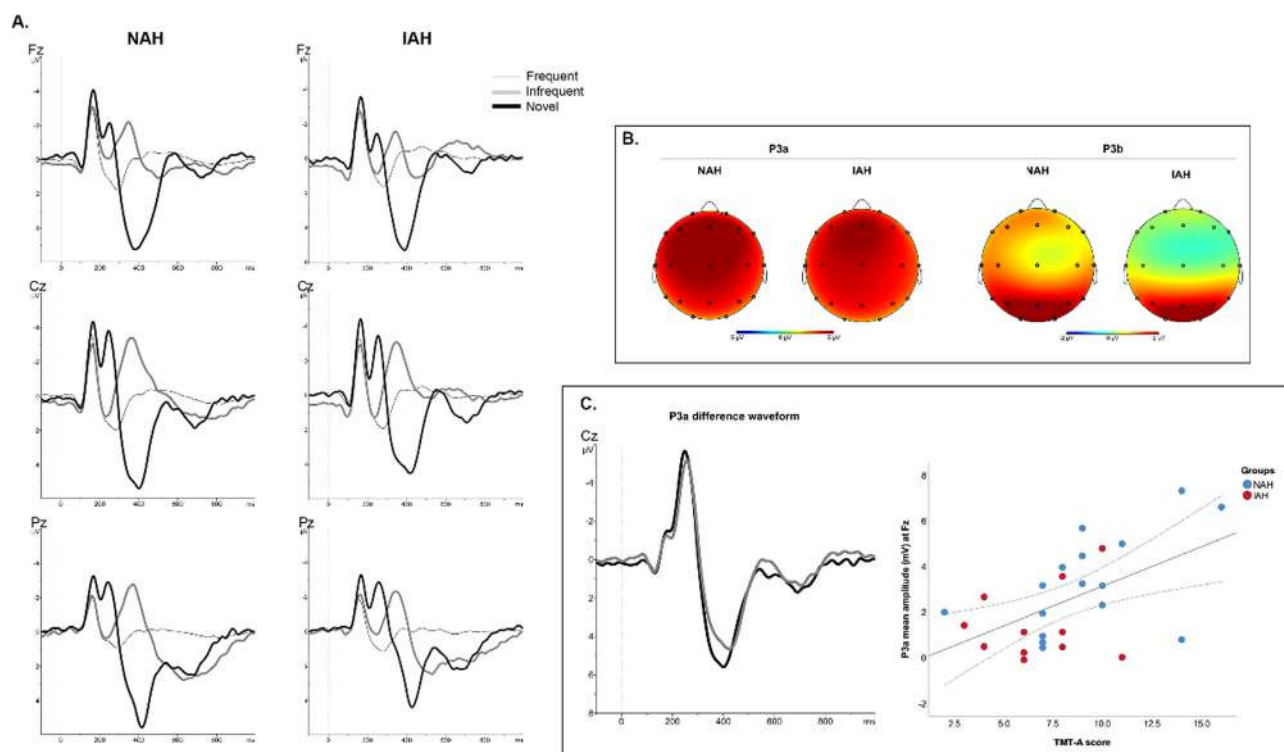


Fig. 2 – A) Stimulus-locked (grand average) ERPs in each group. B) Topographical maps showing the scalp distribution of the mean voltage of the ERPs in each group. A decreased voltage is seen in the IAH group both for the P3a and P3b. C) Difference wave-form for the novelty P3a and scatter-plot showing the association between the amplitude of the difference wave-form and performance in the TMT-A.

(27) = 2.63; $p < 0.05$] and Cz [t(27) = 2.39; $p < 0.05$]. In parallel, the comparisons made with the difference waveform (novel - frequent) also corroborated a lower amplitude of P3a in the IAH group at Fz [t(27) = 2.61; $p < 0.05$] and Cz [t(27) = 2.36; $p < 0.05$]. Repeated measures ANOVA using the factors “group” (IAH; NAH) and “condition” (frequent; infrequent) showed a significant group \times condition interaction for the P3b at Fz [F (1,26) = 4.3; $p < 0.05$]. Post-hoc t-test comparisons showed that this effect was driven by a significant reduction in the P3b in the IAH group at Fz [t(27) = 2.1; $p < 0.05$], also seen at Fz [t(27) = 2.1; $p < 0.05$] using the difference waveform (infrequent - frequent).

In terms of ERP latency, a trend towards significance was found for the P3a [t(27) = -1.8; $p = 0.076$], resulting from an increased latency in the IAH group (IAH = 424 ± 34 ms vs. NAH = 391 ± 53 ms). A bivariate correlation analysis showed that the P3a amplitude was significantly associated with the normalized score on the TMT-A ($r = 0.540$; $p < 0.005$), with a non-significant trend with the Clarke score ($r = -0.344$; $p = 0.085$).

4. Discussion

The aim of the present study was to characterize the effects of impaired awareness of hypoglycaemia in patients with T1D using specific neurophysiological parameters associated with attention and cognitive processing. We also sought to determine the association between the presence of IAH and other measures of neuropsychological functioning. We found that

T1D patients with IAH presented significant neurophysiological differences in both the P3a and P3b signals compared to patients with NAH. Importantly, both groups were comparable in terms of almost all sociodemographic and clinical variables, but the IAH group had higher scores for depressive mood and worse performance in the TMT-A, a processing speed and attention task.

T1D patients with IAH exhibited significantly decreased amplitudes in both the P3a and P3b components in frontal-central locations, and a tendency to elicit the P3a with a delayed latency. Although no between-group differences were observed in cognitive parameters assessed through neuropsychological assessment, performance in the TMT-A was worse in the IAH group. Interestingly, the amplitude of the P3a was strongly associated with performance of these tasks, suggesting the involvement of disrupted neurophysiological mechanism in the IAH group.

Our findings suggest that IAH is associated with disrupted neuronal processes that have minimal effects on cognitive functioning, at least at the point in time that the study was performed. Nevertheless, as our findings show, dysfunctional neuronal processes can be detected through the measurement of neurophysiological differences. Although the functional meaning of these findings cannot be determined from the data obtained in the present study, these results suggest several interesting possible interpretations. First, given the association between IAH and more frequent recurrence of severe hypoglycaemia, it is reasonable to suppose that there may be a causal relationship between these recurrent epi-

sodes and the concurrent presence of subtle neuronal damage [22,29,46]. Depending on the individual's clinical stage, these patterns may not accumulate sufficient neuronal damage load to produce evident cognitive deficits, even though may be detectable through neurophysiological measures. Thus, it is also reasonable to assume that, in the long term, continued and recurrent SH episodes will cause progressive, cumulative neural damage, eventually leading to significant cognitive impairment with important implications for the patient's quality of life [13,17,26].

The findings of this study underscore the need to avoid, or at least minimize, recurrent episodes of SH in order to prevent potentially clinically meaningful deleterious consequences for cognitive functioning. However, longitudinal studies are needed to confirm whether the observed neural damage is cause or consequence of IAH and cognitive alterations. It is also important to consider that we examined only a limited number of ERPs and neuropsychological tasks in this study. Thus, the apparent absence of clinically relevant neuropsychological deficits and/or differences between groups may be attributable to two factors: a) the selected tests may not be sufficiently sensitive to detect existing deficits and/or b) the patients could have symptoms in other domains or processes that have not been explored. A second possible interpretation of our findings is related to the frontal P3a, or novelty P3, which has been extensively associated with the engagement of attention resources, especially those involved in the orientation of attention to relevant environmental changes or novelty [32,33]. The P3b neurophysiological component has been extensively studied in recent decades and shown to be closely associated with information processing, cognitive workload, and context update. Even though the neural source of both components is only partially understood, it is accepted that the P3a is more closely related to neuronal populations in the prefrontal cortex as well as temporal-parietal regions while the P3b involves a complex circuitry of parietal and temporal regions, including hippocampal formation [35,47,48].

IAH is phenomenologically characterized by a lack of awareness or conscious detection of a set of symptoms. However, the extent to which IAH is due to the failure of endogenous mechanisms of detection of inner relevant information is not clear [49]. Unfortunately, it is not possible to determine the kind of causal relationship between IAH and the differences observed in the P3a and P3b components. Therefore, new studies are needed to explore in greater depth the extent to which the observed differences in P3a and P3b morphology are a consequence of the accumulation of neuronal damage caused by recurrent SH episodes. It is not clear whether the origin of IAH is due to a failure of the involuntary and automatic mechanisms of orientation of attention to relevant and novel inner information, or a combination of both factors. In this regard, the lack of correlation between the differences in the ERPs and the number of SH episodes during the last year and five years seems to suggest that the accumulation of SH episodes may not be wholly responsible for the pattern of neural damage, which may or may not promote these differences. In turn, this suggests that the mechanisms that give rise to these differences in neurophysiological signals may already exist in patients with IAH prior to onset of these

episodes. Given the between-group differences in depressive symptom severity, it would be interesting to explore the possible relationship between depression, attention, and awareness of hypoglycaemia. In fact, it is widely recognized that the amplitudes of p3a and p3b are reduced in patients with depressive symptoms, with a negative impact on attention and processing speed [50,51]. Thus, our findings may reflect mechanisms associated with the etiology of difficulties in detecting hypoglycaemic symptoms in patients with IAH.

Clearly, an in-depth study will be required to explore the mechanisms involved and the implications. Assuming that there is an association between IAH, SH, and concurrent neuronal damage, more research is needed to accurately elucidate and characterize the mechanisms that promote neuronal damage in patients with T1D-IAH. Similarly, if we assume that there is a causal association between defective attention and the development of IAH, it will be necessary to determine why some T1D patients present alterations in brain processes related to the orientation of attention that make them unable to detect hypoglycaemia symptoms.

The present study has several important limitations, particularly the small sample size, which precludes the generalization of these findings. In addition, the neuropsychological examination performed in this study does not cover all of the potential cognitive domains of interest. Consequently, future studies should use a larger battery of neuropsychological assessments. By contrast, the main strength of this study is the description of a novel, potentially explanatory and theoretical framework to understand the cognitive origin and implications of IAH in patients with T1D.

In conclusion, the findings of the present study suggest that the presence of neural damage associated with IAH in T1D patients, as evidenced by neurophysiological alterations, could act as novel biomarkers in this group of patients.

CRedit authorship contribution statement

Nicole Stantonyonge: Conceptualization, Data curation, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Writing-original draft, Writing-review and editing. **Saul Martinez-Horta:** Conceptualization, Data curation, Investigation, Methodology, Writing-original draft, Writing-review and editing. **Frederic Sampedro:** Investigation, Writing-review and editing. **María Belén Sánchez-Saudinós:** Investigation, Methodology, Writing-review and editing. **Ana Chico:** Conceptualization, Investigation, Supervision, Writing-review and editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgement

The authors acknowledge the editorial assistance of Bradley Londres from Londres Medical Writing, Editing and Translation.

Data availability

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Funding information

This study was supported by a grant from the SPANISH DIABETES SOCIETY.

Compliance with ethical standards

Ethical approval: All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Statement of informed consent: Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

REFERENCES

- [1] American Diabetes A. 12. Older Adults: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care*. 2020;43(Suppl 1):S152–S162.
- [2] Diabetes C, Complications Trial Research G, Nathan DM, et al. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993;329(14):977–986.
- [3] American Diabetes A. 6. Glycemic Targets: Standards of Medical Care in Diabetes-2021. *Diabetes Care*. 2021;44(Suppl 1):S73–S84.
- [4] Brito-Sanfel M, Diago-Cabezudo J, Calderon A. Economic impact of hypoglycemia on healthcare in Spain. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res* 2010;10(6):649–60.
- [5] McCoy RG, Van Houten HK, Ziegenfuss JY, Shah ND, Wermers RA, Smith SA. Increased mortality of patients with diabetes reporting severe hypoglycemia. *Diabetes Care* 2012;35(9):1897–901.
- [6] American Diabetes A. 6. Glycemic Targets: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care*. 2020;43(Suppl 1):S66–S76.
- [7] Gimenez M, Lopez JJ, Castell C, Conget I. Hypoglycaemia and cardiovascular disease in Type 1 Diabetes. Results from the Catalan National Public Health registry on insulin pump therapy. *Diabetes Res Clin Prac* 2012;96(2):e23–5.
- [8] Gruden G, Barutta F, Chaturvedi N, et al. Severe hypoglycemia and cardiovascular disease incidence in type 1 diabetes: the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetes Care* 2012;35(7):1598–604.
- [9] Pedersen-Bjergaard U, Thorsteinsson B. Reporting Severe Hypoglycemia in Type 1 Diabetes: Facts and Pitfalls. *Curr Diab Rep* 2017;17(12):131.
- [10] Pettus JH, Zhou FL, Shepherd L, et al. Incidences of Severe Hypoglycemia and Diabetic Ketoacidosis and Prevalence of Microvascular Complications Stratified by Age and Glycemic Control in U.S. Adult Patients With Type 1 Diabetes: A Real-World Study. *Diabetes Care* 2019;42(12):2220–7.
- [11] Cryer PE. Diverse causes of hypoglycemia-associated autonomic failure in diabetes. *N Engl J Med* 2004;350(22):2272–9.
- [12] Geddes J, Schopman JE, Zammitt NN, Frier BM. Prevalence of impaired awareness of hypoglycaemia in adults with Type 1 diabetes. *Diabet Med* 2008;25(4):501–4.
- [13] Cukierman T, Gerstein HC, Williamson JD. Cognitive decline and dementia in diabetes—systematic overview of prospective observational studies. *Diabetologia* 2005;48(12):2460–9.
- [14] Srikanth V, Sinclair AJ, Hill-Briggs F, Moran C, Biessels GJ. Type 2 diabetes and cognitive dysfunction-towards effective management of both comorbidities. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2020;8(6):535–45.
- [15] Moran C, Beare R, Phan T, et al. Neuroimaging and its Relevance to Understanding Pathways Linking Diabetes and Cognitive Dysfunction. *J Alzheimers Dis* 2017;59(2):405–19.
- [16] Brands AM, Biessels GJ, de Haan EH, Kappelle LJ, Kessels RP. The effects of type 1 diabetes on cognitive performance: a meta-analysis. *Diabetes Care* 2005;28(3):726–35.
- [17] Lincoln NB, Faleiro RM, Kelly C, Kirk BA, Jeffcoate WJ. Effect of long-term glycemic control on cognitive function. *Diabetes Care* 1996;19(6):656–8.
- [18] Diabetes C, Complications Trial/Epidemiology of Diabetes I, Complications Study Research G, et al. Long-term effect of diabetes and its treatment on cognitive function. *N Engl J Med*. 2007;356(18):1842–1852.
- [19] Nunley KA, Rosano C, Ryan CM, et al. Clinically Relevant Cognitive Impairment in Middle-Aged Adults With Childhood-Onset Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* 2015;38(9):1768–76.
- [20] Tonoli C, Heyman E, Roelands B, et al. Type 1 diabetes-associated cognitive decline: a meta-analysis and update of the current literature. *J Diabetes* 2014;6(6):499–513.
- [21] Shalimova A, Graff B, Gasecki D, et al. Cognitive Dysfunction in Type 1 Diabetes Mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2019;104(6):2239–49.
- [22] Auer RN. Hypoglycemic brain damage. *Metab Brain Dis* 2004;19(3–4):169–75.
- [23] Auer RN, Wieloch T, Olsson Y, Siesjo BK. The distribution of hypoglycemic brain damage. *Acta Neuropathol* 1984;64(3):177–91.
- [24] Chaytor NS, Barbosa-Leiker C, Ryan CM, Germine LT, Hirsch IB, Weinstock RS. Clinically significant cognitive impairment in older adults with type 1 diabetes. *J Diabetes Complications* 2019;33(1):91–7.
- [25] Stantonyonge N, Sampedro F, Mendez J, Martinez-Horta S, Chico A, Gomez-Anson B. Structural Grey and White Matter Differences in Patients with Type 1 Diabetes and Impaired Awareness of Hypoglycaemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2020.
- [26] Languren G, Montiel T, Julio-Amilpas A, Massieu L. Neuronal damage and cognitive impairment associated with hypoglycemia: An integrated view. *Neurochem Int* 2013;63(4):331–43.
- [27] Aoki T, Sato T, Hasegawa K, Ishizaki R, Saiki M. Reversible hyperintensity lesion on diffusion-weighted MRI in hypoglycemic coma. *Neurology*. 2004;63(2):392–3.
- [28] Lee BW, Jin ES, Hwang HS, Yoo HJ, Jeong JH. A case of hypoglycemic brain injuries with cortical laminar necrosis. *J Korean Med Sci* 2010;25(6):961–5.
- [29] Kirchoff BA, Lugar HM, Smith SE, et al. Hypoglycaemia-induced changes in regional brain volume and memory function. *Diabet Med* 2013;30(4):e151–6.

- [30] TC H. *Event-Related Potentials: A Methods Hand book*. Cambridge, MA: MIT Press; 2005.
- [31] Courchesne E, Hillyard SA, Galambos R. Stimulus novelty, task relevance and the visual evoked potential in man. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1975;39(2):131–43.
- [32] Escera C, Alho K, Schroger E, Winkler I. Involuntary attention and distractibility as evaluated with event-related brain potentials. *Audiol Neurootol* 2000;5(3–4):151–66.
- [33] Friedman D, Cycowicz YM, Gaeta H. The novelty P3: an event-related brain potential (ERP) sign of the brain's evaluation of novelty. *Neurosci Biobehav Rev* 2001;25(4):355–73.
- [34] Hedges D, Janis R, Mickelson S, Keith C, Bennett D, Brown BL. P300 Amplitude in Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis and Meta-Regression. *Clin EEG Neurosci* 2016;47(1):48–55.
- [35] Polich J. Updating P300: an integrative theory of P3a and P3b. *Clin Neurophysiol* 2007;118(10):2128–48.
- [36] Solbakk AK, Reinvang I, Andersson S. Assessment of P3a and P3b after moderate to severe brain injury. *Clin Electroencephalogr* 2002;33(3):102–10.
- [37] Papaliagkas V, Kimiskidis V, Tsolaki M, Anogianakis G. Usefulness of event-related potentials in the assessment of mild cognitive impairment. *BMC Neurosci* 2008;9:107.
- [38] Papaliagkas VT, Kimiskidis VK, Tsolaki MN, Anogianakis G. Cognitive event-related potentials: longitudinal changes in mild cognitive impairment. *Clin Neurophysiol* 2011;122(7):1322–6.
- [39] Clarke WL, Cox DJ, Gonder-Frederick LA, Julian D, Schlundt D, Polonsky W. Reduced awareness of hypoglycemia in adults with IDDM. A prospective study of hypoglycemic frequency and associated symptoms. *Diabetes Care* 1995;18(4):517–22.
- [40] Beck AT, Ward CH, Mendelson M, Mock J, Erbaugh J. An inventory for measuring depression. *Arch Gen Psychiatry* 1961;4:561–71.
- [41] Folstein MF, Robins LN, Helzer JE. The Mini-Mental State Examination. *Arch Gen Psychiatry* 1983;40(7):812.
- [42] Morris JC, Heyman A, Mohs RC, et al. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part I. Clinical and neuropsychological assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 1989;39(9):1159–65.
- [43] Crowe SF. The differential contribution of mental tracking, cognitive flexibility, visual search, and motor speed to performance on parts A and B of the Trail Making Test. *J Clin Psychol* 1998;54(5):585–91.
- [44] Lansing AE, Ivnik RJ, Cullum CM, Randolph C. An empirically derived short form of the Boston naming test. *Arch Clin Neuropsychol* 1999;14(6):481–7.
- [45] Pena-Casanova J, Blesa R, Aguilar M, et al. Spanish Multicenter Normative Studies (NEURONORMA Project): methods and sample characteristics. *Arch Clin Neuropsychol* 2009;24(4):307–19.
- [46] Lindvall O, Auer RN, Siesjo BK. Mechanisms of hypoglycemic brain damage. Evidence against a significant role of the noradrenergic locus coeruleus system. *Exp Brain Res* 1988;73(1):219–23.
- [47] Soltani M, Knight RT. Neural origins of the P300. *Crit Rev Neurobiol* 2000;14(3–4):199–224.
- [48] Polich J, Criado JR. Neuropsychology and neuropharmacology of P3a and P3b. *Int J Psychophysiol* 2006;60(2):172–85.
- [49] Graveling AJ, Frier BM. Impaired awareness of hypoglycaemia: a review. *Diabetes Metab* 2010;36(Suppl 3):S64–74.
- [50] Bruder GE, Kroppmann CJ, Kayser J, Stewart JW, McGrath PJ, Tenke CE. Reduced brain responses to novel sounds in depression: P3 findings in a novelty oddball task. *Psychiatry Res* 2009;170(2–3):218–23.
- [51] Klawohn J, Santopetro NJ, Meyer A, Hajcak G. Reduced P300 in depression: Evidence from a flanker task and impact on ERN, CRN, and Pe. *Psychophysiology* 2020;57(4) e13520.

5. RESUMEN GLOBAL DE RESULTADOS

Caracterización estructural cerebral en sujetos DM1 según percepción a la hipoglicemia.

En la investigación de posibles diferencias estructurales cerebrales según percepción a la hipoglicemia, estudiamos a dos grupos de sujetos con DM1 (20 con NAH, 20 con IAH) que fueron pareados por edad, años de evolución de enfermedad y años de educación. Ambos grupos fueron comparables en cuanto a: control metabólico (HbA1c), índice de masa corporal, presencia de complicaciones micro y macro vasculares, riesgo cardiovascular, prevalencia de dislipemia y cifras de colesterol LDL. En cuanto al análisis de las características sociodemográficas y variables clínicas, sólo observamos diferencias significativas entre ambos grupos en que los sujetos DM1 IAH se administraban una menor dosis de insulina diaria tanto prandial como basal y que la proporción de fumadores era menor.

Adicionalmente, el grupo IAH presentó un valor significativamente mayor en la puntuación del cuestionario de Clarke, así como mayor frecuencia de episodios de HG en el último año y en los últimos 5 años. Por último, este grupo también presentó una peor puntuación en el cuestionario que evaluó miedo a hipoglicemia. No se observaron diferencias en cuanto a función cognitiva global evaluada mediante MMSE, siendo normal en ambos grupos.

Respecto al análisis estructural cerebral:

***Sustancia gris:**

En comparación con el grupo DM1 NAH, los sujetos DM1 IAH presentaron un menor volumen cerebral de sustancia gris en las siguientes áreas anatómicas: corteza prefrontal dorsolateral izquierda, putamen derecho, ínsula derecha, precuneus/ corteza cingulada posterior derecha, surco calcarino bilateral, cuneus izquierdo, área motora suplementaria Brodmann 6 izquierda y giro temporal medial derecho.

También presentaron una menor superficie cortical en la corteza occipital, cingulada, temporal medial y prefrontal. No hubo diferencias entre ambos grupos en cuanto a grosor

cortical. Tampoco se observó un aumento en el volumen de sustancia gris en ninguna área cerebral evaluada en el grupo IAH.

En cuanto al análisis en relación a los episodios previos de HG, se observó una correlación negativa entre el número de estos y el volumen cerebral a nivel de precuneus derecho, ínsula y el tracto temporal medio.

***Sustancia blanca:**

El grupo de IAH presentó una menor anisotropía fraccional regional en los siguientes tractos de sustancia blanca: corticoespinal izquierdo, corona radiata anterior y superior, fascículo longitudinal superior e inferior, fórceps minor, radiación talámica anterior y giro cingular-angular.

Se observó también una asociación entre mayor número de episodios previos de HG y un menor valor medio de anisotropía fraccional a nivel del tracto occipital derecho, frontal inferior y paracentral izquierdo.

Adicionalmente, se evidenció una correlación negativa entre la puntuación del cuestionario de Clarke y el volumen de sustancia gris del precuneus derecho y el promedio de anisotropía fraccional de la radiación talámica anterior.

Caracterización neurocognitiva en sujetos DM1 según percepción a la hipoglicemia

Del análisis de la caracterización neurocognitiva de 27 sujetos con DM1 (16 con NAH y 11 con IAH), no se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a edad, duración de la DM1, sexo, años de educación, índice de masa corporal, dosis de insulina prandial, control metabólico (HbA1c), prevalencia de retinopatía, cifra de colesterol LDL, valor de glucosa capilar previo al EEG ni episodios previos de cetoacidosis.

El grupo de sujetos con DM1 IAH se administraba una dosis diaria significativamente menor de insulina basal y puntuaba más alto en el cuestionario de Clarke. En cuanto a los episodios previos de HG, si bien fue más de 10 veces más frecuente en el grupo DM1 IAH tanto en el último año como en los últimos 5 años, la diferencia no alcanzó la significación estadística ($p= 0,059$).

Respecto a la **valoración neuropsicológica**, los sujetos con DM1 IAH presentaron una puntuación significativamente mayor en la escala de valoración de depresión de Beck, indicando mayor sintomatología depresiva. Adicionalmente, un mayor número de pacientes en el grupo de DM1 IAH puntuaron por debajo del rango normal en la prueba Trail making test A, con una significación estadística de 0,05. En el resto de las pruebas de la batería neuropsicológica no hubo diferencias entre grupos, siendo la puntuación normal en ambos.

En cuanto al análisis de **ERPs**, no hubo diferencias entre ambos grupos en cuanto al número de respuestas correctas a la hora de responder a un estímulo.

El grupo de sujetos con DM1 IAH presentó una menor amplitud de la onda P3a y P3b además de una mayor latencia en la onda P3a comparado con el grupo de DM1 NAH, siendo dichas diferencias estadísticamente significativas. Adicionalmente, la amplitud de la onda P3a se correlacionaba con la puntuación normalizada de la prueba TMT-A ($r = 0.540$, $p < 0.05$). Asimismo, se observó la misma tendencia con la puntuación del cuestionario de Clarke, sin embargo, esta asociación no alcanzó la significación estadística.

6. RESUMEN GLOBAL DE LA DISCUSIÓN

En el desarrollo de esta tesis, se ha evidenciado que en un grupo de sujetos con DM1, existen diferencias estructurales cerebrales y neurofisiológicas dependiendo de la percepción a la hipoglicemia.

El estudio de la función cerebral en sujetos con DM1 se ha convertido en un tema de investigación que ha adquirido cada vez más relevancia en los últimos años, probablemente porque la evolución de la asistencia sanitaria ha permitido que la población con DM1 haya alcanzado una longevidad inalcanzable hace tan sólo unas décadas atrás (135). Estudios previos han objetivado que además del deterioro de la función cognitiva inherente a la edad, los sujetos con DM1 tendrían mayor riesgo de desarrollar DC en comparación a una población de similares características sin DM1 (94). Esta asociación se ha basado en observaciones de un peor rendimiento en diversas funciones cognitivas como en velocidad de procesamiento, atención e inteligencia (91) (93), así como menor volumen cerebral a nivel cortical frontal y temporal mediante análisis de pruebas de neuroimagen (112)(113).

Los factores que explican el mayor riesgo de DC en sujetos con DM1 son diversos, influyendo tanto la hiperglicemia como la hipoglicemia, aunque algunos autores aseguran que la HG tendría un papel fundamental (94). La HG es más frecuente en sujetos con mayor duración de DM1, mayor edad (11) y sobre todo en aquellos que presentan IAH (21). A pesar de que la IAH es una condición que se ha descrito desde el descubrimiento de la insulina (49), hasta la fecha los mecanismos que explican su fisiopatología no están claramente establecidos. La mayoría de estudios previos se han centrado en que la IAH se produce porque la exposición repetida a la hipoglicemia provoca una alteración en la activación de las hormonas de contrarregulación y un cambio del umbral del valor de glucosa en el cual aparecen los síntomas de la hipoglicemia (119).

Sin embargo, más recientemente, observaciones realizadas mediante pruebas funcionales de neuroimagen, han permitido identificar diferencias en la activación de ciertas áreas cerebrales durante episodios agudos de hipoglicemia, específicamente a nivel de tálamo y circuito cortico-estriatal (130) en sujetos con DM1 IAH en comparación a DM1 NAH (128)(129). Estas observaciones han llevado a proponer que una alteración de la actividad

neuronal en la corteza cingulada anterior, el tálamo y la corteza prefrontal podría estar relacionada con el desarrollo de IAH (132).

El hecho de que aún no se conozcan claramente los mecanismos fisiopatológicos de la IAH; una condición clínica que afecta al menos a un 25% de los sujetos con DM1(21) y que está asociada a una mayor morbimortalidad al ser el principal factor de riesgo de padecer HG, nos llevó a profundizar en la caracterización cerebral y neurocognitiva en este subgrupo de pacientes.

En el primer artículo de esta tesis, se describen diferencias estructurales tanto a nivel de sustancia gris como blanca mediante el análisis multimodal de RMN cerebral. Nuestros hallazgos corresponden a una disminución del volumen de sustancia gris a nivel global, pero más marcado en la región frontal y parietal, similar a lo reportado previamente por Bednarik et al (134). Las áreas que concentraron las mayores diferencias entre ambos grupos fueron la corteza prefrontal, sistema límbico y la ínsula; las cuales participan entre otras funciones en la atención, toma de decisiones y la regulación autonómica. De manera más específica, la corteza prefrontal dorsolateral participa en la función ejecutiva y está estrechamente conectada con el tálamo. El tálamo por su parte, se considera un centro integrador de aferencias y eferencias del SNC, además de mediar el estado de alerta y la percepción. Respecto a los hallazgos a nivel de sustancia blanca, evidenciamos una menor anisotropía fraccional en la porción cortical del tracto cortico espinal que se ha relacionado con la integración de la información sensorial corporal. También con el fórceps menor que conecta ambos lóbulos frontales y la corona radiata anterior, siendo estos dos últimos tractos los que participan sobretodo en la función ejecutiva. Por último, observamos diferencias a nivel de la radiación talámica anterior, tracto que conecta el núcleo talámico dorsomedial con la corteza prefrontal dorsolateral, involucrada principalmente en la habilidad motora.

Es importante destacar que ambos grupos de sujetos con DM1 eran comparables en cuanto al control glucémico medido según HbA_{1c}, nivel de educación, factores adicionales de riesgo cardiovascular y en todas las variables sociodemográficas evaluadas. Sólo observamos diferencias estadísticamente significativas en que el grupo IAH obtuvo una mayor puntuación del cuestionario de Clarke, que corresponde a la variable que define ambos grupos, una menor dosis de insulina basal y una mayor puntuación en el

cuestionario que evaluó MH. El mayor MH en este grupo de pacientes podría explicar que utilizaran dosis menores de insulina basal en un intento de reducir el riesgo de desarrollar hipoglucemia.

En cuanto a la valoración de la función cognitiva global evaluada mediante el MMSE, resultó ser normal en toda la muestra, con una puntuación muy similar en los dos grupos. La ausencia de evidencia de DC otorga mayor relevancia a nuestros resultados, ya que las diferencias estructurales observadas podrían considerarse preclínicas. Sin embargo, a pesar de que el MMSE es una de las pruebas de cribado más utilizadas para una aproximación en el diagnóstico de DC, tiene limitaciones sobretodo en la evaluación de la función ejecutiva y la visuopercepción que no pueden ser obviadas (136).

Por otra parte, el número de episodios de HG era significativamente mayor en el grupo de personas con DM1 e IAH comparado con el grupo con DM1 y NAH, lo cual era esperable al ser la IAH el principal factor de riesgo de HG (21). Además, en un análisis exploratorio, se objetivó una asociación entre un menor volumen cerebral en determinadas estructuras anatómicas (precuneus derecho, ínsula, temporal occipital derecho y frontal, radiación talámica derecha) y la frecuencia de episodios previos de HG. Por último, también se evidenció una correlación negativa entre la puntuación del cuestionario de Clarke y la superficie cortical a nivel de precuneus derecho y radiación talámica derecha. En otras palabras, se evidenció que, a mayor número de episodios de HG, así como peor percepción a la hipoglicemia, existía un menor volumen cerebral, indicando una mayor pérdida neuronal.

Es indudable que, por la metodología del estudio, no se puede establecer una relación de causalidad entre el menor volumen cerebral observado en determinadas estructuras anatómicas y los episodios de HG o la percepción a la hipoglicemia. Es más, no se puede resolver la incógnita respecto a si las diferencias estructurales que se observan son la causa precedente que explica que el grupo DM1 IAH no perciba adecuadamente las hipoglicemias y esto los predispone a tener más episodios de HG, o si de forma contraria, las diferencias estructurales son debidas al efecto directo de los episodios de HG a nivel neuronal. Llama la atención que, a pesar de que los hallazgos engloban a diversas áreas, las diferencias se concentran sobretodo en estructuras anatómicas relacionadas con la

integración de información, atención y toma de decisiones que concuerda con lo previamente descrito en otros estudios.

En el segundo artículo, mediante una extensa valoración neuropsicológica, no se objetivó deterioro cognitivo en ninguno de los dos grupos. Sin embargo, al comparar los resultados según percepción a la hipoglicemia, el grupo DM1 IAH puntuó significativamente peor en el *Trail making test parte A*, una prueba que evalúa la atención y velocidad de procesamiento, además de presentar mayor sintomatología depresiva. Al comparar estos hallazgos con lo publicado previamente, se objetivó que sólo tres estudios habían estudiado las diferencias neurocognitivas según la percepción a la hipoglicemia en sujetos con DM1. Mientras que Sachon (137) y Hansen et al (127) identificaron que la IAH se asociaba a un peor rendimiento en memoria adquirida y en función ejecutiva, Bortolotti et al (138) de forma similar a los hallazgos de esta tesis, evidenciaron diferencias significativas en la velocidad de procesamiento en los sujetos IAH.

De todas formas, la ausencia de hallazgos en la valoración neuropsicológica podría deberse a que las pruebas utilizadas no sean lo suficientemente sensibles como para detectar signos de alteración de las funciones cognitivas que podrían verse afectadas en estos pacientes. Como ya se ha mencionado previamente, a pesar de que la evidencia es escasa, las diferencias entre ambos grupos se han concentrado en alteraciones a nivel de agilidad psicomotora y memoria adquirida. La inclusión de pruebas adicionales que evalúen estos dominios cognitivos podría ser relevante en futuras investigaciones.

En nuestro estudio, si bien ambos grupos sólo presentaban diferencias estadísticamente significativas respecto a la puntuación del cuestionario de Clarke y la dosis basal de insulina, el grupo con DM1 e IAH había presentado nominalmente 10 veces más episodios de HG que el grupo DM1 NAH en los últimos años (significación límite). En un análisis posterior, no se observó una asociación entre el nº de episodios previos de HG con la puntuación en la valoración neurocognitiva.

Respecto a la evaluación de los ERPs, la ausencia de diferencias en el porcentaje de respuestas correctas entre ambos grupos refuerza que los resultados observados no son atribuibles a diferencias durante el procedimiento de la prueba como hubiera podido ocurrir en caso de fallo en la comprensión de la orden o en la percepción del sonido.

Los hallazgos específicos fueron que el grupo con DM1 e IAH presentó una menor amplitud en los componentes P3a y P3b, así como una mayor latencia en el componente P3a. Adicionalmente se observó una asociación entre la amplitud de P3a y la puntuación del *Trail making test parte A*. Es decir, los sujetos con DM1 e IAH presentaron una diferencia en la actividad electrofisiológica relacionada con la atención, específicamente en aquella que implica la capacidad de reconocer un estímulo novedoso y orientar de manera automática su atención al estímulo (componente P3a: corteza prefrontal) y en el procesamiento de la información y memoria de trabajo (componente P3b: lóbulo parietal, temporal).

Por la metodología del estudio, no se puede descartar que la exposición más frecuente a episodios previos de HG en el grupo con DM1 e IAH explique, aunque sea en parte, los hallazgos. Sin embargo, el hecho de que no se haya observado una asociación entre la amplitud y latencia de los ERPs con los episodios previos de HG, sumado a que los hallazgos en los componentes P3a y P3b sean en ausencia de una alteración global de la valoración neurocognitiva, apoyaría la hipótesis de que estas diferencias electrofisiológicas son previas a un daño cognitivo clínico establecido.

Los datos aquí presentados son los primeros en demostrar que los sujetos con DM1 e IAH presentan diferencias en la detección de la novedad en comparación con sujetos DM1 y NAH. Creemos que estos hallazgos podrían contribuir a explicar el mecanismo neurofisiológico de la IAH. En este sentido, las diferencias observadas en el componente P3a sugieren que en los pacientes con DM1 e IAH podrían tener una disfunción en los procesos de detección de la novedad y orientación automática de la atención a un estímulo relevante (en este caso, a los síntomas de hipoglucemia). Esta disfunción, repercutiría posteriormente en el modo en que se procesa la información. En global, estos mecanismos podrían explicar la ausencia de consciencia sobre el episodio, entendiendo que esto sería secundario a la no detección del evento por parte de los sistemas implicados en la atención.

Sin embargo, como ya se ha comentado previamente, la atención es un proceso mental muy complejo, que corresponde a un sistema de subprocessos específicos por lo que no

pretendo concluir que estos hallazgos explican la etiopatogenia de la IAH, pero sí considero que futuros estudios deberían profundizar en investigar estas diferencias.

Adicionalmente, para profundizar más en el objetivo de realizar una caracterización cerebral más extensa, en los anexos 1 y 2 detallamos los resultados de la valoración del mismo grupo de sujetos con DM1 mediante la determinación de niveles plasmáticos de neurofilamento de cadena ligera (NFL) y el análisis del PET-TC cerebral.

Como ya se ha mencionado previamente, el NFL es un biomarcador sanguíneo que se ha comenzado a utilizar recientemente en el estudio de daño cerebral, demostrando una elevada sensibilidad para detectar daño neuroaxonal (78)(79). Basándonos en estos antecedentes, diseñamos un estudio (anexo 1) con el objetivo de comparar los niveles plasmáticos de tres grupos diferentes: un grupo de sujetos con DM1 y NAH (n=18), un grupo de sujetos con DM1 e IAH (n=18) y un grupo control sin DM1 (n=18). Todos los grupos fueron comparables en todas las variables sociodemográficas evaluadas. No hubo diferencias entre los dos grupos de sujetos con DM1 en cuanto a control glicémico según HbA_{1c}, duración de la DM1 y prevalencia de complicaciones crónicas de la DM, sin embargo, el número de episodios previos de HG fue significativamente mayor en el grupo DM1 IAH. Observamos que la media de niveles plasmáticos de NFL fue significativamente mayor en el grupo DM1 IAH ($18,22 \pm 11,7$ pg/mL) que en el grupo DM1 NAH ($13,27 \pm 6,7$ pg/mL), siendo todavía más bajos en el grupo sin DM1 ($8,15 \pm 4,6$ pg/mL) ($p < 0.001$). Adicionalmente, observamos una correlación negativa entre las concentraciones de NFL y el volumen de sustancia gris cerebral (a mayor nivel de NFL, menor volumen cerebral) a nivel frontal, indicando que la pérdida neuronal por daño neuroaxonal se traduciría en unos niveles más altos de NFL en el grupo con DM1 IAH.

Nuestro grupo ha sido el primero en estudiar las concentraciones plasmáticas de NFL en población con DM1 por lo que no podemos comparar nuestros resultados con los de otros estudios. El NFL podría ser un marcador de daño axonal fácilmente medible, que permitiría identificar a pacientes que tienen mayor riesgo de presentar un DC, a los que se podrían administrar medidas terapéuticas más agresivas para prevenir la hipoglicemia y revertir la IAH. Sin embargo, al tratarse de un estudio observacional con un tamaño muestral reducido, es necesario realizar estudios adicionales incluyendo un mayor número de pacientes.

Por último, en el anexo 2 comparamos la captación de glucosa en normoglicemia mediante la realización de PET-TAC cerebral con 18-FDG entre sujetos DM1 IAH (n=10) y DM1 NAH (n=9) de similares características demográficas, años de evolución de la DM1, años de educación y control glicémico (% HbA_{1c}). En este estudio observamos que los sujetos DM1 IAH presentaron un aumento en la captación de glucosa cerebral en comparación con el grupo DM1 NAH (p<0.05). El hipermetabolismo fue global, pero más importante en el lóbulo parietal (precuneus) y frontal. También observamos que la captación de glucosa se correlacionaba positivamente con el número de episodios de HG en los últimos 5 años en la región de precuneus derecho (r=0.55, p 0.01). Por otra parte, el hipermetabolismo a nivel frontal se correlacionó de forma positiva con la puntuación del cuestionario de Clarke (r = 0.59, p 0.01).

Teniendo en cuenta las limitaciones del estudio por el reducido tamaño muestral las conclusiones que podemos obtener de nuestros hallazgos son meramente presuntivas. Adicionalmente, somos el primer grupo que ha estudiado diferencias a nivel de metabolismo basal cerebral en situación de normoglicemia, ya que todos los estudios que hemos mencionado previamente han analizado este aspecto durante un episodio agudo de hipoglicemia. Una posible explicación del incremento del metabolismo observado en los sujetos con DM1 IAH, sería la compensación de una eventual pérdida de sustancia gris a expensas de incrementar el consumo de glucosa. Sin embargo, en nuestro análisis, no observamos ninguna asociación entre el aumento de captación de glucosa y una disminución en el volumen de sustancia gris. Otra posible explicación podría estar en línea con lo previamente descrito por Criego et al (139) que sugiere que en los sujetos DM1 IAH podría existir un aumento del transporte de glucosa para compensar la deficiente percepción ante la hipoglicemia. Sin embargo, llama la atención que las áreas cerebrales en donde se observaron diferencias entre los dos grupos sean la corteza prefrontal y el precuneus, es decir áreas involucradas en la integración de información y toma de decisiones.

En resumen, esta tesis ha objetivado que los sujetos DM1 con IAH comparados con los sujetos DM1 NAH, presentan diferencias significativas a nivel cerebral que involucran: menor volumen de sustancia gris y blanca especialmente en áreas relacionadas con la toma de decisiones, atención, percepción, integración y procesamiento de información.

Además, presentan un aumento de captación de glucosa en situación de normoglicemia, mayor concentración de neurofilamento de cadena ligera (un marcador de daño neuroaxonal), peor rendimiento en atención y velocidad de procesamiento, así como menor capacidad de atención y detección de un estímulo novedoso.

Los datos proporcionados por esta tesis permiten concluir que el cerebro de los sujetos DM1 e IAH es estructural y funcionalmente diferente al de los sujetos DM1 NAH. Sin embargo, la asociación entre IAH y mayor exposición a episodios de HG no hace posible descartar que el daño neuronal producido por la HG no juegue un papel fundamental en las diferencias observadas.

7. CONCLUSIONES

En comparación con sujetos DM1 NAH de similares características, los sujetos DM1 IAH presentaron diferencias estructurales cerebrales y neurocognitivas que se resumen en:

- ◆ Menor volumen cerebral en el análisis de RMN cerebral a nivel global, pero más evidente en los lóbulos frontal y parietal. Las diferencias observadas se concentraron en áreas relacionadas con la función cognitiva, toma de decisiones, y procesamiento de la información. Los hallazgos se asociaron a episodios previos de HG y a la puntuación del cuestionario de Clarke.
- ◆ Peor desempeño en la valoración de la atención y velocidad de procesamiento, mayor miedo a la hipoglicemia y mayor sintomatología depresiva.
- ◆ Menor amplitud en el componente P3a y P3b en la valoración electrofisiológica, que se traduce en menor capacidad de atención y detección automática de un estímulo novedoso.
- ◆ Mayor número de episodios previos de HG. No es posible descartar que el efecto directo a nivel cerebral producido por la HG juegue un rol fundamental en las diferencias observadas.

8. FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

De los datos obtenidos de esta tesis, se desprenden diversas propuestas de investigación tales como:

- ◆ La primera de todas sería determinar si las diferencias observadas entre ambos grupos son debidas a la mayor exposición a episodios previos de HG en el grupo IAH. Para esto, se podría llevar a cabo la misma caracterización cerebral, pero teniendo en cuenta que no existan diferencias en el número de episodios de HG según el grupo de percepción a la hipoglicemia, reclutando a sujetos más jóvenes y con menos años de evolución de DM1, que son otros factores de riesgo para padecer HG.
- ◆ Uno de los principales hallazgos de este trabajo ha sido que los sujetos DM1 IAH presentaron diferencias en la atención, específicamente una menor capacidad de detección automática a la novedad y de orientación automática de la atención. Por tanto, podría ser que dentro de la etiopatogenia de la IAH estuviese involucrada una posible alteración en la capacidad de detectar la novedad. Por lo que otra propuesta de investigación sería la de evaluar este proceso mental mediante otros métodos, como por ejemplo utilizando los potenciales evocados visuales idealmente de forma simultánea a la realización de una RMNf.
- ◆ Otra pregunta que ha surgido en el desarrollo de esta tesis es el impacto que pudiera tener la variabilidad glicémica en las diferencias cerebrales observadas. En el momento de desarrollar esta tesis, el acceso a la monitorización continua/intermitente de glucosa era limitado. Sin embargo, en la actualidad la mayoría de los sujetos con DM1 utiliza algún sistema de monitorización, ya sea continuo o intermitente. La incorporación del coeficiente de variación y/o desviación estándar como variables en el estudio de las diferentes pruebas de caracterización cerebral podría ser muy interesante.
- ◆ Es sabido que un número importante de los sujetos DM1 IAH responden a la utilización de distintas herramientas terapéuticas dirigidas a evitar la hipoglicemia. Sería interesante evaluar en el mismo grupo de pacientes después

de finalizar un programa educativo específico o bien después del uso de algún sistema tecnológico, para determinar si se observan diferencias ya sea en la estructura cerebral, en la valoración neuropsicológica o en el estudio electrofisiológico en función de la “nueva” y “recuperada” percepción a la hipoglicemia.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Home, Resources, diabetes L with, Acknowledgement, FAQs, Contact, Policy P. IDF Diabetes Atlas | Tenth Edition. Available at: <https://diabetesatlas.org/>. Accessed November 2, 2021.
2. Kyvik KO, Nystrom L, Gorus F, Songini M, Oestman J, Castell C, Green A, Guyrus E, Ionescu-Tirgoviste C, McKinney PA, Michalkova D, Ostrauskas R, Raymond NT. The epidemiology of Type 1 diabetes mellitus is not the same in young adults as in children. *Diabetologia* 2004;47(3):377–384.
3. Realsen J, Goettle H, Chase H. Morbidity and mortality of diabetic ketoacidosis with and without insulin pump care. *Diabetes Technol. Ther.* 2012. doi:10.1089/dia.2012.0161.
4. Frier BM, Schernthaner G, Heller SR. Hypoglycemia and Cardiovascular Risks. *Diabetes Care* 2011;34(Suppl 2):S132–S137.
5. Skyler JS, Bergenstal R, Bonow RO, Buse J, Deedwania P, Gale EAM, Howard BV, Kirkman MS, Kosiborod M, Reaven P, Sherwin RS. Intensive Glycemic Control and the Prevention of Cardiovascular Events: Implications of the ACCORD, ADVANCE, and VA Diabetes Trials: A position statement of the American Diabetes Association and a scientific statement of the American College of Cardiology Foundation and the American Heart Association. *Diabetes Care* 2009;32(1):187–192.
6. Group TDC, Research CT. The Effect of Intensive Treatment of Diabetes on the Development and Progression of Long-Term Complications in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *N. Engl. J. Med.* 1993;329(14):977–986.
7. Nathan DM, Cleary PA, Backlund JYC, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ, Raskin P, Zinman B. Intensive Diabetes Treatment and Cardiovascular Disease in Patients with Type 1 Diabetes. *N. Engl. J. Med.* 2005;353(25):2643–2653.
8. Bebu I, Schade D, Braffett B, Kosiborod M, Lopes-Virella M, Soliman EZ, Herman WH, Bluemke DA, Wallia A, Orchard T, Lachin JM, DCCT/EDIC Research Group. Risk Factors for First and Subsequent CVD Events in Type 1 Diabetes: The DCCT/EDIC Study. *Diabetes Care* 2020;43(4):867–874.
9. Association AD. 6. Glycemic Targets: Standards of Medical Care in Diabetes—2021. *Diabetes Care* 2021;44(Supplement 1):S73–S84.
10. Arnett DK, Blumenthal RS, Albert MA, Buroker AB, Goldberger ZD, Hahn EJ, Himmelfarb CD, Khera A, Lloyd-Jones D, McEvoy JW, Michos ED, Miedema MD, Muñoz D, Smith SC, Virani SS, Williams KA, Yeboah J, Ziaeian B. 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation* 2019;140(11):e563–e595.
11. UK Hypoglycaemia Study Group. Risk of hypoglycaemia in types 1 and 2 diabetes: effects of treatment modalities and their duration. *Diabetologia* 2007;50(6):1140–1147.
12. Seaquist ER, Anderson J, Childs B, Cryer P, Dagogo-Jack S, Fish L, Heller SR, Rodriguez H, Rosenzweig J, Vigersky R. Hypoglycemia and Diabetes: A Report of a Workgroup of the American Diabetes Association and The Endocrine Society. *Diabetes*

Care 2013;36(5):1384–1395.

13. Boyle PJ, Schwartz NS, Shah SD, Clutter WE, Cryer PE. Plasma glucose concentrations at the onset of hypoglycemic symptoms in patients with poorly controlled diabetes and in nondiabetics. *N. Engl. J. Med.* 1988;318(23):1487–1492.

14. Heller SR, Cryer PE. Reduced Neuroendocrine and Symptomatic Responses to Subsequent Hypoglycemia After 1 Episode of Hypoglycemia in Nondiabetic Humans. *Diabetes* 1991;40(2):223–226.

15. Schwartz NS, Clutter WE, Shah SD, Cryer PE. Glycemic thresholds for activation of glucose counterregulatory systems are higher than the threshold for symptoms. *J. Clin. Invest.* 1987;79(3):777–781.

16. Cryer PE. Iatrogenic Hypoglycemia as a Cause of Hypoglycemia-Associated Autonomic Failure in IDDM: A Vicious Cycle. *Diabetes* 1992;41(3):255–260.

17. Amiel SA. The consequences of hypoglycaemia. *Diabetologia* 2021;64(5):963–970.

18. Heller SR, Buse JB, Ratner R, Seaquist E, Bardtrum L, Hansen CT, Tutkunkardas D, Moses AC. Redefining Hypoglycemia in Clinical Trials: Validation of Definitions Recently Adopted by the American Diabetes Association/European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 2020;43(2):398–404.

19. Towler DA, Havlin CE, Craft S, Cryer P. Mechanism of Awareness of Hypoglycemia: Perception of Neurogenic (Predominantly Cholinergic) Rather Than Neuroglycopenic Symptoms. *Diabetes* 1993;42(12):1791–1798.

20. Alwafi H, Alsharif AA, Wei L, Langan D, Naser AY, Mongkhon P, Bell JS, Ilomaki J, Al Metwazi MS, Man KKC, Fang G, Wong ICK. Incidence and prevalence of hypoglycaemia in type 1 and type 2 diabetes individuals: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2020;170:108522.

21. Geddes J, Schopman JE, Zammit NN, Frier BM. Prevalence of impaired awareness of hypoglycaemia in adults with type 1 diabetes. *Diabet. Med.* 2008;25(4):501–504.

22. Castellano-Guerrero AM, Guerrero R, Relimpio F, Losada F, Mangas MA, Pumar A, Martínez-Brocca MA. Prevalence and predictors of depression and anxiety in adult patients with type 1 diabetes in tertiary care setting. *Acta Diabetol.* 2018;55(9):943–953.

23. Liu J, Bispham J, Fan L, Poon J-L, Hughes A, Mcauliffe-Fogarty A, Varnado O, Mitchell B. Factors associated with fear of hypoglycaemia among the T1D Exchange Glu population in a cross-sectional online survey. *BMJ Open* 2020;10(9):e038462.

24. Strandberg RB, Graue M, Wentzel-Larsen T, Peyrot M, Wahl AK, Rokne B. The relationships among fear of hypoglycaemia, diabetes-related quality of life and psychological well-being in Norwegian adults with Type 1 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2017;124:11–19.

25. Kent DA, Quinn L. Factors That Affect Quality of Life in Young Adults With Type 1 Diabetes. *Diabetes Educ.* 2018;44(6):501–509.

26. Evans M, Khunti K, Mamdani M, Galbo-Jørgensen CB, Gundgaard J, Bøgelund M, Harris S. Health-related quality of life associated with daytime and nocturnal hypoglycaemic events: a time trade-off survey in five countries. *Health Qual. Life Outcomes* 2013;11:90.

27. Hendrieckx C, Halliday JA, Bowden JP, Colman PG, Cohen N, Jenkins A, Speight J. Severe hypoglycaemia and its association with psychological well-being in Australian adults with type 1 diabetes attending specialist tertiary clinics. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2014;103(3):430–436.
28. Wong CKH, Tong T, Cheng GHL, Tang EHM, Thokala P, Tse ETY, Lam CLK. Direct medical costs in the preceding, event and subsequent years of a first severe hypoglycaemia episode requiring hospitalization: A population-based cohort study. *Diabetes Obes. Metab.* 2019;21(6):1330–1339.
29. Thong EP, Herath M, Weber DR, Ranasinha S, Ebeling PR, Milat F, Teede H. Fracture risk in young and middle-aged adults with type 1 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 2018;89(3):314–323.
30. Jensen MH, Vestergaard P. Hypoglycaemia and type 1 diabetes are associated with an increased risk of fractures. *Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA* 2019;30(8):1663–1670.
31. Shah VN, Wu M, Foster N, Dhaliwal R, Al Mukaddam M. Severe hypoglycemia is associated with high risk for falls in adults with type 1 diabetes. *Arch. Osteoporos.* 2018;13(1):66.
32. Novodvorsky P, Bernjak A, Chow E, Iqbal A, Sellors L, Williams S, Fawdry RA, Parekh B, Jacques RM, Marques JLB, Sheridan PJ, Heller SR. Diurnal Differences in Risk of Cardiac Arrhythmias During Spontaneous Hypoglycemia in Young People With Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* 2017;40(5):655–662.
33. Lee S, Harris ND, Robinson RT, Yeoh L, Macdonald IA, Heller SR. Effects of adrenaline and potassium on QTc interval and QT dispersion in man. *Eur. J. Clin. Invest.* 2003;33(2):93–98.
34. Joy NG, Perkins JM, Mikeladze M, Younk L, Tate DB, Davis SN. Comparative effects of acute Hypoglycemia and Hyperglycemia on Pro-Atherothrombotic Biomarkers and Endothelial Function in Non-Diabetic Humans. *J. Diabetes Complications* 2016;30(7):1275–1281.
35. Gogitidze Joy N, Hedrington MS, Briscoe VJ, Tate DB, Ertl AC, Davis SN. Effects of Acute Hypoglycemia on Inflammatory and Pro-atherothrombotic Biomarkers in Individuals With Type 1 Diabetes and Healthy Individuals. *Diabetes Care* 2010;33(7):1529–1535.
36. Amiel SA, Aschner P, Childs B, Cryer PE, Galan BE de, Frier BM, Gonder-Frederick L, Heller SR, Jones T, Khunti K, Leiter LA, Luo Y, McCrimmon RJ, Pedersen-Bjergaard U, Seaquist ER, Zoungas S. Hypoglycaemia, cardiovascular disease, and mortality in diabetes: epidemiology, pathogenesis, and management. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2019;7(5):385–396.
37. Tunbridge WM. Factors contributing to deaths of diabetics under fifty years of age. On behalf of the Medical Services Study Group and British Diabetic Association. *Lancet Lond. Engl.* 1981;2(8246):569–572.
38. Gagnum V, Stene LC, Jenssen TG, Berteussen LM, Sandvik L, Joner G, Njølstad PR, Skriverhaug T. Causes of death in childhood-onset Type 1 diabetes: long-term follow-up. *Diabet. Med. J. Br. Diabet. Assoc.* 2017;34(1):56–63.
39. Attwell D, Laughlin SB. An energy budget for signaling in the grey matter of the

- brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 2001;21(10):1133–1145.
40. Simpson IA, Carruthers A, Vannucci SJ. Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 2007;27(11):1766–1791.
41. Simpson IA, Appel NM, Hokari M, Oki J, Holman GD, Maher F, Koehler-Stec EM, Vannucci SJ, Smith QR. Blood-brain barrier glucose transporter: effects of hypo- and hyperglycemia revisited. *J. Neurochem.* 1999;72(1):238–247.
42. Rooijackers HMM, Wiegers EC, Tack CJ, van der Graaf M, de Galan BE. Brain glucose metabolism during hypoglycemia in type 1 diabetes: insights from functional and metabolic neuroimaging studies. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 2016;73(4):705–722.
43. Mccrimmon R. Update in the CNS Response to Hypoglycemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2012;97:1–8.
44. Stanley S, Moheet A, Seaquist ER. Central Mechanisms of Glucose Sensing and Counterregulation in Defense of Hypoglycemia. *Endocr. Rev.* 2019;40(3):768–788.
45. McCrimmon RJ. Consequences of recurrent hypoglycaemia on brain function in diabetes. *Diabetologia* 2021;64(5):971–977.
46. Sherwin RS. Bringing Light to the Dark Side of Insulin. *Diabetes* 2008;57(9):2259–2268.
47. Kang L, Sanders NM, Dunn-Meynell AA, Gaspers LD, Routh VH, Thomas AP, Levin BE. Prior hypoglycemia enhances glucose responsiveness in some ventromedial hypothalamic glucosensing neurons. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2008;294(3):R784-792.
48. Chan O, Paranjape S, Czyzyk D, Horblitt A, Zhu W, Ding Y, Fan X, Seashore M, Sherwin R. Increased GABAergic output in the ventromedial hypothalamus contributes to impaired hypoglycemic counterregulation in diabetic rats. *Diabetes* 2011;60(5):1582–1589.
49. Lawrence RD. INSULIN HYPOGLYCÆMIA CHANGES IN NERVOUS MANIFESTATIONS. *The Lancet* 1941;238(6168):602.
50. Auer RN, Olsson Y, Siesjö BK. Hypoglycemic brain injury in the rat. Correlation of density of brain damage with the EEG isoelectric time: a quantitative study. *Diabetes* 1984;33(11):1090–1098.
51. Kalimo H, Olsson Y. Effects of severe hypoglycemia on the human brain neuropathological case reports. *Acta Neurol. Scand.* 1980;62(6):345–356.
52. Languren G, Montiel T, Julio-Amilpas A, Massieu L. *Neuronal damage and cognitive impairment associated with hypoglycemia: An integrated view.* Elsevier Ltd; 2013. doi:10.1016/j.neuint.2013.06.018.
53. Ustárroz JT. NEUROPSICOLOGÍA - NEUROCIENCIA Y LAS CIENCIAS “PSI.” 5:15.
54. Assessing Cognitive Function: A Guide to Neuropsychological Testing - Bondy - 1994 - Rehabilitation Nursing - Wiley Online Library. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/j.2048-7940.1994.tb01299.x>. Accessed September 14, 2021.
55. Harvey PD. Domains of cognition and their assessment. *Dialogues Clin.*

Neurosci. 2019;21(3):227–237.

56. 9780195030396: Neuropsychological Assessment (Oxford Medicine Publications) - IberLibro - Lezak, Muriel Deutsch: 0195030397. Available at: <https://www.iberlibro.com/9780195030396/Neuropsychological-Assessment-Oxford-Medicine-Publications-0195030397/plp>. Accessed September 8, 2021.

57. Sohlberg MM, Mateer CA. Effectiveness of an attention-training program. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* 1987;9(2):117–130.

58. Sampedro MJ, Blanco M. SALIENCIA PERCEPTIVA Y ATENCION. :13.

59. Ardila A, Ostrosky F. GUÍA PARA EL DIAGNÓSTICO NEUROPSICOLÓGICO. :400.

60. Rajmohan V, Mohandas E. The limbic system. *Indian J. Psychiatry* 2007;49(2):132–139.

61. Mejía DIL, de Yahya AV. El Sistema Límbico y las Emociones: Empatía en Humanos y Primates. :11.

62. Albert: Geriatric neuropsychology. - Google Académico. Available at: https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Geriatric%20neuropsychology&publication_year=1988. Accessed September 8, 2021.

63. Benarroch EE. Insular cortex: Functional complexity and clinical correlations. *Neurology* 2019;93(21):932–938.

64. (Bud) Craig, D A. How do you feel — now? The anterior insula and human awareness. *Nat. Rev. Neurosci.* 2009;10(1):59–70.

65. Critchley HD. Neural mechanisms of autonomic, affective, and cognitive integration. *J. Comp. Neurol.* 2005;493(1):154–166.

66. Seeley WW, Menon V, Schatzberg AF, Keller J, Glover GH, Kenna H, Reiss AL, Greicius MD. Dissociable Intrinsic Connectivity Networks for Salience Processing and Executive Control. *J. Neurosci.* 2007;27(9):2349–2356.

67. Folstein MF, Robins LN, Helzer JE. The Mini-Mental State Examination. *Arch. Gen. Psychiatry* 1983;40(7):812.

68. Morris JC, Heyman A, Mohs RC, Hughes JP, van Belle G, Fillenbaum G, Mellits ED, Clark C. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part I. Clinical and neuropsychological assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 1989;39(9):1159–1165.

69. Crowe SF. The differential contribution of mental tracking, cognitive flexibility, visual search, and motor speed to performance on parts A and B of the Trail Making Test. *J. Clin. Psychol.* 1998;54(5):585–591.

70. Lansing AE, Ivnik RJ, Cullum CM, Randolph C. An empirically derived short form of the Boston naming test. *Arch. Clin. Neuropsychol. Off. J. Natl. Acad. Neuropsychol.* 1999;14(6):481–487.

71. FDA-NIH Biomarker Working Group. *BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource*. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US); 2016. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326791/>. Accessed October 10, 2021.

72. Parra-Bolaños N. Impacto de las técnicas de neuroimagen en las ciencias sociales. 2015:8.

73. Patterson C, Frederick CB, Yuan H, Dyer LA, Lockyer P, Lalush DS, Veleva AN. Development of a New Positron Emission Tomography Tracer for Targeting Tumor Angiogenesis: Synthesis, Small Animal Imaging, and Radiation Dosimetry. *Molecules* 2013;18(5):5594–5610.
74. Motter: Reduction of β -amyloid peptide42 in the... - Google Académico. [ournal=Ann%20Neurol.&volume=38&pages=643-648](#). Accessed October 9, 2021.
75. Ouwens DM, van Duinkerken E, Schoonenboom SNM, Herzfeld de Wiza D, Klein M, van Golen L, Pouwels PJW, Barkhof F, Moll AC, Snoek FJ, Teunissen CE, Scheltens P, Diamant M. Cerebrospinal fluid levels of Alzheimer's disease biomarkers in middle-aged patients with type 1 diabetes. *Diabetologia* 2014;57(10):2208–2214.
76. Blennow K. A Review of Fluid Biomarkers for Alzheimer's Disease: Moving from CSF to Blood. *Neurol. Ther.* 2017;6(Suppl 1):15–24.
77. Andreasson U, Blennow K, Zetterberg H. Update on ultrasensitive technologies to facilitate research on blood biomarkers for central nervous system disorders. *Alzheimers Dement. Diagn. Assess. Dis. Monit.* 2016;3:98–102.
78. Verde F, Otto M, Silani V. Neurofilament Light Chain as Biomarker for Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia. *Front. Neurosci.* 2021;15:679199.
79. Delaby C, Alcolea D, Carmona-Iragui M, Illán-Gala I, Morenas-Rodríguez E, Barroeta I, Altuna M, Estellés T, Santos-Santos M, Turon-Sans J, Muñoz L, Ribosa-Nogué R, Sala-Matavera I, Sánchez-Saudinos B, Subirana A, Videla L, Benejam B, Sirisi S, Lehmann S, Belbin O, Clarimon J, Blesa R, Pagonabarraga J, Rojas-Garcia R, Fortea J, Lleó A. Differential levels of Neurofilament Light protein in cerebrospinal fluid in patients with a wide range of neurodegenerative disorders. *Sci. Rep.* 2020;10:9161.
80. Ramos-Argüelles F, Morales G, Egozcue S, Pabón RM, Alonso MT. Técnicas básicas de electroencefalografía: principios y aplicaciones clínicas. *An. Sist. Sanit. Navar.* 2009;32:69–82.
81. Handy TC, ed. *Event-Related Potentials: A Methods Handbook*. Cambridge, MA, USA: A Bradford Book; 2004.
82. Escera C, Alho K, Schröger E, Winkler IW. Involuntary Attention and Distractibility as Evaluated with Event-Related Brain Potentials. *Audiol. Neurotol.* 2000;5(3–4):151–166.
83. Friedman D, Cycowicz YM, Gaeta H. The novelty P3: an event-related brain potential (ERP) sign of the brain's evaluation of novelty. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2001;25(4):355–373.
84. Hedges D, Janis R, Mickelson S, Keith C, Bennett D, Brown BL. P300 Amplitude in Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis and Meta-Regression. *Clin. EEG Neurosci.* 2016;47(1):48–55.
85. Tegelbeckers J, Bunzeck N, Duzel E, Bonath B, Flechtner H-H, Krauel K. Altered salience processing in attention deficit hyperactivity disorder. *Hum. Brain Mapp.* 2015;36(6):2049–2060.
86. Polich J. Updating P300: An integrative theory of P3a and P3b. *Clin. Neurophysiol.* 2007;118(10):2128–2148.
87. Solbakk A-K, Reinvang I, Andersson S. Assessment of P3a and P3b after

- moderate to severe brain injury. *Clin. EEG Electroencephalogr.* 2002;33(3):102–110.
88. Papaliagkas V, Kimiskidis V, Tsolaki M, Anagianakis G. Usefulness of event-related potentials in the assessment of mild cognitive impairment. *BMC Neurosci.* 2008;9:107.
 89. Petersen RC, Lopez O, Armstrong MJ, Getchius TSD, Ganguli M, Gloss D, Gronseth GS, Marson D, Pringsheim T, Day GS, Sager M, Stevens J, Rae-Grant A. Practice guideline update summary: Mild cognitive impairment. *Neurology* 2018;90(3):126–135.
 90. Montenegro Peña M, Montejo Carrasco P, Llanero Luque M, Reinoso García AI. Evaluación y diagnóstico del deterioro cognitivo leve. *Rev. Logop. Foniatría Audiol.* 2012;32(2):47–56.
 91. Brands AMA, Biessels GJ, De Haan EHF, Kappelle LJ, Kessels RPC. *The effects of type 1 diabetes on cognitive performance: A meta-analysis.*; 2005. doi:10.2337/diacare.28.3.726.
 92. Tonoli C, Heyman E, Roelands B, Pattyn N, Buyse L, Piacentini MF, Berthoin S, Meeusen R. Type 1 diabetes-associated cognitive decline: A meta-analysis and update of the current literature. *J. Diabetes* 2014;6(6):499–513.
 93. Nunley KA, Rosano C, Ryan CM, Jennings JR, Aizenstein HJ, Zgibor JC, Costacou T, Boudreau RM, Miller R, Orchard TJ, Saxton JA. Clinically relevant cognitive impairment in Middle-Aged adults with childhood-onset type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2015;38(9):1768–1776.
 94. Shalimova A, Graff B, Gasecki D, Wolf J, Sabisz A, Szurowska E, Jodzio K, Narkiewicz K. Cognitive dysfunction in type 1 diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2019;104(6):2239–2249.
 95. Jacobson AM, Ryan CM, Braffett BH, Gubitosi-Klug RA, Lorenzi GM, Luchsinger JA, Trapani VR, Bebu I, Chaytor N, Hitt SM, Farrell K, Lachin JM. Cognitive performance declines in older adults with type 1 diabetes: results from 32 years of follow-up in the DCCT and EDIC Study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2021;9(7):436–445.
 96. Langan SJ, Deary IJ, Hepburn DA, Frier BM. Cumulative cognitive impairment following recurrent severe hypoglycaemia in adult patients with insulin-treated diabetes mellitus. *Diabetologia* 1991;34(5):337–344.
 97. Lacy ME, Gilsanz P, Eng C, Beeri MS, Karter AJ, Whitmer RA. Severe hypoglycemia and cognitive function in older adults with type 1 diabetes: The Study of Longevity in Diabetes (SOLID). *Diabetes Care* 2020;43(3):541–548.
 98. Van Duinkerken E, Brands AMA, Van Den Berg E, Henselmans JML, Hoogma RPLM, Biessels GJ. *Cognition in older patients with type 1 diabetes mellitus: A longitudinal study.*; 2011. doi:10.1111/j.1532-5415.2010.03292.x.
 99. Wredling R, Levander S, Adamson U, Lins PE. Permanent neuropsychological impairment after recurrent episodes of severe hypoglycaemia in man. *Diabetologia* 1990;33(3):152–157.
 100. Rama Chandran S, Jacob P, Choudhary P. A systematic review of the effect of prior hypoglycaemia on cognitive function in type 1 diabetes. *Ther. Adv. Endocrinol. Metab.* 2020;11:2042018820906017.
 101. Jacobson AM, Musen G, Ryan CM, Silvers N, Cleary P, Waberski B, Burwood

- A, Weinger K, Bayless M, Dahms W, Harth J. Long-Term Effect of Diabetes and Its Treatment on Cognitive Function. *N. Engl. J. Med.* 2007;356(18):1842–1852.
102. Reichard P, Pihl M, Rosenqvist U, Sule J. Complications in IDDM are caused by elevated blood glucose level: the Stockholm Diabetes Intervention Study (SDIS) at 10-year follow up. *Diabetologia* 1996;39(12):1483–1488.
103. Salem MAK, Matta LF, Tantawy AAG, Hussein M, Gad GI. Single photon emission tomography (SPECT) study of regional cerebral blood flow in normoalbuminuric children and adolescents with type 1 diabetes. *Pediatr. Diabetes* 2002;3(3):155–162.
104. McCrimmon RJ, Ryan CM, Frier BM. Diabetes and cognitive dysfunction. *The Lancet* 2012;379(9833):2291–2299.
105. Teves D, Videen TO, Cryer PE, Powers WJ. Activation of human medial prefrontal cortex during autonomic responses to hypoglycemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004;101(16):6217–6221.
106. Musen G, Simonson DC, Bolo NR, Driscoll A, Weinger K, Raji A, Théberge J, Renshaw PF, Jacobson AM. Regional brain activation during hypoglycemia in type 1 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008;93(4):1450–1457.
107. Page KA, Arora J, Qiu M, Relwani R, Constable RT, Sherwin RS. Small decrements in systemic glucose provoke increases in hypothalamic blood flow prior to the release of counterregulatory hormones. *Diabetes* 2009;58(2):448–452.
108. Teh MM, Dunn JT, Choudhary P, Samarasinghe Y, Macdonald I, O’Doherty M, Marsden P, Reed LJ, Amiel SA. Evolution and resolution of human brain perfusion responses to the stress of induced hypoglycemia. *NeuroImage* 2010;53(2):584–592.
109. Nunley KA, Ryan CM, Orchard TJ, Aizenstein HJ, Jennings JR, Ryan J, Zgibor JC, Boudreau RM, Costacou T, Maynard JD, Miller RG, Rosano C. White matter hyperintensities in middle-aged adults with childhood-onset type 1 diabetes. *Neurology* 2015;84(20):2062–2069.
110. Yousem DM, Tasman WS, Grossman RI. Proliferative retinopathy: absence of white matter lesions at MR imaging. *Radiology* 1991;179(1):229–230.
111. Lunetta M, Damanti AR, Fabbri G, Lombardo M, Di Mauro M, Mughini L. Evidence by magnetic resonance imaging of cerebral alterations of atrophy type in young insulin-dependent diabetic patients. *J. Endocrinol. Invest.* 1994;17(4):241–245.
112. Musen G, Lyoo IK, Sparks CR, Weinger K, Hwang J, Ryan CM, Jimerson DC, Hennen J, Renshaw PF, Jacobson AM. *Effects of Type 1 Diabetes on Gray Matter Density as Measured by Voxel-Based Morphometry.*; 2006.
113. Hughes TM, Ryan CM, Aizenstein HJ, Nunley K, Gianaros PJ, Miller R, Costacou T, Strotmeyer ES, Orchard TJ, Rosano C. Frontal gray matter atrophy in middle aged adults with type 1 diabetes is independent of cardiovascular risk factors and diabetes complications. *J. Diabetes Complications* 2013;27(6):558–564.
114. Filip P, Canna A, Moheet A, Bednarik P, Grohn H, Li X, Kumar AF, Olawsky E, Eberly LE, Seaquist ER, Mangia S. Structural Alterations in Deep Brain Structures in Type 1 Diabetes. *Diabetes* 2020. doi:10.2337/db19-1100.
115. Perros P, Deary IJ, Sellar RJ, Best JJK, Frier BM. Brain abnormalities demonstrated by magnetic resonance imaging in adult IDDM patients with and without a

- history of recurrent severe hypoglycemia. *Diabetes Care* 1997;20(6):1013–1018.
116. Shehata G, Eltayeb A. Cognitive function and event-related potentials in children with type 1 diabetes mellitus. *J. Child Neurol.* 2010;25(4):469–474.
117. Uberall MA, Renner C, Edl S, Parzinger E, Wenzel D. VEP and ERP abnormalities in children and adolescents with prepubertal onset of insulin-dependent diabetes mellitus. *Neuropediatrics* 1996;27(2):88–93.
118. Vitvarová T, Neumann D, Šimáková R, Kremláček J. Neurophysiological Evidence for a Compensatory Activity during a Simple Oddball Task in Adolescents with Type 1 Diabetes Mellitus. *J. Diabetes Res.* 2018;2018. doi:10.1155/2018/8105407.
119. Cryer PE. Diverse causes of hypoglycemia-associated autonomic failure in diabetes. *N. Engl. J. Med.* 2004;350(22):2272-2279+2322.
120. Amiel SA, Sherwin RS, Simonson DC, Tamborlane WV. Effect of Intensive Insulin Therapy on Glycemic Thresholds for Counterregulatory Hormone Release. *Diabetes* 1988;37(7):901–907.
121. Gold AE, Macleod KM, Frier BM. Frequency of Severe Hypoglycemia in Patients With Type I Diabetes With Impaired Awareness of Hypoglycemia. *Diabetes Care* 1994;17(7):697–703.
122. Clarke WL, Cox DJ, Gonder-Frederick LA, Julian D, Schlundt D, Polonsky W. Reduced awareness of hypoglycemia in adults with IDDM: A prospective study of hypoglycemic frequency and associated symptoms. *Diabetes Care* 1995;18(4):517–522.
123. Pedersen-Bjergaard U, Agerholm-Larsen B, Pramming S, Hougaard P, Thorsteinsson B. Activity of angiotensin-converting enzyme and risk of severe hypoglycaemia in type 1 diabetes mellitus. *Lancet Lond. Engl.* 2001;357(9264):1248–1253.
124. Geddes J, Wright RJ, Zammitt NN, Deary IJ, Frier BM. An Evaluation of Methods of Assessing Impaired Awareness of Hypoglycemia in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* 2007;30(7):1868–1870.
125. Ghandi K, Pieri B, Dornhorst A, Hussain S. A Comparison of Validated Methods Used to Assess Impaired Awareness of Hypoglycaemia in Type 1 Diabetes: An Observational Study. *Diabetes Ther.* 2021;12(1):441–451.
126. Jansà M, Quirós C, Giménez M, Vidal M, Galindo M, Conget I. Análisis psicométrico de las versiones en lengua castellana y catalana de un cuestionario de percepción de la hipoglucemia. *Med. Clínica* 2015;144(10):440–444.
127. Hansen TI, Olsen SE, Hafnerstrom ECD, Sand T, Frier BM, Haaaberg AK, Bjørgaas MR. Cognitive deficits associated with impaired awareness of hypoglycaemia in type 1 diabetes. *Diabetologia* 2017;60(6):971–979.
128. Mangia S, Tesfaye N, De Martino F, Kumar AF, Kollasch P, Moheet AA, Eberly LE, Seaquist ER. Hypoglycemia-induced increases in thalamic cerebral blood flow are blunted in subjects with type 1 diabetes and hypoglycemia unawareness. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2012;32(11):2084–2090.
129. Wieggers EC, Becker KM, Rooijackers HM, von Samson-Himmelstjerna FC, Tack CJ, Heerschap A, de Galan BE, van der Graaf M. Cerebral blood flow response to hypoglycemia is altered in patients with type 1 diabetes and impaired awareness of hypoglycemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2017;37(6):1994–2001.


130. Hwang JJ, Parikh L, Lacadie C, Seo D, Lam W, Hamza M, Schmidt C, Dai F, Sejling AS, Belfort-Deaguiar R, Constable RT, Sinha R, Sherwin R. Hypoglycemia unawareness in type 1 diabetes suppresses brain responses to hypoglycemia. *J. Clin. Invest.* 2018;128(4):1485–1495.
131. Nwokolo M, Amiel SA, O'Daly O, Byrne ML, Wilson BM, Pernet A, Cordon SM, Macdonald IA, Zelaya FO, Choudhary P. Impaired Awareness of Hypoglycemia Disrupts Blood Flow to Brain Regions Involved in Arousal and Decision Making in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* 2019;42(November):dc190337.
132. Nwokolo M, Amiel SA, O'Daly O, Macdonald IA, Zelaya FO, Choudhary P. Restoration of Hypoglycemia Awareness Alters Brain Activity in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* 2021;44(2):533–540.
133. Dunn JT, Choudhary P, Teh MM, Macdonald I, Hunt KF, Marsden PK, Amiel SA. The impact of hypoglycaemia awareness status on regional brain responses to acute hypoglycaemia in men with type 1 diabetes. doi:10.1007/s00125-018-4622-2.
134. Bednarik P, Moheet AA, Grohn H, Kumar AF, Eberly LE, Seaquist ER, Mangia S. Type 1 diabetes and impaired awareness of hypoglycemia are associated with reduced brain gray matter volumes. *Front. Neurosci.* 2017;11(SEP):1–8.
135. Miller RG, Secrest AM, Sharma RK, Songer TJ, Orchard TJ. Improvements in the life expectancy of type 1 diabetes: The pittsburgh epidemiology of diabetes complications study cohort. *Diabetes* 2012;61(11):2987–2992.
136. Mitchell AJ. A meta-analysis of the accuracy of the mini-mental state examination in the detection of dementia and mild cognitive impairment. *J. Psychiatr. Res.* 2009;43(4):411–431.
137. Sachon C, Grimaldi A, Digy JP, Pillon B, Dubois B, Thervet F. Cognitive function, insulin-dependent diabetes and hypoglycaemia. *J. Intern. Med.* 1992;231(5):471–475.
138. Bortolotti S, Zarantonello L, Uliana A, Vitturi N, Schiff S, Bisiacchi P, Avogaro A, Amodio P, Maran A. Impaired cognitive processing speed in type 1 diabetic patients who had severe/recurrent hypoglycaemia. *J. Diabetes Complications* 2018;32(11):1040–1045.
139. Brain glucose concentrations in healthy humans subjected to recurrent hypoglycemia - Criego - 2005 - Journal of Neuroscience Research - Wiley Online Library. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jnr.20654>. Accessed October 3, 2021.

10. ANEXOS

10.1 Anexo 1

Increased plasma neurofilament light chain levels in patients with type-1 diabetes with impaired awareness of hypoglycemia. *BMJ Open Diabetes Res. Care.*2020;8(1):e001516. Sampedro F, Stantonyonge N, Martínez-Horta S, Alcolea D, Lleó A, Muñoz L, Pérez-González R, Marín-Lahoz J, Gómez-Ansón B, Chico A.

Increased plasma neurofilament light chain levels in patients with type-1 diabetes with impaired awareness of hypoglycemia

Frederic Sampedro,¹ Nicole Stantonoyonge,^{2,3} Saül Martínez-Horta,¹ Daniel Alcolea,¹ Alberto Lleó,¹ Laia Muñoz,¹ Rocío Pérez-González,¹ Juan Marín-Lahoz,¹ Beatriz Gómez-Ansón,⁴ Ana Chico ²

To cite: Sampedro F, Stantonoyonge N, Martínez-Horta S, *et al*. Increased plasma neurofilament light chain levels in patients with type-1 diabetes with impaired awareness of hypoglycemia. *BMJ Open Diab Res Care* 2020;**8**:e001516. doi:10.1136/bmjdr-2020-001516

FS and NS contributed equally.

Received 4 May 2020
Revised 23 May 2020
Accepted 30 May 2020



© Author(s) (or their employer(s)) 2020. Re-use permitted under CC BY-NC. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

¹Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

²Endocrinology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

³School of Medicine, Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Catalunya, Spain

⁴Neuroradiology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

Correspondence to
Dr Ana Chico;
achicob@santpau.cat

ABSTRACT

Introduction Impaired awareness of hypoglycemia (IAH) is a common complication in patients with type-1 diabetes (T1D). IAH is a major risk factor for severe hypoglycemic events, leading to adverse clinical consequences and cerebral damage. Non-invasive, cost-effective, and logistically efficient biomarkers for this condition have not been validated. Here, we propose plasma neurofilament light chain (NfL) levels as a biomarker of neuroaxonal damage in patients with T1D-IAH.

Research design and methods 54 patients were included into the study (18 T1D-IAH, 18 T1D with normal awareness of hypoglycemia (NAH) and 18 healthy controls). We measured plasma NfL levels and studied cerebral gray matter alterations on MRI.

Results We found that NfL levels were increased in patients with T1D-IAH compared with patients with T1D-NAH and healthy controls. Importantly, increased NfL levels correlated with reduced cerebral gray matter volume and increased IAH severity in patients with T1D-IAH.

Conclusion Overall, our findings identify plasma NfL levels as a potential biomarker of cerebral damage in this population, motivating further confirmatory studies with potential implications in clinical trials.

INTRODUCTION

About one in five patients with type 1 diabetes (T1D) have impaired awareness of hypoglycemia (IAH).¹ IAH represents a risk factor for severe and recurrent hypoglycemic events, which can lead to brain damage.^{2,3} As no effective treatment has been clearly established,⁴ biomarkers capable of detecting and quantifying cerebral damage in this population are needed for the design of novel preventive or therapeutic strategies.

On the one hand, cerebral atrophy or functional impairment can be assessed using neuroimaging techniques. In fact, a structural and functional brain compromise has been described in patients with T1D-IAH.⁵ However, neuroimaging techniques have important limitations in terms of specificity,

Significance of this study

What is already known about this subject?

- ▶ Patients with type 1 diabetes (T1D) with impaired awareness of hypoglycemia (IAH) are in higher risk of severe hypoglycemia (SH).
- ▶ SH is associated with adverse clinical consequences and cerebral damage.
- ▶ There is no validated biomarker for this subgroup of patients.

What are the new findings?

- ▶ Plasma neurofilament light chain (NfL) levels were increased in patients with T1D-IAH compared to patients with T1D with normal awareness of hypoglycemia and healthy controls.
- ▶ Increased NfL levels correlated with reduced cerebral gray matter volume and increased IAH severity in patients with T1D-IAH.

How might these results change the focus of research or clinical practice?

- ▶ Plasma NfL levels could be used as a non-invasive, cost-effective, and logistically efficient biomarker of neuroaxonal damage in patients with T1D-IAH.

logistics, standardization, scalability, and cost-efficiency. On the other hand, while cerebrospinal fluid biomarkers of cerebral damage overcome some of these limitations, they require an invasive lumbar puncture procedure.

In recent years, research has focused on the detection of blood biomarkers of neural damage. Clearly, cost-efficient blood biomarkers would represent an accessible and centralizable alternative. However, the main challenge for the development of an adequate technology in this context has been the low blood concentration of proteins derived from the central nervous system (CNS). Importantly, in the last few years, the

Single Molecule Array (Simoa) technology has shown unprecedented precision and sensitivity (ie, femtomolar range) for the quantification of blood biomarkers of brain damage.⁶ In particular, increased levels of neurofilament light chain (NfL) in blood have shown a great potential for the detection of neurodegeneration (neuronal loss and axonal damage), traumatic brain injury, and cerebrovascular accidents.⁷

In this brief report, we investigate whether patients with T1D with hypoglycemia unawareness show increased levels of plasma NfL compared with patients with normal awareness of hypoglycemia (NAH) and healthy controls (HC). Additionally, we explore whether abnormally increased NfL levels in this population correlate with IAH severity and reduced cerebral gray matter volume (GMV).

MATERIALS AND METHODS

Sample and assessments

A total of 54 participants were included in this study: 36 patients with T1D and 18 HC. Eighteen patients with T1D fulfilled clinical criteria for IAH (T1D-IAH) and the other 18 patients had NAH (T1D-NAH). Both T1D groups were selected as to have similar sociodemographics and T1D duration. The Clarke score was used for the IAH classification, which is based on eight questions that allow the determination of the glycemic threshold in which the patients notice the hypoglycemic symptoms.⁸ A Clarke score ≥ 4 was used to identify patients with T1D-IAH, whereas patients with T1D-NAH showed a score < 3 . The Clarke method comprises the following set of questions designed to characterize the participant's exposure to hypoglycemia: Do you feel hypoglycemia symptoms when your blood glucose is low?, Have you lost symptoms of hypoglycemia that used to occur when your blood glucose is low?, Check all your symptoms of hypoglycemia over the last 6 months, If your answered 'yes' to any of the above question, how often do you have it?, Check all your symptoms of hypoglycemia over the last 12 months. If your answered 'yes' to any of the above question, how often do you have it? How often did you have an episode of hypoglycemia with symptoms during the last month? How often did you have an episode of hypoglycemia without symptoms during the last month? What was the lowest blood glucose level before feeling the symptoms of hypoglycemia? How often did you have symptoms of hypoglycemia when your blood glucose level was low?

The following exclusion criteria were applied: previous clinical diagnosis of cognitive impairment or neurological disorders, use of medications affecting the CNS, and MRI contraindications or intolerance. None of the participants in this study had any previous medical condition (apart from T1D) known to significantly alter blood NfL levels or cerebral GMV.

Both T1D groups were under similar insulin treatment, either as basal-bolus regimen or continuous subcutaneous insulin infusion (with short-acting insulin

analogs). Sociodemographic, clinical, and laboratory data (diabetes and cardiovascular indicators) were recorded for each patient. Quantification of IAH severity was assessed, on one hand, by Clarke scores. On the other hand, we also recorded the number of severe hypoglycemic episodes during the last 5 years and the number of moderate hypoglycemic events during the last month. A severe hypoglycemic episode associated loss of consciousness, confusion/disorientation, seizures, or coma and required the assistance of a third person. A moderate hypoglycemic event was defined as any non-severe episode requiring the use of measures with impact on the daily life (interrupting work routine, stopping the car while driving, and so on). We combined both indicators to obtain a single indicator of the number of severe or moderate hypoglycemic episodes, providing a representative indicator of the clinical consequences of IAH.

Plasma NfL procedure

Blood was collected in EDTA tubes, centrifuged at 2000 g for 10 min and the plasma aliquoted in polypropylene tubes, and frozen at -80°C according to international consensus recommendations until analysis. Plasma NfL levels were measured with the Simoa Human NF-light Advantage kit using the Single Molecule Array technology (Simoa; Quanterix)⁹ in a SR-X Biomarker detection system by following the manufacturer's instructions.

Neuroimaging acquisition and preprocessing

T1-weighted MRI scans were acquired in a Philips 3-Tesla station using a magnetization-prepared rapid acquisition with gradient echo protocol using the following parameters: flip angle 8° , repetition time 6.7 s, echo time 3.19 ms, pixel bandwidth 241, slice thickness 1.2 mm, and an acquisition matrix of size 256×256 . All patients had available T1-MRI imaging, but nine subjects from the HC group did not have MRI data.

GMVs of the frontal, temporal, parietal, and occipital lobes for each participant were computed using the FreeSurfer 6.0 software package. Details about the standard FreeSurfer segmentation pipeline are available elsewhere (<https://surfer.nmr.mgh.harvard.edu/>). All preprocessed images were visually inspected to confirm the absence of segmentation errors.

Statistical analyses

Clinical, sociodemographics, NfL levels, and imaging data were compared across groups using one-way ANOVA (except χ^2 for sex differences). Pairwise group differences were examined by general linear models including age, sex, education, and T1D duration as covariates of no interest. A logistic regression was also performed. In addition, we explored whether increased plasma NfL levels correlated with increased IAH severity or reduced GMV in patients with T1D. For that, we used one-sided Pearson's correlation coefficients using the same nuisance covariates, for which a $p < 0.05$ was considered significant.

Table 1 Clinical, demographic, biomarker, and imaging information across groups

	T1D-IAH	T1D-NAH	HC	Significance (p value)
n	18	18	18	
Age (years)	55.5±13.5	57.4±8.1	54.7±13.7	0.79
Sex (% female)	61%	27%	44%	0.13
Education (years)	14.8±5.1	14.7±4.4	13.6±3.5	0.64
Plasma NfL (pg/mL)	18.22±11.7	13.27±6.7	8.15±4.6	0.002*
T1D duration	31.7±12.8	30.2±8.6	NA	0.66
HbA1c (%)	7.57±1.1	7.60±0.8	NA	0.93
Body mass index (kg/m ²)	25.9±6.6	27.2±3.8	NA	0.49
Mean arterial pressure (mm Hg)	93.6±15.6	101.8±13.6	NA	0.10
LDL-cholesterol (mg/dL)	96.3±27.4	94.6±21.3	NA	0.84
HDL-cholesterol (mg/dL)	71.4±16.5	63.7±19.1	NA	0.21
Clarke score	4.7±0.9	1.0±0.7	NA	<0.001*
Number of severe or moderate hypoglycemic episodes	4.89±6.3	0.61±1.0	NA	0.007*
Minimetal state examination	29.56±0.6	29.61±0.8	NA	0.81
Frontal lobe GMV (mm ³ ×10 ⁻³)	138.6±9.9	150.3±13.5	165.0±17.6	<0.001*
Temporal lobe GMV (mm ³ ×10 ⁻³)	93.0±7.2	102.3±9.7	100.8±9.6	0.007*
Parietal lobe GMV (mm ³ ×10 ⁻³)	89.6±8.7	97.3±9.4	108.2±8.8	<0.001*
Occipital lobe GMV (mm ³ ×10 ⁻³)	41.7±4.8	48.3±6.8	45.1±6.6	0.008*

Values are expressed as mean±SD or percentage.

*P<0.05 three-group ANOVA/ χ^2 or t-test between T1D groups.

ANOVA, analysis of variance; GMV, gray matter volumes; HC, healthy controls; HDL, high-density lipoprotein; IAH, impaired awareness of hypoglycemia; LDL, low-density lipoprotein; NA, not applicable or available; NAH, normal awareness of hypoglycemia; NfL, neurofilament light chain; T1D, type-1 diabetes.

RESULTS

Table 1 shows the sample characteristics of this study. All groups had similar sociodemographics. There were no significant differences between T1D groups in terms of disease duration, cognitive status, or cardiovascular risk factors. However, as expected, patients with T1D-IAH showed increased Clarke scores and number of severe or moderate hypoglycemic events in the last month, reflecting common clinical consequences of IAH.

Significant differences were found across groups in plasma NfL, progressively increasing from HC to T1D-NAH and T1D-IAH. Pairwise NfL differences between T1D-IAH and T1D-NAH were significant after controlling for age, sex, education, and disease duration ($\beta=0.039$, $p=0.038$). A logistic regression to classify patients with T1D-IAH versus T1D-NAH including all factors listed in **table 1** (except for Clarke scores and number of hypoglycemic episodes) yielded the following results. Significance was only achieved by NfL levels ($p=0.038$), but the following close-to-significance factors were also observed: frontal GMV ($p=0.062$), temporal GMV ($p=0.059$), age ($p=0.066$), sex ($p=0.064$), and body mass index ($p=0.054$). Similarly, progressively decreasing GMV was observed across groups and cerebral lobules, and pairwise differences between T1D-IAH and T1D-NAH remained significant after controlling for the same nuisance covariates.

Finally, the following exploratory associations between increased NfL levels in patients with T1D and IAH severity and reduced cerebral GMV were observed. Within the T1D-IAH group, increased NfL levels correlated with lower frontal GMV ($r=-0.51$, $p=0.030$) and increased number of severe or moderate hypoglycemic events ($r=0.49$, $p=0.038$). When considering all patients with T1D, NfL levels correlated with Clarke scores ($r=0.34$, $p=0.029$) and the number of severe or moderate hypoglycemic events ($r=0.45$, $p=0.005$). Finally, although non-significant, NfL levels showed a mild association with temporal and parietal GMV ($r=-0.28$, $p=0.051$ and $r=-0.21$, $p=0.11$, respectively).

Figure 1 displays NfL differences across groups and a subset of these associations, using in some cases log NfL values to better illustrate group differences or correlations, for which all statistical results remained significant.

DISCUSSION

Our results reinforce the presence of increased brain damage in patients with T1D-IAH. Plasma NfL levels were increased in this population and correlated with reduced cortical gray matter and IAH severity. Therefore, plasma NfL could be a promising cost-efficient biomarker of neural damage in patients with T1D-IAH.

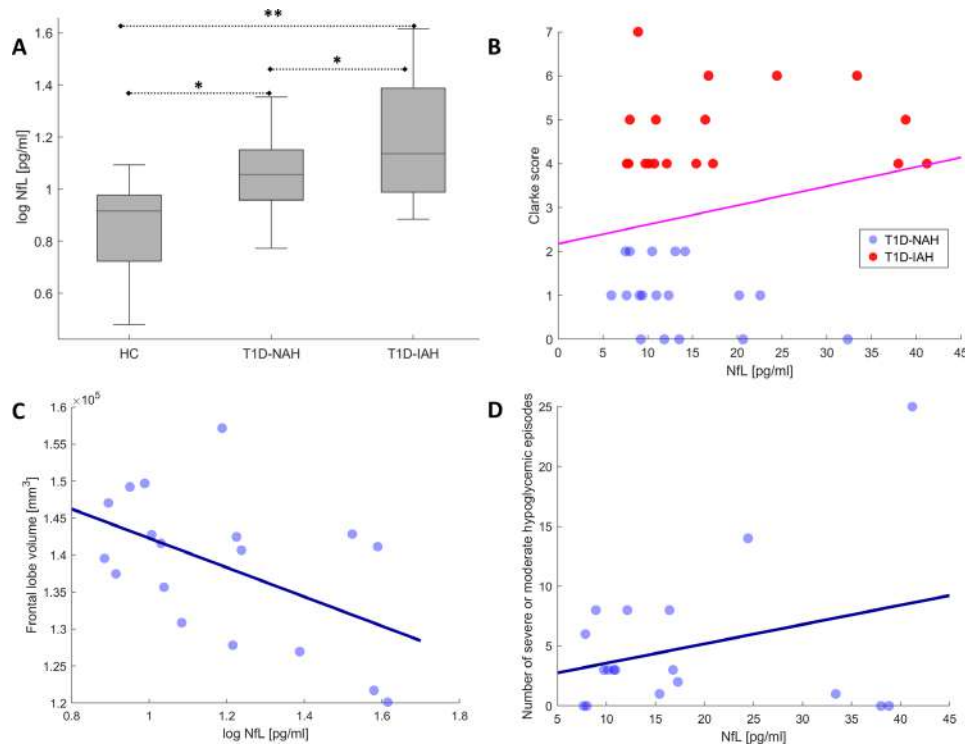


Figure 1 (A) Plasma NfL differences across groups (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$). Scatter plots illustrating a subset of significant associations between NfL levels and (B) Clarke scores in patients with T1D, (C) frontal lobe GMV within the T1D-IAH group, and (D) number of severe or moderate hypoglycemic episodes within the T1D-IAH group. GMV, gray matter volumes; HC, healthy controls; IAH, impaired awareness of hypoglycemia; NAH, normal awareness of hypoglycemia; NfL, neurofilament light chain; T1D, type-1 diabetes.

Patients with T1D-IAH showed reduced cerebral GMV, especially in the frontal lobe. A frontal compromise has been previously described in this population, both in neuroimaging and cognitive studies.^{5 10} Importantly, in patients with T1D-IAH, increased NfL levels correlated with reduced frontal GMV. This association shows that increased NfL levels reflect cerebral damage in this population, reinforcing its role as a potential biomarker. Moreover, increased NfL levels were also associated with increased IAH severity, as measured by Clarke scores and also by the number of severe or moderate hypoglycemic events. This further emphasizes the clinical significance of increased NfL levels in this population, which probably reflect neural damage due to recurrent hypoglycemia.

The main strength of this study is the inclusion of patients with T1D-IAH and T1D-NAH with similar T1D duration and sociodemographic and cardiovascular profiles. This allowed studying the effect of IAH on NfL levels and cerebral GMV with high specificity. Limitations of this work include the use of a relatively low sample size, some missing data in the control group, and the exploratory character of the correlations between NfL levels and IAH severity and GMV within the T1D-IAH group.

To conclude, we found that plasma NfL levels are increased in patients with T1D-IAH, probably reflecting the presence of neuroaxonal damage with clinical consequences. Overall, our findings motivate further confirmatory studies on the potential role of this biomarker in

this population, which could be used to predict IAH or monitor cerebral damage in clinical trials.

Acknowledgements The authors thank Eugenia Mato, CIBER-BBN, Santa Creu i Sant Pau Hospital, for help with the neurofilament processing.

Contributors FS wrote the manuscript and contributed to statistical and image analysis. NS researched data, executed the study, and reviewed the manuscript. SMH reviewed the manuscript. DA, AL, LM, and RPG contributed to NfL processing and reviewed/edited the manuscript. JML reviewed/edited the manuscript. BGA contributed to image analysis and reviewed/edited manuscript. AC researched data and reviewed/edited the manuscript. FS, NS, and AC are the guarantors of this work.

Funding This work was financially supported by a grant from the SPANISH DIABETES SOCIETY.

Competing interests None declared.

Patient consent for publication Not required.

Ethics approval All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards. Ethical approval for this study was obtained from the Ethics Committee of the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (<http://www.recercasantpau.cat/en/clinical-research/ceic/>) on 17 April 2018 at the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain (Code: EC/18/158/5224). All participants provided signed informed consent.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Data availability statement Data are available on reasonable request.

Open access This is an open access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is

properly cited, appropriate credit is given, any changes made indicated, and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

ORCID iD

Ana Chico <http://orcid.org/0000-0001-6498-3411>

REFERENCES

- 1 Geddes J, Schopman JE, Zammit NN, *et al*. Prevalence of impaired awareness of hypoglycaemia in adults with type 1 diabetes. *Diabet Med* 2008;25:501–4.
- 2 Perros P, Deary IJ, Sellar RJ, *et al*. Brain abnormalities demonstrated by magnetic resonance imaging in adult IDDM patients with and without a history of recurrent severe hypoglycemia. *Diabetes Care* 1997;20:1013–8.
- 3 Dave KR, Tamariz J, Desai KM, *et al*. Recurrent hypoglycemia exacerbates cerebral ischemic damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Stroke* 2011;42:1404–11.
- 4 Reddy M, Jugnee N, El Laboudi A, *et al*. A randomized controlled pilot study of continuous glucose monitoring and flash glucose monitoring in people with type 1 diabetes and impaired awareness of hypoglycaemia. *Diabet Med* 2018;35:483–90.
- 5 Bednarik P, Moheet AA, Grohn H, *et al*. Type 1 diabetes and impaired awareness of hypoglycemia are associated with reduced brain gray matter volumes. *Front Neurosci* 2017;11:529.
- 6 Khalil M, Teunissen CE, Otto M, *et al*. Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nat Rev Neurol* 2018;14:577–89.
- 7 Gaetani L, Blennow K, Calabresi P, *et al*. Neurofilament light chain as a biomarker in neurological disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2019;90:870–81.
- 8 Clarke WL, Cox DJ, Gonder-Frederick LA, *et al*. Reduced awareness of hypoglycemia in adults with IDDM. A prospective study of hypoglycemic frequency and associated symptoms. *Diabetes Care* 1995;18:517–22.
- 9 Rissin DM, Kan CW, Campbell TG, *et al*. Single-Molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations. *Nat Biotechnol* 2010;28:595–9.
- 10 Hansen TI, Olsen SE, Haferstrom ECD, *et al*. Cognitive deficits associated with impaired awareness of hypoglycaemia in type 1 diabetes. *Diabetologia* 2017;60:971–9.

10.2 Anexo 2

Increased cerebral FDG-PET uptake in type 1 diabetes patients with impaired awareness of hypoglycaemia. *J. Neuroendocrinol.* 2020. doi:10.1111/jne.12910.
Sampedro F, Stantonyonge N, Martínez-Horta S, Nan N, Camacho V, Chico A

doi:10.1111/jne.12910.

doi:10.1111/jne.12910.

doi:10.1111/jne.12910.

doi:10.1111/jne.12910.

doi:10.1111/jne.12910.

doi:10.1111/jne.12910.

doi:10.1111/jne.12910.

doi:10.1111/jne.12910.