Tesis Doctoral
Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Medicina

Programa de Doctorado
en Medicina Interna
Año 2.014

ESTUDIO DEL PAPEL FISIOPATOLÓGICO DE LA RESISTENCIA A LA INSULINA EN LA CIRROSIS

Tesis realizada en la Unidad de Hemodinámica Hepática,
Hepatología Hospital Clínic i Provincial, Barcelona

Doctorando

EVA ERICE MUÑOZ

Para optar al grado de Doctor
Por la Universitat Autònoma de Barcelona

Directores

Dr.R. Solà Lamoglia

Dr. JC Garcia-Pagán
(y tutor)

Dr. J. Bosch Genover

Quisiera agradecer a toda la Unidad de Hemodinámica Hepática del Hospital Clínic de Barcelona, la oportunidad brindada durante estos años de poder continuar mi formación médica entre excelentes personas y profesionales. El resultado obtenido ha superado mis expectativas, ya que no sólo he sumado desde el punto de vista profesional, sino también desde el personal, experiencia aún más enriquecedora.

Mi gratitud al Dr. Bosch por la confianza brindada y poder haber formado parte de esta Unidad. Al Dr. González-Abraldes y la Dra. Berzigotti por el apoyo recibido. Mi agradecimiento al Dr. Solà por ayudarme a materializar esta etapa de mi formación en la presente Tesis Doctoral.

Mi más profundo reconocimiento al Dr. Garcia-Pagán por su constancia, rigor y sentido crítico en su trabajo diario y que también se ven reflejados en la presente Tesis, por su participación activa como tutor y director.

Sin embargo, la incondicionalidad de los Míos me ha ayudado en esta carrera de fondo a no desvanecer y poder llegar a meta, y por eso os brindo este premio.
Gracias por creer en mí.

Gracias por ayudarme a convertir mi ilusión en realidad.

ÍNDICE Página

I. INTRODUCCIÓN 5

1. DETERIORO VASCULAR EN LA CIRROSIS 5

1.1 Resistencia vascular intrahepática 6

1.1.1 Medición de la hipertensión portal 8

1.2 Resistencia vascular sistémica 11

2.- RESISTENCIA A LA INSULINA 12

2.1 Efectos metabólicos de la resistencia a la insulina 13

2.1.1 Medición de la sensibilidad a la insulina 14

2.2 Efectos vasculares de la resistencia a la insulina 16

2.2.1 Medición de la reactividad vascular 17

3.- RESISTENCIA A LA INSULINA EN LA CIRROSIS 19

3.1 Resistencia hepática a la insulina en la cirrosis 19

3.2 Resistencia sistémica a la insulina en la cirrosis 21

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS GENERALES 22

III. METODOLOGÍA 23

IV. ARTÍCULO 1 25

1. Artículo original publicado 25

2. Justificación y objetivos específicos 34

3. Resultados 35

4. Conclusiones 38

5. Discusión 38

V. ARTÍCULO 2 40

1. Artículo original publicado 40

2. Justificación y objetivos específicos 48

3. Resultados 49

4. Conclusiones 51

5. Discusión 52

VI. DISCUSIÓN GLOBAL 54

VII. CONCLUSIONES GLOBALES 59

VIII. BIBLIOGRAFÍA 60

I. INTRODUCCIÓN

1. DETERIORO VASCULAR EN LA CIRROSIS

Desde el punto de vista fisiopatológico, la cirrosis debería considerarse como una enfermedad sistémica y vascular porque, en el curso natural de una enfermedad hepática crónica, los cambios hemodinámicos, tanto a nivel hepático como sistémico, resultan claves en la aparición de las complicaciones clínicas de la enfermedad (hemorragia digestiva alta por varices, ascitis, peritonitis bacteriana espontánea, encefalopatía hepática o hepatocarcinoma)(1).

Según la ley de Ohm, la diferencia de presión de perfusión de un sistema vascular viene condicionada por dos factores: el flujo sanguíneo (Q) y la resistencia vascular (R) que se enfrenta a este flujo. Esta relación se expresa mediante la ecuación

$$\text{Gradiente de presión} = Q \times R$$

Aplicada al sistema portal, el gradiente de presión o perfusión portal (la diferencia entre la presión portal y la presión de la vena cava inferior) sería igual al producto del flujo sanguíneo portal y la resistencia intrahepática. En la cirrosis, el gradiente de presión portal puede aumentar como consecuencia de un aumento del flujo portal, de la resistencia intrahepática o de una combinación de ambos. Brevemente, el incremento de la resistencia intrahepática al flujo portal entrante se considera el fenómeno inicial para desarrollar hipertensión portal en la cirrosis. Seguidamente, cambios en el territorio esplácnico, secundarios a la vasodilatación arteriolar, y la formación de colaterales portosistémicas (de estas colaterales, las varices esofágicas tienen especial relevancia), que aparecen para

sortear la resistencia que ofrece el hígado, producen un incremento del flujo portal final que mantiene y empeora la presión portal. En el curso de la enfermedad, se desarrolla un síndrome hiperdinámico a nivel sistémico caracterizado por hipervolemia, incremento del índice cardíaco, hipotensión y disminución de las resistencias vasculares mediante la activación de factores neurohumorales predominantemente vasodilatadores. Este estado hiperdinámico participa en el incremento del flujo portal, en la formación de la ascitis, la disfunción renal, así como en los cambios vasculares a nivel de cerebro, pulmón y piel. En el curso de la enfermedad, la presión portal va incrementándose progresivamente con la consiguiente aparición de las complicaciones que empeoran el pronóstico de los pacientes.

En resumen, en la cirrosis se dibujan dos escenarios vasculares opuestos entre sí: el lecho vascular hepático con un incremento de las resistencias y el territorio esplácnico y sistémico donde las resistencias vasculares se encuentran disminuidas.

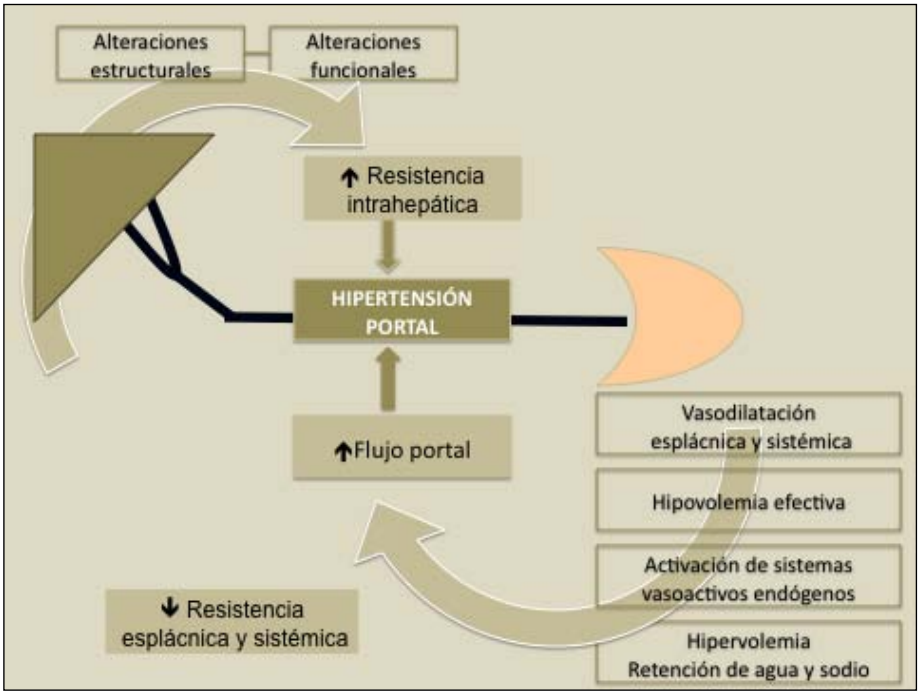

Figura 1.- Factores implicados en la fisiopatología de la hipertensión portal

1.1. **Resistencia vascular intrahepática**

El incremento de la resistencia hepática existente en la cirrosis se debe por un lado a la propia alteración estructural del hígado. En él participan los fenómenos de activación de las células hepáticas estrelladas, defenestración y capilarización de los sinusoides así como los procesos de angiogénesis, inflamación y fibrosis hepáticos. Además, la presencia de disfunción endotelial en el sinusoide hepático juega un papel importante, perpetuando este incremento de resistencias en el interior del hígado y por ende participando en el avance desfavorable de la enfermedad hacia la descompensación hepática.

La resistencia vascular intrahepática es el mecanismo patogénico inicial de la hipertensión portal. En condiciones normales, incrementos del flujo portal que aparecen en diferentes situaciones, como por ejemplo después de la ingesta, producen una respuesta vasodilatadora intrahepática acomodativa, con el fin de evitar un incremento mayor de la presión portal . En la cirrosis hepática esta respuesta acomodativa (complianza) resulta insuficiente debido a una menor biodisponibilidad de óxido nítrico (NO) un potente vasodilatador. Por ello, los incrementos reiterados del flujo portal determinarán un incremento de la presión portal. Esta disfunción se debe fundamentalmente al desequilibrio entre agentes vasodilatadores y vasoconstrictores en el sinusoide hepático. Por un lado, existe un incremento de sustancias como el tromboxano (TxA2) y endotelina (ET-1) que incrementan el tono vascular y por otro un déficit de agentes vasodilatadores, principalmente de óxido nítrico a nivel del endotelio sinusoidal (eNO).

Sin embargo, este déficit de eNO comporta también una pérdida de las propiedades antitrombótica, antiinflamatoria y antiproliferativa del endotelio sinusoidal, empeorando aún más el daño estructural del parénquima hepático. En la cirrosis, este trastorno de la biodisponibilidad se produce por una disminución de la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (eNOS). A pesar de ello, en el cirrótico, los niveles de esta proteína son

normales y el déficit de actividad viene mediado por diferentes alteraciones post-translacionales como son: el incremento de la expresión e interacción con la proteína inhibitoria caveolina, un déficit de cofactores (BH4 o Hsp90) o la presencia de kinasas inhibitorias (ej.GRK-2). Además en la cirrosis existe un consumo acelerado del NO sintetizado por la presencia de estrés oxidativo y radicales libres. Sin embargo y a pesar de estos hechos, continúan buscándose hoy en día otros potenciales mecanismos reguladores responsables de las alteraciones que se producen en la cirrosis.

1.1.1. Medición de la hipertensión portal

La medición del grado de hipertensión portal es una exploración valiosa en la evaluación de una hepatopatía crónica ya que refleja la gravedad de la misma y es una potente herramienta predictiva de descompensación y supervivencia (2). La medición del gradiente de presión venosa hepática (GPVH) es en la actualidad el *gold standard* para evaluar la presencia de hipertensión portal en las hepatopatías crónicas (Figura 2). Esta prueba consiste en medir la presión venosa portal de forma indirecta a nivel sinusoidal determinando el GPVH mediante el cateterismo de las venas suprahepáticas. El acceso a la vena suprahepática se realiza por vía yugular guiado por control ecográfico. Bajo control fluoroscópico se introduce un catéter con un balón en su extremo distal por la vena cava inferior para abordar la vena suprahepática (derecha o media). Cuando se hincha el balón dentro de la vena suprahepática, ésta se ocluye lo que permite obtener el valor de la presión suprahepática enclavada (PSE). La oclusión correcta de la vena se comprueba mediante la inyección lenta de una pequeña cantidad de contraste radiológico (5 mL) y comprobando que no haya escape del contraste a través de colaterales venosas. La presión suprahepática libre (PSL) se obtiene colocando el catéter con el balón deshinchado en la vena suprahepática en su porción más proximal a la vena cava inferior (VCI). El GPVH se calcula como la diferencia entre PSE y PSL. En condiciones normales, este gradiente se

encuentra entre 1-5 mmHg. Se ha confirmado que cuando dicho gradiente se encuentra por encima de 10 mmHg se incrementa el riesgo de aparición de las complicaciones clínicas secundarias a la hipertensión portal (desarrollo de varices esofágicas, encefalopatía hepática, ascitis, peritonitis bacteriana espontánea y hepatocarcinoma). Ello ha determinado que se defina dicho valor (> 10 mm Hg) como "hipertensión portal clínicamente significativa" (HPCS). Así mismo, la HPCS también presenta valor pronóstico en diferentes escenarios: tras un episodio de hemorragia digestiva alta por hipertensión portal (GPVH > 20 mmHg), durante el curso de una hepatitis aguda alcohólica (GPVH ≥ 22 mmHg), pacientes con alguna descompensación previa y un GPVH > 16 mmHg presentan mayor riesgo de estancia hospitalaria, requerimientos transfusionales y mortalidad , riesgo de recurrencia de la infección VHC en el post-trasplante (GPVH > 6 mmHg) o riesgo de descompensación hepática tras cirugía hepática en pacientes con tumores hepáticos resecables (GPVH > 5 mmHg). Además, también se utiliza como herramienta para evaluar la eficacia del tratamiento farmacológico de la hipertensión portal. Un descenso del GPVH a niveles < 12 mmHg o una reducción >10-12% del valor basal tras la administración de propranolol intravenoso previene el primer episodio de hemorragia digestiva por varices o el resangrado en aquellos que ya han presentado un episodio con anterioridad. Sin embargo, este beneficio terapéutico y pronóstico no resulta del todo claro ya que no todos los que no responden al tratamiento acaban presentando un episodio de sangrado y no todos los que presentan esa reducción (excepto aquellos que alcanzan un GPVH < 12 mmHg) están exentos de presentar un episodio de sangrado. Probablemente, existen otros factores como por ejemplo el riesgo de infecciones y el grado de insuficiencia hepatocelular que influyan en el empeoramiento del grado de hipertensión portal.

Figura 2.- Cateterismo de las venas suprahepáticas para la medición del GPVH

A pesar de considerarse una técnica segura, la medición del GPVH, es un método invasivo y no está exento de complicaciones. Mayormente, son leves y están asociadas con el acceso venoso yugular (hematoma, dolor o el síndrome de Horner), con su paso por la aurícula derecha (episodios autolimitados de taquicardia supraventricular) o por alteraciones en la coagulación. Además, es una técnica que exige personal cualificado para obtener unas mediciones fiables y minimizar las posibles complicaciones asociadas y no se encuentra disponible de forma rutinaria en la mayoría de centros hospitalarios.

Por este motivo, se han generado diferentes métodos no invasivos capaces de estimar el grado de hipertensión portal (3). Dado que la historia natural de cualquier hepatopatía crónica sigue la secuencia de inflamación – fibrosis – cirrosis con la presencia de hipertensión portal, se han evaluado diferentes marcadores serológicos de fibrosis hepática como indicadores de hipertensión portal (Fibrotest®) o el tiempo de protrombina. Sin embargo, resultados iniciales no se han confirmado en posteriores estudios y las comparaciones no resultan suficientes como para sustituir el método invasivo. La

elastografía hepática (Fibroscan®) es la única exploración que ha demostrado una buena correlación con el GPVH. De este modo, en pacientes seleccionados con hepatocarcinoma potencialmente resecables, la elastografía hepática puede discriminar aquellos pacientes con elevado riesgo de descompensación tras la cirugía y por tanto de desestimar la opción quirúrgica en su tratamiento. La elastografía presenta el inconveniente de presentar niveles de corte para defininir HPCS muy heterogéneos (entre 13,6 - 34,9 Kpa) en función de la etiología de la cirrosis y la presencia de fenómenos hepáticos inflamatorios. Probablemente, su asociación con otro test como la relación diámetro esplénico/ recuento plaquetario o la elastografía esplénica puedan mejorar la precisión en la evaluación del grado de hipertensión portal. Recientemente, se ha desarrollado el nuevo método ARFI (*Acoustic Radiation Force Impulse Imagin)* con resultados prometedores pero son necesarios más estudios evaluando su nivel de correlación con el GPVH.

1.2 Resistencia vascular sistémica

Como se ha comentado con anterioridad, a nivel del territorio esplácnico y sistémico existe un incremento en la producción de agentes vasodilatadores, como monóxido de carbono, prostaciclinas y principalmente NO, contribuyendo a un mayor estado de vasodilatación. La producción aumentada de NO a nivel del endotelio esplácnico y sistémico se debe a una excesiva producción por parte de la sintasa endotelial (eNOS), como consecuencia de diversos mecanismos como su regulación por la proteína Hsp90 y la sobreexpresión del factor de crecimiento vascular VEGF. Esta hiperactivación endotelial precede al desarrollo del síndrome circulatorio hiperdinámico y puede demostrarse fácilmente mediante el incremento de la respuesta vasodilatadora del flujo de la arteria braquial a la infusión intraarterial de acetilcolina (vasodilatador endotelio dependiente) o la atenuación de la respuesta vasoconstrictora del territorio esplácnico a agentes

vasoconstrictores como la metoxamina. La sobreexpresión de VEGF y de otros factores de crecimiento vascular serán responsables de una angiogénesis aumentada a nivel esplácnico, incremetando el flujo en estos territorios y el estado vasodilatador por sobreactivación de eNOS.

2. RESISTENCIA A LA INSULINA

La resistencia a la insulina (RI) se define de forma global como el incremento de los niveles de insulina para mantener la homeostasis de la glucosa. El clamp hiperinsulinémico-euglucémico es el *gold standard* para evaluar la sensibilidad a la insulina *in vivo*. Sin embargo, se debe puntualizar que el concepto de RI es más amplio e integra los diferentes efectos que se producen a nivel periférico, hepático, vascular y celular (Figura 3).

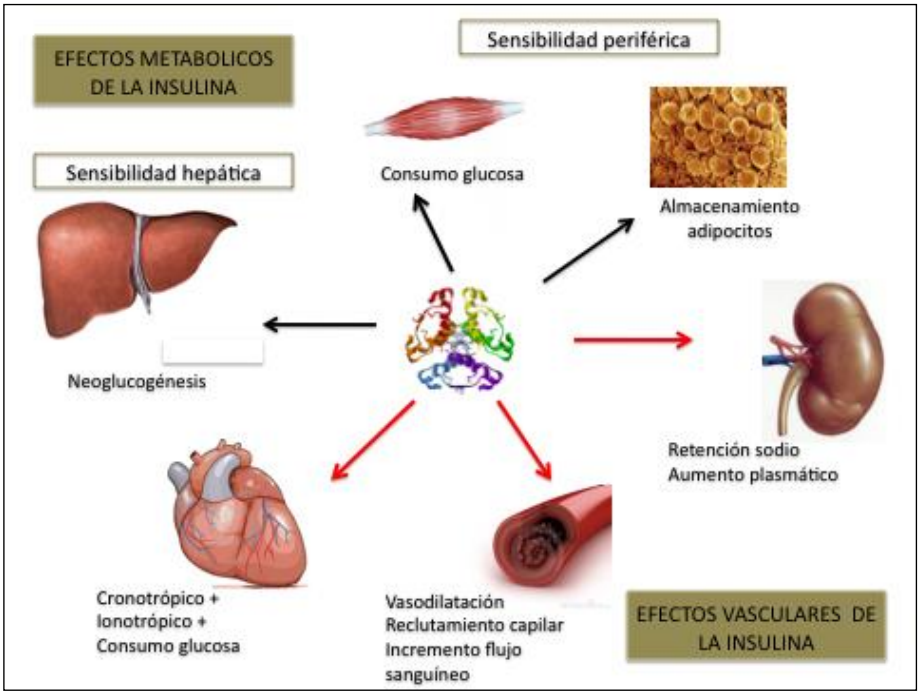

Figura 3.- Efectos metabólicos y vasculares de la insulina.

2.1. Efectos metabólicos de la resistencia a la insulina

En una situación de RI, existe por un lado un defecto en la incorporación de glucosa principalmente en el tejido músculo-esquelético (RI periférica) y por otro un defecto en la supresión de la producción hepática de glucosa (neoglucogénesis), principal proveedor de glucosa a los tejidos (RI hepática). Ambas situaciones evocan en una hiperglucemia con la consiguiente hiperinsulinemia compensatoria para alcanzar una situación de normoglucemia (RI sistémica). Esta situación mantenida en el tiempo producirá un defecto secretor de insulina a partir de la célula pancreática desarrollando finalmente intolerancia a la glucosa y diabetes mellitus.

La insulina activa a través de la fosforilación del receptor de membrana tirosin-quinasa (IRS) tres importantes vías de señalización (Figura 4): a) la vía de señalización PI3k-Akt, b) la vía MAPK y c) la vía de señalización CAP/Cbl/Tc10/ GLUT2/4 controlando no sólo las diferentes acciones para regular la homeostasis de la glucosa sino también participando en diferentes procesos de síntesis proteica, síntesis y almacenamiento de grasas, así como de regulación del ciclo celular. Numerosos estudios, tanto experimentales como en humanos, han demostrado que un defecto a nivel de la fosforilación del receptor IRS es el principal evento que altera la propagación de la señal induciendo resistencia celular a la insulina (RI celular). Los factores que participan son variados y actúan en combinación: la hiperglucemia e hiperinsulinemia mantenidas, la formación de productos glicosilados , el incremento de los ácidos grasos libres y sus metabolitos, el incremento del estrés oxidativo y un defecto en los niveles de adipocitoquinas. Los mecanismos moleculares responsables de la desensibilización de la vía de la insulina también son diversos: mecanismo de retroalimentación o *feedback negativo*, modificaciones translacionales de la actividad de enzimas de la vía de señalización (ej. inhibición de IRS 1/ 2 mediante un mecanismo de serin-fosforilación a partir de la quinasas PKC, JNK1 o IKKβ), producción de proteínas

inhibitorias (ej. SOC que bloquean y degradan IRS 1 /2) y el incremento de actividad de fosfatasas que d efosforilan dife rentes proteínas que p articipan e n la cascada de señalización de la insulina (ej serin fosfatasas y PIP3 fosfatasas).

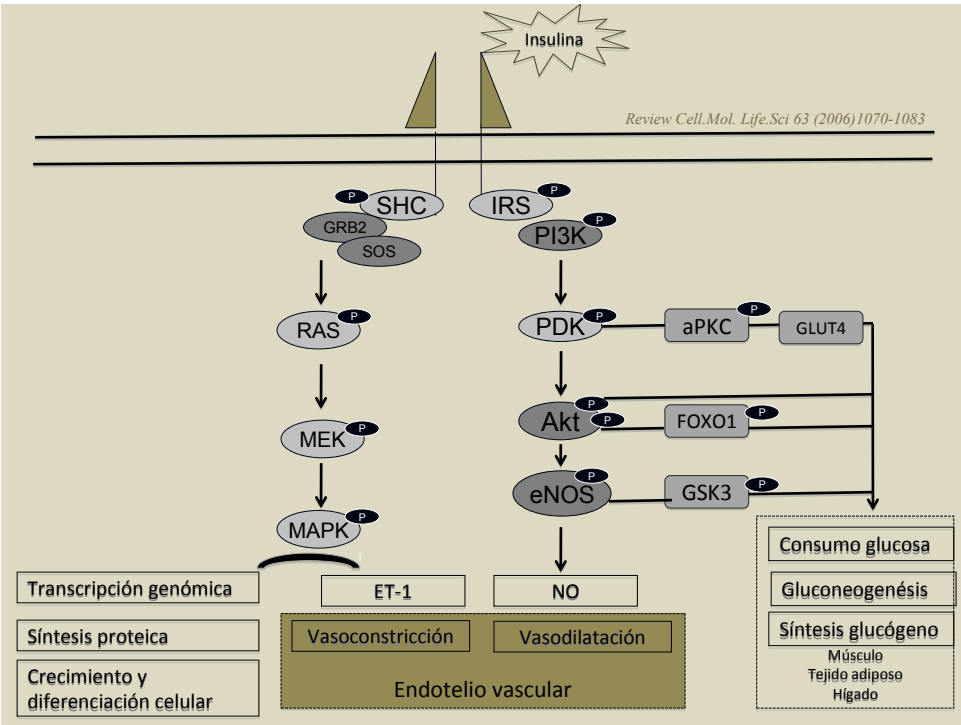

Figura 4.- Vías de señalización y acciones globales de la insulina.

2.1.1. Medición de la sensibilidad a la insulina

El c lamp hiper insulinémico-euglucémico es la técnica po r excelencia p ara obten er una medición exacta y precisa del grado de sensibilidad a la insulina en humanos. Su principal ventaja es que logra obtener una medic ión directa de los niveles de glucosa, e n términos de insulinemia constante durante todo el procedimiento. Bajo estas condiciones, se puede discriminar entre sensibilidad hepática y periférica a la insulina. Sin embargo, presenta los inconvenientes de se r una e xploración larga, c ostosa y que re quiere de pe rsonal cualificado para su realización. Por estos motivos, no es un método apropiado en grandes estudios epidemiológicos, de investi gación o c omo herramienta en la práctica c línica. Además no re fleja la dinámica fisiol ógica de la insul ina y la glucosa tr as una c omida.

Consecuentemente, se han desarrollado métodos indirectos de sensibilidad a la insulina como el test de tolerancia oral a la glucosa, ampliamente utilizado en la práctica clínica para diagnosticar intolerancia a la glucosa o diabetes mellitus y otros índices de fácil aplicación indicadores de sensibilidad y resistencia a la insulina como el índice HOMA o el QUICKI (4).

El índice de HOMA (Homeostasis model assessment) es un modelo matemático que calcula la función de las células beta (%B) y la sensibilidad a la insulina (%S) a partir de la glucemia e insulina plasmáticas (Figura 5). Partiendo de la premisa que la glucemia en ayunas refleja la producción hepática de glucosa y la insulina la respuesta beta-pancreática a esa concentración de glucosa, se construyó un modelo matemático dando lugar a un modelo predictivo de todas las situaciones posibles en el hombre. La resistencia a la insulina se ve reflejada por una disminución del efecto supresor de la insulina sobre la producción hepática de glucosa, que se encuentra elevada y ésta a su vez retroalimenta la producción pancreática de insulina obteniendo finalmente valores desproporcionados de insulina para esa glucemia. En términos prácticos se define como el producto de la glucemia y la insulina en ayunas dividido por una constante

HOMA- IR= ((insulinemia ayunas (uU/ml) x glucemia ayunas (mmol/ l))/ 22,5.

De esta forma para un individuo normal la sensibilidad a la insulina según el índice de HOMA es igual a 1. Valores superiores, indican resistencia a la insulina. Este índice presenta una excelente correlación con el clamp hiperinsulinemico euglucémico. El índice actualizado HOMA-2 sigue la misma ecuación pero se ha recalibrado teniendo en cuenta concentraciones de hasta 25 mM de glucosa (454 mg/ dl), las pérdidas renales de glucosa y la respuesta fisiológica incrementada de insulina para valores de glucosa > 10 mM (181 mg/ dl). Para el cálculo del índice HOMA-2 se puede acceder vía online a su hoja de cálculo de forma rápida y sencilla (http://www.dtu.ox.ac.uk/homacalculator/)

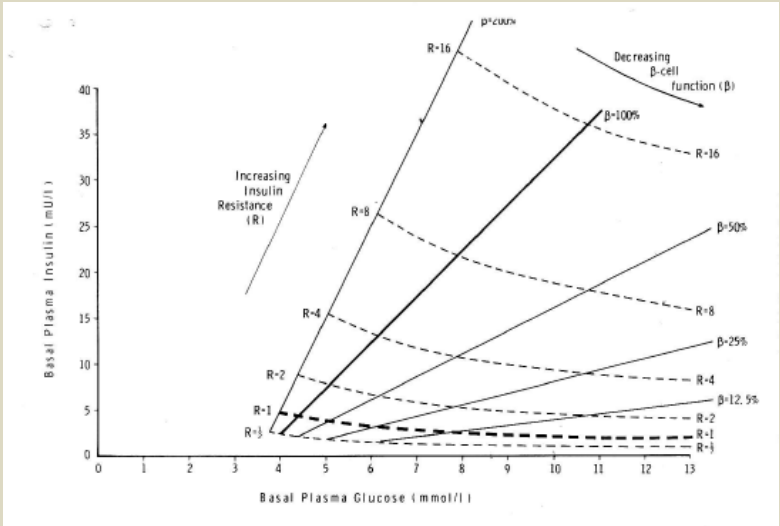

Figura 5.- *Basal homeostasis model assessment (HOMA).* Modelo matemático predictivo en un estado basal de ayuno en el hombre. La línea contínua (___) muestra la relación entre las concentraciones de la glucemia plasmática y las de insulina en función de la actividad de las células beta-pancreáticas. La línea discontínua (-----) muestra valores de insulino resistencia.

2.2. Efectos vasculares de la resistencia a la insulina

La acción de la insulina no sólo responde a los efectos metabólicos hasta ahora descritos, sino también guarda importantes implicaciones vasculares. Estimula la producción de óxido nítrico a nivel del endotelio induciendo vasodilatación, reclutamiento capilar e incrementos del flujo sanguíneo a través de la activación de la vía eNOS PIP3/Akt (Figura 3). En una situación de RI existe una activación defectuosa de esta vía sin alterarse la vía MAPK induciendo un desequilibrio entre agentes vasoconstrictores y vasodilatadores y por ende, un estado basal hiperactivo y una respuesta vasodilatadora inadecuada ante un estímulo vasodilatador (ej. la isquemia). Dicha situación de RI es la antesala para la aparición disfunción endotelial presente en los factores de riesgo cardiovascular, responsables de desarrollar las diversas enfermedades cardiovasculares. De este modo, la

presencia de hipertensión arterial, dislipemia, diabetes mellitus, tabaquismo u obesidad son marcadores de resistencia periférica vascular a la insulina. El índice de Framingham refleja este estado al permitir calcular el riesgo global cardiovascular a 10 años. Se lleva a cabo mediante una ecuación logarítmica que incluye los siguientes factores de riesgo siguientes: edad, colesterol total, colesterol LDL, tensión arterial sistólica, la presencia de tabaquismo y de diabetes. El valor obtenido se categoriza en riesgo bajo si es < 10% y presenta ≤ 1 factor de riesgo, moderado si el valor < 10% y presenta > 1 factor de riesgo, moderadamente alto si el valor 10-20% y elevado riesgo si el riesgo calculado es >20%. También representa este concepto la evaluación de placas de ateroma en ambas arterias carotídeas en su capa íntima mediante ecografía-Doppler, definiéndose como la visualización de intrusiones focales de un grosor ≥ 1.2 mm en el lumen vascular carotídeo.

2.2.1. Medición de la reactividad vascular

La determinación de la respuesta arterial braquial o femoral a un estímulo vasodilatador (DMF) es el método no invasivo de elección para evaluar el estado funcional vascular ya que los resultados obtenidos en el territorio vascular periférico se correlacionan positivamente con los obtenidos en las arterias coronarias (Foto 3). Bajo una situación de reposo y en dieta absoluta, se practica una isquemia de la arteria braquial inflando el manguito o brazalete de un esfingomanómetro en el brazo derecho por debajo de la fosa cubital del antebrazo hasta una presión de 250 mmHg para ocluir la arteria braquial durante 5 minutos. Mientras, se adquiere una grabación continúa de imágenes mediante un transductor lineal de ultrasonidos colocado por encima. A los 5 minutos, se deshincha el manguito continuándose la grabación de los cambios a nivel de la arteria braquial. Mediante un sistema semi-automatizado se digitalizan las imágenes y se obtienen unas imágenes mostrando los diámetros basal y máximo de la arteria braquial. De esta forma se calcula la dilatación mediada por flujo (DMF) calculada según la fórmula:

DMF: ((diámetro máx – diámetro basal) / diámetro basal) x 100.

Una DMF < 10% se considera disfunción endotelial

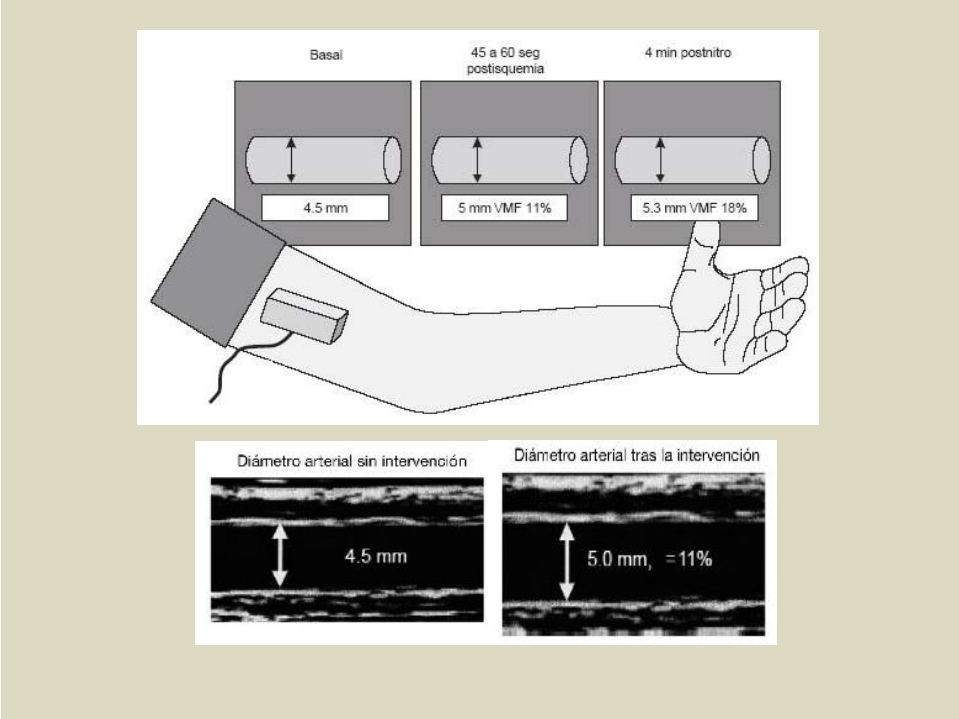

Figura 6.- Esquema que muestra la técnica para la colocación del manguito oclusor y el transductor para la medición de la vasodilatación mediada por flujo en la arteria braquial (DMF)

Varios estudios han demostrado que el grado de dilatación de la arteria braquial mejora si actuamos sobre el factor de riesgo cardiovascular responsable mediante terapia farmacológica. Sin embargo, no se ha podido demostrar una correlación entre dicha mejoría de la función endotelial y la reducción de eventos cardiovasculares. Los escasos estudios realizados hasta el momento presentan resultados opuestos, probablemente porque las cohortes son diferentes y no comparables entre sí (desde pacientes que habían presentado eventos cardiovasculares, pacientes con riesgo cardiovascular elevado o pacientes con un riesgo bajo) (5). Tampoco ha mostrado por el momento tener mayor capacidad en predecir eventos cardiovasculares que la evaluación clínica a partir del índice de Framingham. Por estos motivos, la DMF no puede recomendarse como método de

evaluación del riesgo cardiovascular en la práctica clínica y continua siendo una herramienta utilizada en el campo de la investigación.

3. RESISTENCIA A LA INSULINA EN LA CIRROSIS

3.1. Resistencia hepática a la insulina en la cirrosis

Entrando en mayor detalle sobre los efectos de la insulina a nivel hepático, no sólo ejerce su acción a nivel del hepatocito participando en el proceso de neoglucogénesis, sino también actúa a nivel de las células de Kuffer, las células endoteliales sinusoidales (CES) y las células hepáticas estrelladas (CHE) (Figura 7). Las células de Kupffer son los macrófagos hepáticos responsables de los procesos de inmunidad innata y respuesta antiinflamatoria. Las CES participan en el tono vascular intrahepático, en el aclaramiento hepático de la insulina y son capaces de secretar diferentes citoquinas y mediadores de la matriz extracelular y las CHE ejercen funciones de almacenamiento y homeostasis de retinoides, síntesis y remodelación de matriz extracelular así como en la regulación del tono vascular. Ante una situación de RI se inducirá a nivel hepático no sólo una alteración en la regulación de los carbohidratos, sino también, esteatosis, inflamación y fibrosis hepática. El efecto que puede tener sobre las CES y en la regulación del tono vascular intrahepático es una incógnita ya que no se ha explorado hasta este momento. La disfunción endotelial relacionada con RI se ha estudiado ampliamente en el territorio arterial, pero se desconoce el efecto sobre el territorio venoso o las células sinusoidales. Por consiguiente y llegado a este punto, es razonable preguntarse si la RI pudiera ser otro mecanismo responsable en la disfunción endotelial intrahepática, que participa en el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión portal en la cirrosis hepática.

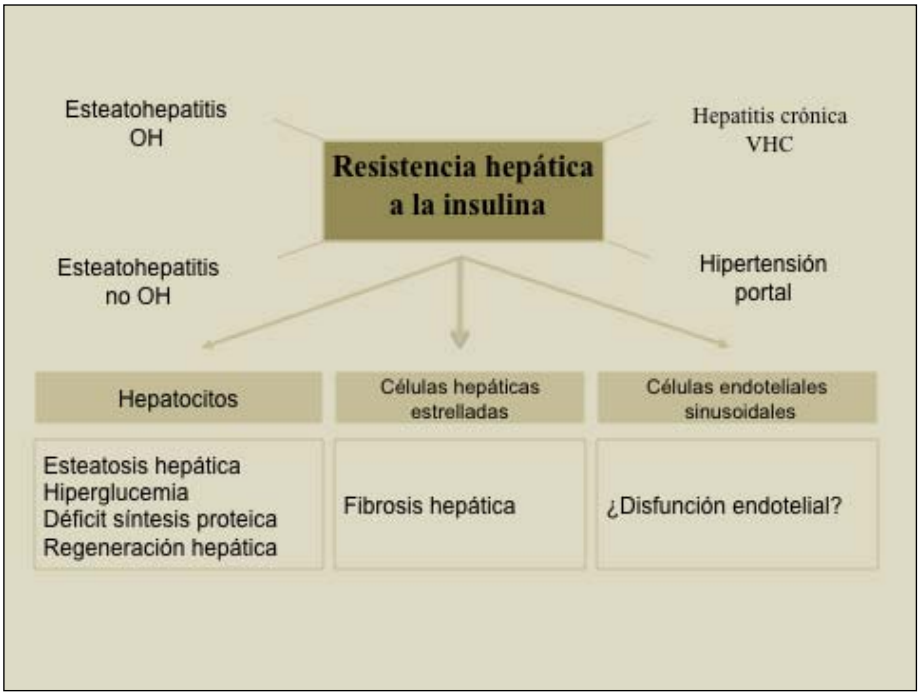

Figura 7.- Efectos de la resistencia a la insulina a nivel hepático en las hepatopatías crónicas

Existen diversos estudios experimentales y clínicos que demuestran la presencia de RI en la hipertensión portal. Brevemente, según estudios fisiopatológicos previos existe una hiperinsulinemia fisiológica debido principalmente a una reducción de su aclaramiento hepático por la presencia de colaterales o shunts porto-sistémicos. Esta hiperinsulinemia mantenida inactivará la vía de señalización de la insulina desarrollando una resistencia hepática y provocando finalmente intolerancia a la glucosa o diabetes, muy frecuentes entre pacientes con cirrosis. Se asocia con un mayor riesgo de progresión de la enfermedad hepática e incremento de complicaciones (hepatocarcinoma, fallo hepático, progresión de la fibrosis). Se ha sugerido que pudiera relacionarse también con la aparición de varices gastro-esofágicas. Sin embargo hasta la fecha, no existen estudios que hayan estudiado el posible papel de la RI en la fisiopatología de la hipertensión portal y formación de varices esofágicas y más concretamente en la disfunción endotelial intrahepática existente.

3.2. Resistencia sistémica a la insulina en la cirrosis

El efecto vascular de la resistencia a la insulina en pacientes con cirrosis hepática ha sido un escenario menos estudiado. En contra de lo que se podía creer con anterioridad, el desarrollo de enfermedades cardiovasculares posee un importante impacto negativo en la supervivencia post-trasplante hepático de estos pacientes. Esta elevada prevalencia se debe a la presencia de factores de riesgo cardiovascular, presentes incluso antes del trasplante o secundarios al tratamiento inmunuosupresor en el período post-trasplante. La presencia de DM en la fase pre-trasplante se asocia con una menor supervivencia.

Así mismo, se desconoce si la presencia de resistencia a la insulina influye de algún modo en la característica hemodinámica sistémica presente en la cirrosis pudiendo alterar su evolución.

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS GENERALES

La ***hipótesis de trabajo*** se basa en que la resistencia la insulina juega un papel en la fisiopatología de la hipertensión portal en la cirrosis. A partir de esta premisa los ***objetivos principales*** fueron los de evaluar la presencia de resistencia a la insulina en la cirrosis por un lado y su relación con la hemodinámica hepática y sistémica. Como ***objetivo secundario*** se propone la búsqueda de marcadores no invasivos de insulino-resistencia capaces de predecir hipertensión portal clínicamente significativa (HPCS).

III. METODOLOGÍA

Se diseñaron dos estudios clínicos observacionales y transversales en los que se evaluó la presencia de resistencia a la insulina (RI) y la presencia de disfunción endotelial de forma diferente en cada uno de ellos.

Artículo 1

Cohorte: Inclusión prospectiva de 49 pacientes con cirrosis hepática e hipertensión portal remitidos a la Unidad de Hemodinámica Hepática, excluyéndose aquellos pacientes diagnosticados de diabetes mellitus, hipertensión arterial, dislipemia u obesidad, la presencia de hepatocarcinoma o haber presentado un episodio de hemorragia digestiva por hipertensión portal.

Método para la medición de sensibilidad hepática a la insulina : Índice HOMA-2. Evaluación de la secreción pancreática de insulina: niveles de péptico C. Cálculo del metabolismo de la insulina: ratio péptido C/ Insulina Molar.

Estudios hemodinámicos: Estudio hemodinámico hepático, sistémico y respuesta hemodinámica a la infusión aguda de propranolol endovenoso. Se definió respuesta hemodinámica a la infusión aguda de propranolol un descenso del GPVH $\geq$ 10% del valor basal o un GPVH < 12 mmHg tras su administración.

Método para la evaluación de disfunción endotelial: niveles de NO y factor von Willebrand (fvW) en sangre venosa periférica y vena suprahepática.

Artículo 2

Cohorte: Inclusión prospectiva de 47 pacientes con cirrosis hepática e hipertensión portal remitidos a la Unidad de Hemodinámica Hepática excluyéndose aquellos pacientes con hepatocarcinoma o el haber presentado el antecedente de hemorragia digestiva alta por hipertensión portal. También se excluyeron aquellos pacientes que habían presentado alguna enfermedad cardiovascular previa (cardiopatía isquémica, ictus, accidente isquémico transitorio o cualquier intervención vascular relacionada con la aterosclerosis).

Método para la medición de sensibilidad periférica a la insulina: Riesgo global cardiovascular a los 10 años calculado mediante el índice de Framingham y la evaluación de placas de ateroma en la capa íntima de ambas arterias carótidas mediante ecografía-Doppler.

Estudios hemodinámicos: Estudio hemodinámico hepático y sistémico.

Método para la evaluación de disfunción endotelial: Dilatación mediada por el flujo de la arteria braquial tras un estímulo isquémico de la misma (DMF).

A continuación se detallan la justificación, hipótesis, objetivos y resultados de cada uno de los estudios que componen esta tesis.

IV. ARTÍCULO 1

1. Artículo publicado

Factor de impacto: 3.649

Insulin resistance in patients with cirrhosis and portal hypertension

Eva Erice, Elba Llop, Annalisa Berzigotti, Juan G. Abraldes, Ignacio Conget, Susana Seijo, Enric Reverter, Agustin Albillos, Jaume Bosch and Juan Carlos García-Pagán

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 302:G1458-G1465, 2012. First published 5 April 2012; doi:10.1152/ajpgi.00389.2011

You might find this additional info useful...

This article cites 49 articles, 9 of which can be accessed free at:
http://ajpgi.physiology.org/content/302/12/G1458.full.html#ref-list-1

Updated information and services including high resolution figures, can be found at:
http://ajpgi.physiology.org/content/302/12/G1458.full.html

Additional material and information about *AJP - Gastrointestinal and Liver Physiology* can be found at:
http://www.the-aps.org/publications/ajpgi

This information is current as of June 20, 2012.

AJP - Gastrointestinal and Liver Physiology publishes original articles pertaining to all aspects of research involving normal or abnormal function of the gastrointestinal tract, hepatobiliary system, and pancreas. It is published 12 times a year (monthly) by the American Physiological Society, 9650 Rockville Pike, Bethesda MD 20814-3991. Copyright © 2012 by the American Physiological Society. ISSN: 0193-1857, ESSN: 1522-1547. Visit our website at http://www.the-aps.org/.

Downloaded from ajpgi.physiology.org on June 20, 2012

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 302: G1458–G1465, 2012.
First published April 5, 2012; doi:10.1152/ajpgi.00389.2011.

Insulin resistance in patients with cirrhosis and portal hypertension

Eva Erice,[1,2] Elba Llop,[1,3] Annalisa Berzigotti,[1,2] Juan G. Abraldes,[1,2] Ignacio Conget,[4] Susana Seijo,[1] Enric Reverter,[1] Agustin Albillos,[2,5] Jaume Bosch,[1,2] and Juan Carlos García-Pagán[1,2]

[1]*Hepatic Hemodynamic Laboratory, Liver Unit, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, University of Barcelona, Barcelona, Spain;* [2]*Centro de Investigación Biomédica en red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, Barcelona, Spain;* [3]*Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda, Madrid, Spain;* [4]*Endocrinology and Diabetes Unit, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona, Spain; and* [5]*Gastroenterology Unit, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria, University of Alcalá, Madrid, Spain*

Submitted 22 September 2011; accepted in final form 3 April 2012

Erice E, Llop E, Berzigotti A, Abraldes JG, Conget I, Seijo S, Reverter E, Albillos A, Bosch J, García-Pagán JC. Insulin resistance in patients with cirrhosis and portal hypertension. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 302: G1458–G1465, 2012. First published April 5, 2012; doi:10.1152/ajpgi.00389.2011.—Insulin resistance (IR) is involved in the pathogenesis of endothelial dysfunction and is also present in patients with cirrhosis. Intrahepatic endothelial dysfunction plays a major role, increasing hepatic vascular resistance and promoting portal hypertension (PH). In addition, β-adrenergic agonists and insulin share several intracellular signaling pathways. Thus IR may influence the response to β-blockers. This study aimed at evaluating the relationship between IR and hepatic hemodynamics in patients with cirrhosis and with the portal pressure response to acute β-blockade. Forty-nine patients with cirrhosis and PH were included. Hepatic and systemic hemodynamics were measured, and IR was estimated by using the updated homeostasis model assessment (HOMA)-2 index. Patients with HOMA-2 > 2.4 were considered IR. In patients with hepatic venous pressure gradient (HVPG) ≥ 10 mmHg) [clinically significant PH (CSPH)], hemodynamic measurements were performed again 20 min after intravenous propranolol. Mean HOMA-2 index was 3 ± 1.4. Fifty-seven percent of patients had IR. A weak correlation between HOMA-2 index and HVPG was observed. Eighty-six percent of patients had CSPH. HOMA-2 index was an independent predictor of CSPH. However, in patients with CSPH, the correlation between HOMA-2 index and HVPG was lost. HVPG, but not IR, predicted the presence of esophageal varices. Response to propranolol was not different between patients with or without IR. In nondiabetic patients with cirrhosis, HOMA-2 index is directly associated with the presence of CSPH and indirectly with varices, but does not allow either grading HVPG or predicting its response to propranolol.

endothelial dysfunction; insulin signaling; portal pressure; β-blockade; homeostasis model assessment index

PORTAL HYPERTENSION (PH) is a serious consequence of cirrhosis that results in life-threatening complications with increased morbidity and mortality (3, 4, 22). In cirrhosis, enhanced hepatic resistance to portal blood inflow is the primary factor in the pathophysiology of PH. Second, an increased portal blood inflow contributes to the maintenance and worsening of PH, despite the development of portosystemic collaterals. Insufficient nitric oxide (NO) bioavailability in sinusoidal endothelial cells, a condition known as endothelial dysfunction, is considered a major pathogenic factor to increase hepatic vascular tone (27) and has shown to be secondary to several different posttranslational alterations in the regulation of hepatic endothelial NO synthase.

In addition to its metabolic action on glucose uptake, insulin also stimulates endothelial NO production, by activating the phosphatidylinositol 3-kinase and serine-threonine kinase (PI3K/Akt) signaling pathway (50). As a consequence, insulin resistance (IR) have been shown to result in impaired PI3K/Akt signaling pathway, causing a decrease in NO production, with the ensuing development of endothelial dysfunction (41) in several cardiovascular disorders, such as arterial hypertension, diabetes, and atherosclerosis (12, 36, 44).

IR has been described in several liver disorders (9, 14, 32, 39), where it may have important clinical consequences. Thus it has been suggested that IR has a negative impact on the response rates to interferon-based therapy in chronic hepatitis C virus infection (19) and that IR could be a predictor of the presence of PH in patients with nonalcoholic fatty liver disease (16). Furthermore, a recent published clinical study has suggested that IR is able to independently predict the presence of gastroesophageal varices in cirrhosis (11). The authors attributed this effect to a possible pathophysiological link between IR and PH. IR could contribute to either impairment of the sinusoidal endothelial dysfunction, or increment of peripheral vascular resistance in liver cirrhosis. Therefore, a possible effect of IR on the hepatic vasculature promoting an increase in intrahepatic resistance may be counteracted by a potential effect of IR increasing splanchnic resistance and reducing portal blood flow, with a resulting unpredicted effect on portal pressure. Unfortunately, up to now, there is no study evaluating the relationship between IR and hepatic and systemic hemodynamics in liver cirrhosis.

The current pharmacological therapy for PH is nonselective β-adrenergic blockers (5). Several factors influence the hepatic venous pressure gradient (HVPG) response to β-blockers, such as the degree of liver failure, dose of β-blockers, extent of portal-systemic collaterals, and varices or β_2-adrenoceptor gene polymorphisms (1, 2, 8, 15, 17, 47). IR could represent another component in this multifactorial phenomenon. Vascular relaxation in response to β_2-adrenoceptor agonists involves two components (24, 49): one endothelium independent, mediated by the activation of the cyclic AMP dependent-protein kinase A pathway in vascular smooth muscle cells; and another endothelium dependent, mediated by the activation of the PI3K/Akt signaling pathway that leads to NO release. As mentioned, this pathway is shared with insulin signaling (13, 34). A possible downregulation of this pathway by IR could interfere with the β-adrenergic signaling. Hence, it is plausible

Address for reprint requests and other correspondence: J. C. García-Pagán, Hepatic Hemodynamic Laboratory, Liver Unit, Hospital Clinic, Villarroel 170, Barcelona 08036, Spain (e-mail: JCGARCIA@clinic.ub.es).

 0193-1857/12 Copyright © 2012 the American Physiological Society

Downloaded from ajpgi.physiology.org on June 20, 2012

that IR may represent an additional factor influencing the hemodynamic response to propranolol in patients with cirrhosis.

The main aim of this study was to investigate the potential relationship between IR and hepatic and systemic hemodynamics in patients with cirrhosis. As secondary endpoints, the value of IR predicting the presence of clinically significant PH (CSPH; defined as an HVPG ≥ 10 mmHg) and gastroesophageal varices, as well as the influence of IR on the hemodynamic response to acute β-adrenergic blockade, will be assessed.

PATIENTS AND METHODS

Patients

The study was performed in 49 out of 267 patients with cirrhosis, referred from May 2008 to February 2010 to the Hepatic Hemodynamic Laboratory for the evaluation of PH (Fig. 1). All patients were diagnosed with cirrhosis at the clinic, based on biological, ultrasonographic, or histological criteria. The extensive exclusion criteria were as follows: absence of PH (HVPG < 6 mmHg); pregnancy or lactation; cardiac, renal, or respiratory failure; hepatocellular carcinoma; portal vein thrombosis; previous surgical or transjugular portosystemic shunt; presence of infection or acute decompensation in the prior 2 wk; prescription of hypolipemiant, antihypertensive, corticosteroid, bronchodilator, vasoactive, or hypoglycemic agents within 1 mo. Patients with established diabetes or metabolic syndrome (defined by the International Diabetes Federation) were excluded to discard their probable direct effect on the IR component derived from liver cirrhosis.

The study was performed according to the principles of the Declaration of Helsinki. The Ethics Research Committee of the Hospital Clinic of Barcelona approved the protocol in May 2008. Informed, written consent to participate in the study was obtained for every patient.

Methods

Hemodynamic studies. After fasting overnight, patients were transferred to the Hepatic Hemodynamic Laboratory. In brief, a venous introducer was placed in the internal jugular vein by the Seldinger technique under local anesthesia. Under fluoroscopy, a Swan-Ganz catheter (Edwards Laboratory, Los Angeles, CA) was advanced into the pulmonary artery for measurement of cardiopulmonary pressures and cardiac output (CO) by thermal dilution. Subsequently, a 7F balloon-tipped catheter (Edwards Lifesciences Fogarty 7F, Los Angeles, CA) was guided into the main right hepatic vein to measure wedged and free hepatic venous pressure, as described by previous authors to obtain hepatic pressures (6, 21). Mean arterial pressure (MAP, mmHg) was measured every 5 min by a noninvasive automatic sphygmomanometer and the heart rate was derived from continuous electrocardiogram monitoring.

In the subgroup of patients with CSPH, a solution of indocyanine green (Pulsion Medical Systems, Munich, Germany) was infused intravenously at a constant rate of 0.2 mg/min, preceded by a priming dose of 5 mg. After an equilibration period of at least 40 min, four separates sets of simultaneous samples of peripheral and hepatic venous blood were obtained for the measurement of hepatic blood flow (ml/min) by the Fick principle, as previously described (26, 16a). In these patients, after baseline measurements, intravenous propranolol (0.15 mg/kg) was administered over 10 min, and hepatic and cardiopulmonary pressures, CO, and hepatic blood flow were assessed again after 20 min.

All measurements were taken by triplicatem and permanent tracings were obtained in a multichannel recorder (Mac-Lab/Specials Laboratory, General Electric Medical System). Portal pressure was estimated from HVPG (mmHg) as the difference between wedged and free hepatic venous pressure. Cardiac index (CI; $l \cdot min^{-1} \cdot m^{-2}$) was calculated as CO/body surface area and systemic vascular resistance

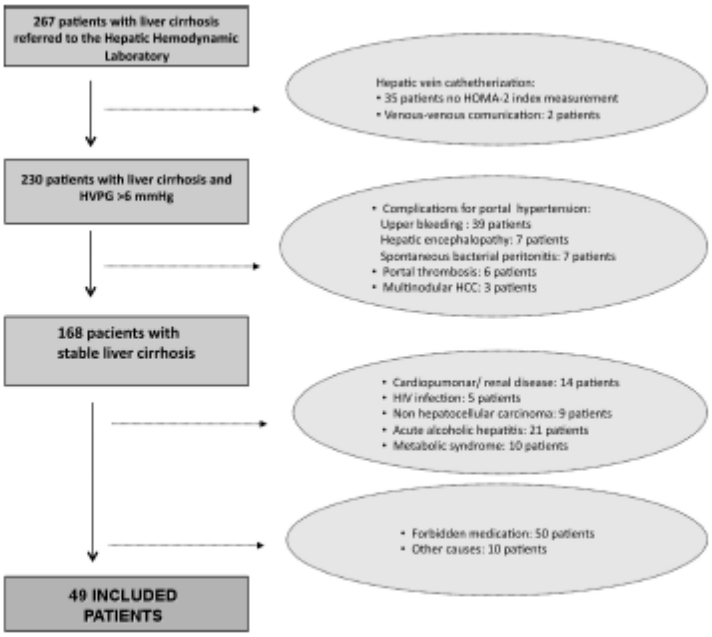

Fig. 1. Flow chart showing the exclusion criteria for patients in the study. HVPG, hepatic venous pressure gradient; HCC, hepatocellular carcinoma; HOMA, homeostasis model assessment; HIV, human immunodeficiency virus.

Downloaded from ajpgi.physiology.org on June 20, 2012

Table 1. *Baseline clinical and hemodynamic characteristics of the 49 patients included*

	Study Population	Non-IR Group	IR Group	*P* Values
n	49	19	30	
Sex (men/women)	27/22	11/8	16/14	0.77
Age, yr	57 ± 10	56 ± 9	58 ± 10.6	0.31
Active alcoholism, %	16	21	13	0.7
BMI, kg/m^2	25.6 ± 5.7	24 ± 2	27 ± 4.6	0.03
Etiology, *n*				0.83
Alcohol	15	4	11	
HCV	25	11	14	
HBV	6	3	3	
Other	3	1	2	
Ascites, *n*	16	5	11	0.65
Varices, *n*	28	8	20	0.16
Bilirubin, mg/dl	2.1 ± 2.1	1.3 ± 1.1	2.5 ± 2.4	0.05
Albumin, g/l	32 ± 6	33 ± 6.5	32 ± 5.5	0.52
Platelets, $\times 10^6$/l	103 ± 46	117 ± 49	94 ± 43	0.06
Prothrombin time, %	67 ± 20	77 ± 15	60 ± 19	0.003
Child-Pugh class (A/B/C)	28/12/9	14/3/2	14/9/7	0.08
Child-Pugh score	7 ± 2.1	6 ± 1.6	7.5 ± 2.3	0.05
MELD score	12.5 ± 5.2	10 ± 3	14 ± 5.6	0.01
HOMA-2 index	3 ± 1.4	1.6 ± 0.6	3.9 ± 1	0.00
Glucose, mmol/l	5.6 ± 1	5.3 ± 1	5.8 ± 1	0.07
Insulin, pmol/l	144.5 ± 68.8	81.8 ± 27.5	191.5 ± 55	0.00
MAP, mmHg	92 ± 14	94 ± 13.2	90 ± 14.7	0.4
CI, l·min^{-1}·m^{-2}	3.7 ± 1.3	3.1 ± 0.6	4.02 ± 1.3	0.02
SVRI, dyn·s·m^2·cm^{-5}	3,091 ± 7,317	2,376 ± 553	1,881.6 ± 885	0.008
HVPG, mmHg	15.5 ± 6	13 ± 5	17 ± 5.5	0.002
CSPH, %	77.6	58	90	0.014

Continuous variables are means ± SD; *n*, no. of subjects. *P* values are non-insulin resistance (IR) vs. IR group. BMI, body mass index; HCV, hepatitis C virus; HBV, hepatitis B virus; MELD, model for end-stage liver disease; HOMA-2 index, homeostasis model assessment-2 index; MAP, mean arterial pressure; CI, cardiac index; SVRI, systemic vascular resistance index; HVPG, hepatic venous pressure gradient; CSPH, clinically significant portal hypertension.

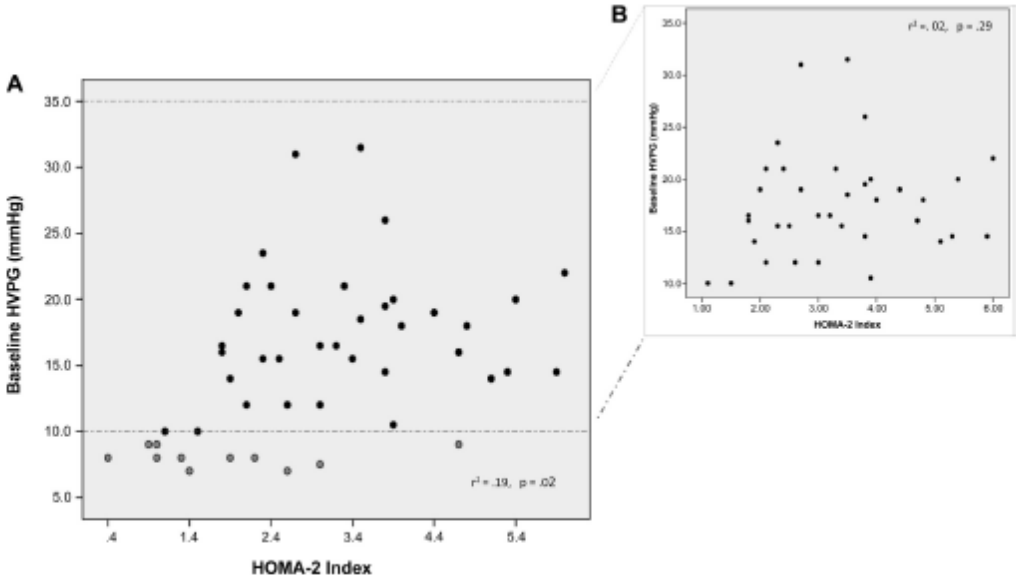

Fig. 2. Relation between HOMA-2 index and HVPG in the 49 patients (*A*) and in the subgroup of 38 patients with clinically significant portal hypertension (*B*).

Downloaded from ajpgi.physiology.org on June 20, 2012

Table 2. *Clinical and hemodynamic characteristics of the patients with and without CSPH*

	HVPG < 10	HVPG ≥ 10	*P* Values
n	11	38	
Sex (men/women)	5/6	22/16	0.5
Age, yr	56 ± 12.4	58 ± 9.5	0.5
Active alcoholism, %	0	21	0.17
Etiology, *n*			0.17
Alcohol	0	15	
HCV	8	17	
HBV	3	3	
Other		3	
Ascites, *n*	0	16	0.009
Varices, *n*	0	28	0.00
Bilirubin, mg/dl	0.8 ± 0.2	2.5 ± 2.2	0.00
Albumin, g/l	36 ± 3.7	31 ± 5.4	0.017
Platelets, $\times 10^9$	108 ± 46	102 ± 51	0.2
Esplenomegaly, %	55	79	0.2
Prothrombin time, %	85 ± 9.5	62 ± 18.2	0.00
Child-Pugh class (A/B/C)	11/0/0	17/12/9	0.04
Child-Pugh score	5 ± 1	7 ± 2	0.004
MELD score	7.6 ± 1.1	13.4 ± 5.1	0.00
HOMA-2 index	1.85 ± 1.2	3.4 ± 1.3	0.001
Glucose, mmol/l	5.2 ± 0.7	5.7 ± 1.1	0.15
Insulin, pmol/l	91.5 ± 58.2	160 ± 64.4	0.003
MAP, mmHg	97 ± 16.3	90 ± 13.7	0.038
CI, $l \cdot min^{-1} \cdot m^{-2}$	2.4 ± 1.5	4 ± 1.2	0.00
SVRI, $dyn \cdot s \cdot m^2 \cdot cm^{-5}$	2,800 ± 750	1,892.6 ± 651	0.00
HVPG, mmHg	8 ± 1	17.5 ± 5	0.00

Continuous variables are means ± SD; *n*, no. of subjects. *P* values are HVPG <10 vs. HVPG ≥ 10 group.

index (SVRI, $dyn \cdot s \cdot m^2 \cdot cm^{-5}$) as (MAP − RAP) × 80/CI (where RAP is right atrial pressure). Patients exhibiting a decrease in HVPG ≥ 10% from baseline after intravenous propranolol administration were defined as "hemodynamic responders" (31, 48). In patients with ascites, the body mass index (BMI) (kg/m^2), was calculated using a correction factor of 4 kg to estimate the real weight. It represents the mean of evacuated liters in large-volume paracentesis (18, 40).

Evaluation of IR. IR was estimated from fasting plasma glucose and insulin levels by using the updated homeostasis model assessment (HOMA-2) index (35), and it was calculated using the HOMA-2 calculator, which is downloadable from The Oxford Centre for Diabetes, Endocrinology and Metabolism web site (www.dtu.ox.ac.uk). HOMA is an index that estimates steady state β-cell function (%B) and insulin sensitivity (%S). It has been previously validated in healthy populations, noninsulin-treated type 2 patients, and people with metabolic syndrome. Several studies suggest that HOMA index could be an useful tool to identify subjects with IR at risk of developing cardiovascular diseases (10, 29).

Eighty-two healthy normal-weight subjects (50 men and 32 women, age ranging between 28 and 48 yr) without family history of diabetes mellitus were chosen to define the normal value of the HOMA-2 index in our area. The upper 75% value of the HOMA-2 index was 2.4. Patients with HOMA-2 index above this value were considered to have IR.

In the subgroup of patients with CSPH, the C-peptide-to-insulin molar ratio in peripheral venous blood was used to estimate indirectly insulin metabolism, as assessed previously (30, 35). In normal conditions, insulin and C-peptide are secreted into the portal vein in a 1:1 molar ratio. The liver mainly clears endogenous insulin, whereas C-peptide is cleared by the kidney in a lower metabolic clearance rate than insulin. As a consequence, the C-peptide-to-insulin molar ratio in peripheral venous blood is higher than 1.0 (7). Plasma free insulin and C-peptide were measured by radioimmunoassay.

In addition, blood samples from peripheral and hepatic veins were obtained to measure NO products (NO_X: NO_2^-, NO_3^-) by chemiluminescence (Nitric Oxide Analyzer, NOA 280; Sievers Instruments, Boulder, CO) and von Willebrand factor [antigen vWF (Ag vWF)] by enzyme-linked immunosorbent assay system as a marker of endothelial dysfunction.

Statistics

Statistics analyses were performed using SPSS 16.0 statistical package (SPSS, Chicago, IL). All results are expressed as mean ± SD for continuous variables and frequencies and percentages for categorical variables. U Mann-Whitney was used to perform comparisons between groups for continuous variables and Fisher test, test, and linear-by-linear test for categorical variables. Correlation was performed by Rho's Spearman coefficient. Statistical significance was established as $P < 0.05$. Multivariable logistic regression models were constructed to look for independent predictors of varices, CSPH and IR.

RESULTS

Clinical and Hemodynamic Characteristics of Patients With Cirrhosis, With and Without IR

The baseline clinical and laboratory characteristics of the 49 patients included are shown in Table 1. Mean age was 57 yr, and 55% were men. The most frequent etiology of cirrhosis was hepatitis C virus infection (51%) and active alcoholism

Table 3. *Baseline clinical and hemodynamic characteristics of the 38 patients with CSPH*

	Non-IR Group	IR Group	*P* Values
n	11	27	
Age, yr	58 ± 8.5	58 ± 10	0.59
Active alcoholism, %	36	15	0.19
BMI, kg/m^2	24 ± 2.3	27 ± 5	0.01
Etiology, *n*			0.96
Alcohol	4	11	
HCV	5	11	
HBV	1	3	
Other	1	2	
Ascites, %	45	41	0.95
Varices, %	70	70	1.0
Bilirubin, mg/dl	1.7 ± 1.4	2.8 ± 2.4	0.28
Albumin, g/l	31 ± 7	32 ± 5.6	0.54
Protrombin time, %	73 ± 18	58 ± 17	0.02
Child-Pugh class (A/B/C)	6/3/2	11/9/7	0.45
MELD score	11 ± 3.3	14 ± 5.5	0.1
HOMA-2 index	1.9 ± 0.4	3.8 ± 1.0	0.00
Glucose, mmol/l	5 ± 1.1	5.9 ± 1.2	0.28
Insulin, pmol/l	90.3 ± 18	187.5 ± 54.2	0.00
C-peptide, nmol/l	0.9 ± 0.5	1.4 ± 0.5	0.01
C-peptide/insulin	10.3 ± 4.5 (*n* = 10)	8 ± 2.9 (*n* = 25)	0.09
Hepatic NOx, μmol/l	25.1 ± 19.3	21.8 ± 9.1	0.77
Peripheral NOx, μmol/l	24.36 ± 15.9	24.24 ± 11.2	0.67
Hepatic vWF Ag, U/dl	152 ± 27.2	140 ± 32	0.21
Peripheral vWF Ag, U/dl	135 ± 28.1	139 ± 37	0.77
MAP, mmHg	95 ± 14.5	90 ± 13.5	0.27
CI, $l \cdot min^{-1} \cdot m^{-2}$	3.4 ± 0.6	4.2 ± 1.3	0.07
SVRI, $dyn \cdot s \cdot m^2 \cdot cm^{-5}$	2,205 ± 575	1,765 ± 647	0.05
HVPG, mmHg	16 ± 4.5	18 ± 5	0.39
HBF, l/min	1.04 ± 0.3 (*n* = 9)	0.92 ± 0.5 (*n* = 21)	0.14

Continuous variables are means ± SD; *n*, no. of subjects. *P* values are non-IR vs. IR group. Hepatic/peripheral NOx, hepatic/peripheral nitric oxide; hepatic/peripheral vWF Ag, hepatic/peripheral von Willebrand factor antigen; HBF, hepatic blood flow.

Downloaded from ajpgi.physiology.org on June 20, 2012

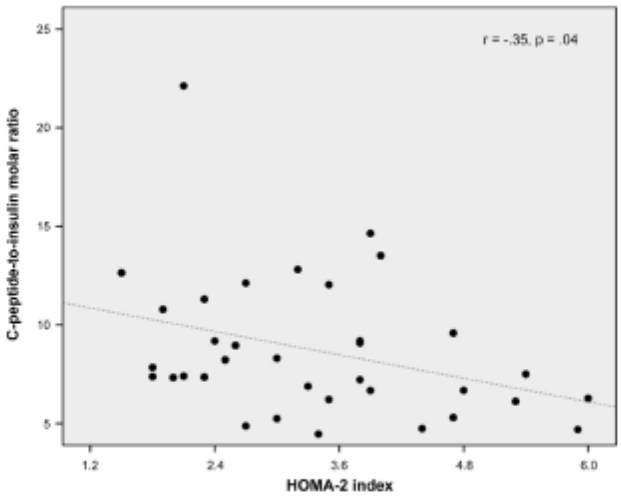

Fig. 3. Relation between C-peptide-to-insulin molar ratio and HOMA-2 index.

was present in eight patients. Mean Child-Pugh score was 7 ± 2.1. The mean HOMA-2 index was 3 ± 1.4. Thirty of the 49 patients (61%) had a HOMA-2 index above the cutoff value defining IR (>2.4) with a mean value of 4 (ranging from 2.5 to 6). As shown in Table 1, patients with IR had higher BMI, bilirubin, Child-Pugh, and model for end-stage liver disease (MELD) scores, CI, HVPG, and significantly lower systemic vascular resistance, platelets count, and prothrombin time than those without. Multivariate logistic regression analysis disclosed prothrombin time as the only independent predictor for the presence of IR.

IR, HVPG, and CSPH

A weak but significant correlation between HOMA-2 index and HVPG was observed (Fig. 2*A*; $r^2 = 0.19$, $P = 0.02$). Thirty-eight of the 49 patients included (86%) had CSPH (Table 2). Correlation between HOMA-2 index and HVPG was lost when only patients with CSPH were considered ($r^2 = 0.02$, $P = 0.29$; Fig. 2*B*).

As shown in Table 2, patients with CSPH had significantly higher HOMA-2 index, more ascites, presence of esophageal varices (EV), and worse hepatocellular function than patients without CSPH. Multivariate analysis disclosed high HOMA-2 index and low prothrombin time as the only independent predictors for the presence of CSPH.

In the subgroup of 38 patients with CSPH (mean HVPG: 17.5 ± 5 mmHg; range: 10–31.5 mmHg), 27 patients were IR (71%) and 11 patients were not (29%). As shown in Table 3, prothrombin time, insulin, C-peptide, and SVRI were significantly different in patients with IR, without significant differences in hepatic or peripheral NOx or Ag vWF levels. However, no significant differences in HVPG were observed (HVPG; 18 ± 5 vs. 16 ± 4.5 mmHg, $P = 0.39$). Multivariate analysis also disclosed prothrombin time in addition to BMI as independent predictors for the presence of IR in the subgroup of patients with CSPH. Interestingly, a significant inverse association between HOMA-2 and the C-peptide-to-insulin molar ratio (a surrogate of portal systemic shunting) was observed ($r = -0.35$, $P = 0.04$) (Fig. 3).

IR and EV

As shown in Table 4, patients with EV had a significantly higher MELD score, HOMA-2 index, CI, HVPG, and presence of CSPH and a significantly lower prothrombin time and SVRI than patients without EV. However, multivariate analysis disclosed that only HVPG independently predict the presence of EV, either evaluated as continuous variable or categorized in CSPH vs. non-CSPH.

Table 4. *Clinical and hemodynamic characteristics of the patients with or without gastroesophageal varices*

	Yes EV	No EV	*P* Values
n	27	22	
Age, yr	58 ± 9.3	56 ± 10.8	0.28
Active alcoholism, %	18.5	13.6	0.71
Bilirubin, mg/dl	2.4 ± 2.2	1.8 ± 2	0.06
Albumin, g/l	32 ± 6.4	34 ± 5.4	0.07
Protrombin time, %	62 ± 18.2	73 ± 19	0.04
Platelets, $\times 10^9$	105 ± 55	101 ± 33	0.2
Child-Pugh class (A/B/C)	12/9/6	16/3/3	0.1
Child-Pugh score	7 ± 2.1	6.5 ± 2	0.09
MELD score	13.4 ± 4.7	11.2 ± 5.6	0.04
HOMA-2 index	3.4 ± 1.3	2.5 ± 1.4	0.02
Glucose, mmol/l	5.6 ± 1	5.6 ± 1.2	0.75
Insulin, pmol/l	163.4 ± 62	121.3 ± 71	0.016
MAP, mmHg	89 ± 11	97 ± 17	0.12
CI, $l \cdot min^{-1} \cdot m^{-2}$	4 ± 1.2	3.3 ± 1.4	0.016
SVRI, $dyn \cdot s \cdot m^2 \cdot cm^{-5}$	1,778 ± 547	2,469 ± 961	0.005
HVPG (mmHg	17.5 ± 5	13 ± 6	0.005
CSPH (>10 mmHg), %	96.3	54.5	0.001

Continuous variables are means ± SD; *n*, no. of subjects. *P* values are yes esophageal varices (EV) vs. no EV group.

Downloaded from ajpgi.physiology.org on June 20, 2012

Acute HVPG Response to Propranolol

In the CSPH group (n = 38), acute propranolol administration produced a significant reduction in HVPG (−15%, P = 0.00) (Table 5). No significant correlation was found between HOMA-2 index and reduction in HVPG (r = −0.054, P = 0.6). There were no statistically significant differences in the hemodynamic response to acute intravenous propranolol in patients with or without IR (−15 ± 10.5 vs. −15 ± 11.5%, P = 0.39) (Table 5). The percentage of "hemodynamic responders" was similar in both groups (IR group 65% vs. without-IR: 64% P = nonsignificant).

DISCUSSION

Insulin is known to regulate glucose metabolism and NO production by activating endothelial NO synthase (50). Reduced secretion of NO, as a consequence of IR, is responsible for endothelial dysfunction in several cardiovascular diseases and is associated with severity of disease (12, 36, 44). IR is very frequent in chronic liver disorders and has been associated with the development of hyperglycemia, hepatic steatosis, and enhanced structural damage favoring the occurrence of cirrhosis (32).

Nevertheless, up to now, the prevalence of IR in patients with cirrhosis and the real impact on the pathophysiology of PH have not been adequately evaluated. A recent published clinical study has suggested that the presence of IR, assessed by the HOMA index, could play a role per se in the pathogenesis of PH in patients with cirrhosis with mild hepatocellular insufficiency (Child-Pugh A) (11). Authors from this study suggest that a HOMA value ≥3.5, combined with a low platelet count-to-spleen diameter ratio could identify those patients with cirrhosis and EV. These two parameters have been validated positively in another independent cohort of 340 patients with cirrhosis. Moreover, there was a positive correlation with the HOMA score and worsening of the hepatic function (33). However, these affirmations have not been accompanied by a hepatic hemodynamic study.

The cohort of patients included in the present study was selected to obtain a homogeneous group and avoid possible confounding factors, which may influence the HOMA-2 index (by altering insulin and glucose levels), such as stress situations, metabolic syndrome, or medically treated diabetes, and its interpretation in cirrhosis.

The present study confirms that IR, assessed by HOMA-2 index, is a very frequent phenomenon in patients with cirrhosis and PH. Indeed, IR was found in >60% of our patients, a figure that increased to >70%, if only patients with CSPH were considered. A weak but significant correlation between HOMA-2 index and HVPG was observed. In addition, HOMA-2 index, together with prothrombin time, were the only independent predictors for the presence of CSPH. These findings suggest that IR may play a role in the progression of the chronic liver disease at the earlier stages, as it has already been suggested in patients with nonalcoholic fatty liver disease (16), where the presence of IR was associated with the presence of mild PH (in that study, all patients had HVPG < 10 mmHg). Interestingly, our data, including patients with more severe PH, show that, once CSPH has developed, the correlation between HOMA-2 index and HVPG is lost. These results suggest that, once CSPH has developed, further increments of HOMA-2

Table 5. *Mean hemodynamic response to intravenous propranolol administration*

	Study Population (n = 38 patients)				Non-IR Group (n = 11 patients)				IR Group (n = 27 patients)				P Values
	Baseline	After Iv Propranol	%Change	P	Baseline	After Iv Propranol	%Change	P	Baseline	After Iv Propranol	%Change	P	
HR, beats/min	76 ± 12	60 ± 9	−19.8 ± 13	0.00	72 ± 11	59 ± 8	−18 ± 5	0.00	77 ± 13	62 ± 10	−19 ± 9	0.00	0.25
CI, l·min^{-1}·m^{-2}	4 ± 1.2	3 ± 0.8	−19 ± 12.7	0.00	3.4 ± 0.6	2.7 ± 0.5	−19 ± 11	0.01	4.2 ± 1.3	3.2 ± 1	−19 ± 13.5	0.00	0.07
HVPG, mmHg	17.5 ± 5	15 ± 4.5	−15 ± 10.5	0.00	16 ± 4.5	13.5 ± 3.5	−15 ± 11.5	0.01	18 ± 5	15.5 ± 5	−15 ± 10.5	0.00	0.39
HBF, l/min	0.95 ± 0.5	0.76 ± 0.4	−16 ± 19	0.00	1.04 ± 0.3 (n = 9)	0.83 ± 0.3	−16 ± 20.5	0.07	0.92 ± 0.5 (n = 21)	0.74 ± 0.50	−16.5 ± 19	0.00	0.14

Values are means ± SD; n, no. of subjects. *Comparative of response of non-IR group vs. IR-group. HR, heart rate; iv propranolol, intravenous administration of propranolol.

Downloaded from ajpgi.physiology.org on June 20, 2012

index may reflect hyperinsulinism secondary to two different mechanisms: either β-pancreatic hypersecretory state, as suggested by the moderately higher C-peptide levels in patients with IR, or reduction of insulin clearance as a consequence of portal-systemic shunting, as suggested by the observed inverse correlation between HOMA-2 index and C-peptide-to-insulin molar ratio. Indeed, it has been previously shown (7) that, in patients with portal-systemic collateral circulation, the hepatic first pass clearance of insulin decreases and, as a consequence, C-peptide-to-insulin molar ratio decreases, while HOMA-2 index increases. Lack of correlation between HOMA-2 index and NO and Ag vWF levels, as indicators of endothelial dysfunction, does not support a role for IR in the pathophysiology of PH either. These results are consistent with the findings of a previous study (20), which did not find a correlation between peripheral vein insulin concentration and portal pressure in a group of patients with alcoholic cirrhosis and PH.

Overall, from a pathophysiological point of view, the results of our study suggest that IR might have a role in the initial steps contributing to the development of CSPH. But once CSPH has developed, increments of HOMA-2 index may be more a consequence of the unpredictable development of portal-collateral circulation than a cause for the worsening of the severity of PH.

Additionally, our study confirms previous observations demonstrating that EV are more frequent in patients with IR than in those without. However, multivariate analysis disclosed HVPG, either as a continuous variable, or categorized as CSPH vs. non-CSPH, as the only significant variable predicting the presence of gastroesophageal varices. These results clearly demonstrate that an increased HVPG ≥ 10 mmHg, and not IR, is the pathophysiological factor linked to the presence of EV. However, these results strongly suggest that IR may be used as a noninvasive marker of CSPH, an issue that requires confirmation.

Our study also shows that IR does not influence the hemodynamic response to acute intravenous propranolol administration. The effect of propranolol administration on HVPG and systemic hemodynamics was similar for patients with or without IR, and no cutoff value of HOMA-2 was identified to predict the response to intravenous propranolol.

In conclusion, nondiabetic patients diagnosed with liver cirrhosis and CSPH have increased HOMA-2 index. This increment is probably due more to the development of portal-collateral circulation than an impairment of PH secondary to endothelial intrahepatic dysfunction by IR. However, HOMA-2 index may have potential for the noninvasive prediction of CSPH and as a consequence of gastroesophageal varices.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been done as part of a PhD degree in Medicine of E. Erice, at the Universitat Autònoma de Barcelona, Spain.

GRANTS

This study was supported by grants from the Ministerio de Educación e Innovación (SAF2010/17043 to J. C. Garcia-Pagan) and from Instituto de Salud Carlos III (PS 09/01261 to J. Bosch and FIS 08/0193 to J. G. Abraldes) and cofinanced by FEDER funds (EU, "Una manera de hacer Europa"). Ciberehd is funded by Instituto de Salud Carlos III.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

E.E. and J.C.G.-P. conception and design of research; E.E., E.L., A.B., S.S., E.R., A.A., and J.C.G.-P. performed experiments; E.E., J.G.A., and J.C.G.-P. analyzed data; E.E., J.G.A., I.C., J.B., and J.C.G.-P. interpreted results of experiments; E.E. and J.C.G.-P. prepared figures; E.E., E.R., and J.C.G.-P. drafted manuscript; E.E., J.G.A., J.B., and J.C.G.-P. edited and revised manuscript; E.E., J.B., and J.C.G.-P. approved final version of manuscript.

REFERENCES

1. Abraldes JG, Tarantino I, Turnes J, Garcia-Pagan JC, Rodes J, Bosch J. Hemodynamic response to pharmacological treatment of portal hypertension and long-term prognosis of cirrhosis. *Hepatology* 37: 902–908, 2003.
2. Bosch J. Effect of pharmacological agents on portal hypertension: a haemodynamic appraisal. *Clin Gastroenterol* 14: 169–184, 1985.
3. Bosch J. Vascular deterioration in cirrhosis. The big picture. *J Clin Gastroenterol* 41: S247–S253, 2007.
4. Bosch J, Berzigotti A, Garcia-Pagan JC, Abraldes JG. The management of portal hypertension: rational basis, available treatments and future options. *J Hepatol* 48, *Suppl* 1: S68–S92, 2008.
5. Bosch J, Garcia-Pagan JC. Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension. *J Hepatol* 32: 141–156, 2000.
6. Bosch J, Garcia-Pagan JC, Berzigotti A, Abraldes JG. Measurement of portal pressure and its role in the management of chronic liver disease. *Semin Liver Dis* 26: 348–362, 2006.
7. Bosch J, Gomis R, Kravetz D, Casamitjana R, Teres J, Rivera F, Rodes J. Role of spontaneous portal-systemic shunting in hyperinsulinism of cirrhosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 247: G206–G212, 1984.
8. Bosch J, Mastai R, Kravetz D, Bruix J, Gaya J, Rigau J, Rodes J. Effects of propranolol on azygos venous blood flow and hepatic and systemic hemodynamics in cirrhosis. *Hepatology* 4: 1200–1205, 1984.
9. Bugianesi E, Moscatiello S, Ciaravella MF, Marchesini G. Insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Pharm Des* 16: 1941–1951, 2010.
10. Ceccamo G, Bonura F, Bonura F, Vitale G, Novo G, Evola S, Evola G, Grisanti MR, Novo S. Insulin resistance and acute coronary syndrome. *Atherosclerosis* 211: 672–675, 2010.
11. Camma C, Petta S, Di M, V, Bronte F, Cimiminisi S, Licata G, Peralta S, Simone F, Marchesini G, Craxi A. Insulin resistance is a risk factor for esophageal varices in hepatitis C virus cirrhosis. *Hepatology* 49: 195–203, 2009.
12. Cersosimo E, DeFronzo RA. Insulin resistance and endothelial dysfunction: the road map to cardiovascular diseases. *Diabetes Metab Res Rev* 22: 423–436, 2006.
13. Creager MA, Liang CS, Coffman JD. Beta adrenergic-mediated vasodilator response to insulin in the human forearm. *J Pharmacol Exp Ther* 235: 709–714, 1985.
14. Douglas MW, George J. Molecular mechanisms of insulin resistance in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 15: 4356–4364, 2009.
15. Escorsell A, Feragorni L, Bosch J, Garcia-Pagan JC, Garcia-Tsao G, Grace ND, Rodes J, Groszmann RJ. The portal pressure response to beta-blockade is greater in cirrhotic patients without varices than in those with varices. *Gastroenterology* 112: 2012–2016, 1997.
16. Francque S, Verrijken A, Mertens I, Hubens G, Van ME, Pelckmans P, Michielsen P, Van GL. Visceral adiposity and insulin resistance are independent predictors of the presence of non-cirrhotic NAFLD-related portal hypertension. *Int J Obes (Lond)* 35: 270–278, 2011.
16a. Garcia-Pagán JC, Feu I, Navasa M, Bru C, Ruz del Arbol L, Bosch J, Rodés J. Long term haemodynamic effects of isosorbide 5-mononitrate in patients with cirrhosis and portal hypertension. *J Hepatol* 11: 189–195, 1990.
17. Garcia-Tsao G, Grace ND, Groszmann RJ, Conn HO, Bermann MM, Patrick MJ, Morse SS, Alberts JL. Short-term effects of propranolol on portal venous pressure. *Hepatology* 6: 101–106, 1986.
18. Gines P, Arroyo V. Paracentesis in the management of cirrhotic ascites. *J Hepatol* 17, *Suppl* 2: S14–S18, 1993.
19. Grasso A, Malfatti F, De LP, Martines H, Fabris P, Toscanini F, Anselmo M, Menardo G. Insulin resistance predicts rapid virological response in non-diabetic, non-cirrhotic genotype 1 HCV patients treated with peginterferon alpha-2b plus ribavirin. *J Hepatol* 51: 984–990, 2009.

Downloaded from ajpgi.physiology.org on June 20, 2012

20. Greco AV, Crucitti F, Ghirlanda G, Manna R, Altomonte L, Rebuzzi AG, Bertoli A. Insulin and glucagon concentrations in portal and peripheral veins in patients with hepatic cirrhosis. *Diabetologia* 17: 23–28, 1979.
21. Groszmann R, Vorobioff JD, Gao H. Measurement of portal pressure: when, how, and why to do it. *Clin Liver Dis* 10: 499–512, viii, 2006.
22. Groszmann RJ, Abraldes JG. Portal hypertension: from bedside to bench. *J Clin Gastroenterol* 39: S125–S130, 2005.
23. Groszmann RJ, Garcia-Tsao G, Bosch J, Grace ND, Burroughs AK, Planas R, Escorsell A, Garcia-Pagan JC, Patch D, Matloff DS, Gao H, Makuch R. Beta-blockers to prevent gastroesophageal varices in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 353: 2254–2261, 2005.
24. Guimaraes S, Moura D. Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol Rev* 53: 319–356, 2001.
25. Gupta TK, Toruner M, Chung MK, Groszmann RJ. Endothelial dysfunction and decreased production of nitric oxide in the intrahepatic microcirculation of cirrhotic rats. *Hepatology* 28: 926–931, 1998.
26. Henriksen JH, Winkler K. Hepatic blood flow determination. A comparison of 99mTc-diethyl-IDA and indocyanine green as hepatic blood flow indicators in man. *J Hepatol* 4: 66–70, 1987.
27. Hernandez-Guerra M, Garcia-Pagan JC, Bosch J. Increased hepatic resistance: a new target in the pharmacologic therapy of portal hypertension. *J Clin Gastroenterol* 39: S131–S137, 2005.
28. Holstein A, Hinze S, Thiessen E, Plaschke A, Egberts EH. Clinical implications of hepatogenous diabetes in liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 17: 677–681, 2002.
29. Ikeda N, Nakajima R, Tsunoda T, Nakamura M, Sugi K. Insulin resistance and acute coronary syndrome in the young Japanese population have a strong association. *Heart Vessels* 22: 165–169, 2007.
30. Inokuchi T, Watanabe K, Kameyama H, Orita M. Altered basal C-peptide/insulin molar ratios in obese patients with fatty liver. *Jpn J Med* 27: 272–276, 1988.
31. La Mura V, Abraldes JG, Raffa S, Retto O, Berzigotti A, Garcia-Pagan JC, Bosch J. Prognostic value of acute hemodynamic response to iv propranolol in patients with cirrhosis and portal hypertension. *J Hepatol* 51: 279–287, 2009.
32. Leclercq IA, Da Silva MA, Schroyen B, Van HN, Geerts A. Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: mechanisms and consequences. *J Hepatol* 47: 142–156, 2007.
33. Li X, Wu K, Fan D. Insulin resistance and platelet count/spleen diameter ratio: two simple, easy-to-get tests for predicting esophageal varices in cirrhosis. *Hepatology* 49: 1394–1395, 2009.
34. Morisco C, Condorelli G, Trimarco V, Bellis A, Marrone C, Condorelli G, Sadoshima J, Trimarco B. Akt mediates the cross-talk between beta-adrenergic and insulin receptors in neonatal cardiomyocytes. *Circ Res* 96: 180–188, 2005.
35. Muniyappa R, Lee S, Chen H, Quon MJ. Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294: E15–E26, 2008.
36. Muniyappa R, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Cardiovascular actions of insulin. *Endocr Rev* 28: 463–491, 2007.
38. Nishida T, Tsuji S, Tsujii M, Arimitsu S, Haruna Y, Imano E, Suzuki M, Kanda T, Kawano S, Hiramatsu N, Hayashi N, Hori M. Oral glucose tolerance test predicts prognosis of patients with liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 101: 70–75, 2006.
39. Petrides AS, Stanley T, Matthews DE, Vogt C, Bush AJ, Lambeth H. Insulin resistance in cirrhosis: prolonged reduction of hyperinsulinemia normalizes insulin sensitivity. *Hepatology* 28: 141–149, 1998.
40. Planas R, Gines P, Arroyo V, Llach J, Panes J, Vargas V, Salmeron JM, Gines A, Toledo C, Rimola A. Dextran-70 versus albumin as plasma expanders in cirrhotic patients with tense ascites treated with total paracentesis. Results of a randomized study. *Gastroenterology* 99: 1736–1744, 1990.
41. Potenza MA, Marasciulo FL, Chieppa DM, Brigiani GS, Formoso G, Quon MJ, Montagnani M. Insulin resistance in spontaneously hypertensive rats is associated with endothelial dysfunction characterized by imbalance between NO and ET-1 production. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H813–H822, 2005.
42. Ripoll C, Groszmann R, Garcia-Tsao G, Grace N, Burroughs A, Planas R, Escorsell A, Garcia-Pagan JC, Makuch R, Patch D, Matloff DS, Bosch J. Hepatic venous pressure gradient predicts clinical decompensation in patients with compensated cirrhosis. *Gastroenterology* 133: 481–488, 2007.
43. Ripoll C, Groszmann RJ, Garcia-Tsao G, Bosch J, Grace N, Burroughs A, Planas R, Escorsell A, Garcia-Pagan JC, Makuch R, Patch D, Matloff DS. Hepatic venous pressure gradient predicts development of hepatocellular carcinoma independently of severity of cirrhosis. *J Hepatol* 50: 923–928, 2009.
44. Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Mechanisms of insulin resistance in humans and possible links with inflammation. *Hypertension* 45: 828–833, 2005.
45. Shah V, Toruner M, Haddad F, Cadelina G, Papapetropoulos A, Choo K, Sessa WC, Groszmann RJ. Impaired endothelial nitric oxide synthase activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 117: 1222–1228, 1999.
46. Tietge UJ, Selberg O, Kreter A, Bahr MJ, Pirlich M, Burchert W, Muller MJ, Manns MP, Boker KH. Alterations in glucose metabolism associated with liver cirrhosis persist in the clinically stable long-term course after liver transplantation. *Liver Transpl* 10: 1030–1040, 2004.
47. Turnes J, Hernandez-Guerra M, Abraldes JG, Bellot P, Oliva R, Garcia-Pagan JC, Bosch J. Influence of beta-2 adrenergic receptor gene polymorphism on the hemodynamic response to propranolol in patients with cirrhosis. *Hepatology* 43: 34–41, 2006.
48. Villanueva C, Aracil C, Colomo A, Hernandez-Gea V, Lopez-Balaguer JM, varez-Urturi C, Torras X, Balanzo J, Guarner C. Acute hemodynamic response to beta-blockers and prediction of long-term outcome in primary prophylaxis of variceal bleeding. *Gastroenterology* 137: 119–128, 2009.
49. Wallukat G. The beta-adrenergic receptors. *Herz* 27: 683–690, 2002.
50. Zeng G, Nystrom FH, Ravichandran LV, Cong LN, Kirby M, Mostowski H, Quon MJ. Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells. *Circulation* 101: 1539–1545, 2000.

Downloaded from ajpgi.physiology.org on June 20, 2012

2. Justificación y objetivos específicos

La resistencia a la insulina (RI) es partícipe del papel fisiopatológico en la disfunción endotelial presente en las enfermedades cardiovasculares. Este fenómeno también se encuentra en diferentes enfermedades hepáticas crónicas, entre las cuales se encuentra la cirrosis hepática. Su presencia se ha relacionado con el desarrollo de esteatosis, hiperglucemia y fibrosis hepática. Sin embargo, se desconoce si juega un papel en la disfunción endotelial intrahepática presente en la cirrosis, condición indispensable para desarrollar hipertensión portal, responsable de las diferentes complicaciones clínicas que acontecen a lo largo de la historia natural de la enfermedad. Desde un punto de vista molecular, se conoce que la vía de señalización de la insulina comparte diferentes mecanismos o señales intracelulares con la vía beta-adrenérgica, motivo por el cual es plausible también plantearse un potencial efecto de la resistencia a la insulina sobre la vía beta-adrenérgica.

Realizando un paralelismo con el campo de las enfermedades cardiovasculares, la *hipótesis* de trabajo de este estudio fue que la RI participa en el desarrollo y progresión de la hipertensión portal. Por tanto, el *objetivo principal* del presente estudio fue el de evaluar la relación entre la hemodinámica hepática y sistémica y el grado de RI, estimado a partir del índice HOMA-2. Los *objetivos secundarios* fueron la búsqueda del valor del índice HOMA-2 capaz de predecir la presencia de HPCS y por ende la presencia de varices esofágicas y la posible influencia de la RI sobre la respuesta hemodinámica al bloqueo agudo beta-adrenérgico.

3. Resultados

- Se escogieron 82 individuos sanos con normopeso y sin el antecedente familiar de diabetes, provenientes de la misma área que la cohorte cirrótica, para establecer el valor normal del índice HOMA-2 en nuestro medio. Un valor >2,4 definió RI en la cohorte a estudiar.

- Las características basales de la cohorte se muestran en la Tabla 1 del artículo. Brevemente, se incluyeron 49 pacientes (27 hombres y 22 mujeres) con una cirrosis hepática de etiología predominantemente vírica (50% hepatitis crónica VHC) y enólica (30%) con un grado de insuficiencia hepatocelular moderada (valor medio de la clasificación Child-Pugh B, 7±2 puntos). El 50% de los pacientes presentaba varices esofago-gástricas y la mayoría de ellos se encontraban estables en el momento del estudio (un 32% presentaban ascitis). Todos presentaban hipertensión portal con un valor medio del GPVH 15,5 ± 6 mmHg.

- El valor medio del índice HOMA-2 de la cohorte fue de 3 ±1,4 presentando el 61% (30 pacientes) RI con un valor medio 3,9 ± 1. En este subgrupo, la insulina fue significativamente superior respecto al grupo no-RI (191,5 ± 55 vs 81,8 ± 27,5 pmol/l; p= 0,00) así como los niveles del péptico C, indicador de hipersecreción pancreática (1,4 ±0,5 vs 0,9 ± 0,5 nmol/l; p=0,01). El GPVH también fue significativamente superior (17 ± 5,5 vs 13 ± 5 mmHg; p=0,002) y presentaban unas resistencias vasculares más bajas (1881,6 ± 885 vs 2376 ± 553 dyn x s□m^{2} □cm^{-5};p=0,008). Consecuentemente, el subgrupo RI presentaba peor función hepática (índice MELD y clasificación Child-Pugh) y mayor tendencia a presentar ascitis y varices. El análisis multivariado de regresión logística determinó el tiempo de protrombina como el único factor independiente predictivo de RI.

- Si se evalúa la cohorte en función del grado de hipertensión portal, 38 pacientes (77,5%) presentaban HPCS con un valor medio del GPVH 17,5 ± 5 mmHg. Las características clínicas, bioquímicas y hemodinámicas se muestran en la Tabla 2 del artículo. Previsiblemente, presentaban una función hepatocelular significativamente peor y mayor presencia de varices y ascitis respecto al subgrupo con un GPVH < 10 mmgH. Así mismo, el valor medio del índice HOMA-2 también se encontraba elevado (valor medio 3,4 ± 1,3 *vs* 1,85 ± 1,2; p=0,001). El análisis multivariado confirmó el índice HOMA-2 y el tiempo de protrombina como únicos factores independientes relacionados con la presencia de HPCS.

- Se halló una débil pero significativa correlación positiva entre el GPVH y el índice HOMA-2 (r^2= 0,19; p= 0,02) de toda la muestra (Figura 2 del artículo). Sin embargo, cuando sólo se tenía en cuenta el subgrupo de pacientes con HPCS esta asociación no resultaba significativa (r^2= 0,02; p= 0,29).

- Evaluando solamente los pacientes con HPCS, el 71% (27 pacientes) presentaban RI con un valor medio del índice HOMA-2 de 3,8 ± 1,0 (Tabla 3 del artículo). Si los comparábamos con los 11 pacientes con HPCS pero no-RI , estos pacientes presentaban significativamente mayor índice de masa corporal, menor tiempo de protrombina y unas resistencias vasculares sistémicas más bajas con una tendencia a mayor GPVH (18,5 ± 5 *vs* 16 ± 4,5 mmHg**;** p=ns). Sin embargo, el resto de variables clínicas (como la presencia de ascitis o varices), bioquímicas y hemodinámicas no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. No se hallaron diferencias en los valores de fvW y NO en sangre periférica y vena suprahepática entre grupos, como indicadores de disfunción endotelial. El análisis multivariado de regresión logística confirmó, al igual que cuando evaluábamos los 49 pacientes, el tiempo de protrombina (la

única variable representativa de la función hepática), como factor predictor independiente de RI junto con el índice de masa corporal.

- Se evaluó el metabolismo de la insulina entre los 38 pacientes con HPCS (Tabla 3 del artículo) mediante la ratio péptido C/ insulina M. Esta ratio fue inferior entre los pacientes con RI (25 pacientes) lo que parece indicar que el metabolismo de la insulina estaba disminuido en dicho grupo pero sin alcanzar la significación estadística (8 ±2,9 (25 pacientes RI) *vs* 10,3 ± 4,5 (10 pacientes no-RI); p=0,09). Como consecuencia, se halló una asociación inversa entre el índice de HOMA-2 y la ratio péptido C/ insulina M, r= -0,35; 0,04), lo que indicaba que a menor aclaramiento de la insulina, aparecía un mayor valor del índice HOMA-2 (Figura 3 del artículo).

- A continuación, se evaluó toda la muestra en función de si los pacientes presentaban varices esófago-gástricas en la endoscopia digestiva alta. Como parecía lógico, los 27 pacientes que tenían varices presentaban una función hepatocelular y una evaluación hemodinámica más deterioradas (Tabla 4 del artículo). Los niveles de HOMA-2 también fueron estadísticamente superiores (3,4 ± 1,3 vs 2,5 ± 1,4; p=0,02) con valores de insulina significativamente superiores y valores de glucosa plasmática similares. Sin embargo, el análisis multivariado confirmó la medición del GPVH como único factor independiente capaz de predecir la presencia de varices esófago-gástricas.

- Finalmente se evaluó como objetivo secundario la respuesta hemodinámica a la infusión aguda de propranolol entre los 38 pacientes con HPCS. El estudio no halló diferencias entre pacientes RI y no-RI, presentando un porcentaje de respondedores similar (65 % en pacientes RI frente al 64% en no-RI).

4. Conclusiones

- En pacientes con cirrosis hepática no diabéticos que han desarrollado hipertensión portal clínicamente significativa presentan valores del índice HOMA-2 elevados.

- Probablemente, estos valores se asocian más al desarrollo de circulación colateral porto-sistémica, fenómeno asociado a la presencia de hipertensión portal, que a un empeoramiento de la disfunción endotelial intrahepática debido a la presencia de RI. De este modo, el índice de HOMA-2 podría ser un método no invasivo predictivo de HPCS.

- La presencia de RI no influye en la respuesta hemodinámica a la infusión aguda de propranolol endovenoso.

5. Discusión

El presente estudio confirma que la presencia de RI, estimada a partir del índice de HOMA-2, es muy frecuente. El 60% de los pacientes de la cohorte presentaban valores > 2,4. Si tenemos en cuenta sólo el subgrupo de pacientes con HPCS esta proporción es superior (> 70%). El índice de HOMA-2 y el tiempo de protrombina fueron los únicos factores independientes capaces de predecir HPCS en el análisis multivariado. Tras estos resultados, resulta plausible pensar que la RI podría jugar un papel en la progresión de la hipertensión portal. Sin embargo, la correlación positiva entre el índice HOMA-2 y el GPVH fue débil y se perdía cuando sólo evaluamos los pacientes con HPCS.

El índice de HOMA, calculado a partir de los valores de insulina y glucemia basales, puede estar reflejando dos situaciones coexistentes en la cirrosis. Por un lado el estado hipersecretor de la función beta-pancreática, como lo demuestran los valores elevados del péptido C en los pacientes con RI, y por otro, una disminución del aclaramiento hepático de la insulina como consecuencia del *shunting* porto-sistémico, como se observa a partir

de la relación inversa entre el índice HOMA-2 y el ratio péptido C/ insulina M. Si añadimos la falta de correlación entre los valores de NO y del fVW, como marcadores de disfunción endotelial, y el índice HOMA-2, parece lógico haber confirmado la escasa correlación entre el GPVH y el índice de HOMA-2. Reflejaría la presencia de colateralización, fenómeno más presente cuanto más progresa el grado de hipertensión portal, y no una mayor disfunción endotelial asociada al estado de insulino resistencia. Estos hallazgos permitirían presentar el índice HOMA-2 como un método no invasivo capaz de predecir HPCS y su asociación con la presencia de varices esofágicas. Los datos obtenidos son congruentes con los recientemente publicados en un estudio en el que tras la oclusión de shunts portosistémicos mejoraba la hiperinsulinemia existente en pacientes con cirrosis e hipertensión portal (6) y su asociación con la presencia de VE. Sin embargo a día de hoy, dichos hallazgos no permiten sustituir la excelente asociación que existe entre el GPVH y la presencia de varices gastro-esofágicas.

En resumen, el artículo 1 sugiere que los valores del índice HOMA-2 elevados en la cirrosis hepática no reflejan exclusivamente la presencia de insulino-resistencia sino también un componente importante de colateralización porto-sistémica. Por este motivo, el HOMA-2 podría ser un parámetro no invasivo para valorar HPCS.

V. ARTÍCULO 2

1. Artículo origina publicado

Factor de impacto : 7.553

LIVER

Cardiovascular Risk Factors and Systemic Endothelial Function in Patients With Cirrhosis

Annalisa Berzigotti, MD[1–3], Eva Erice, MD[1], Rosa Gilabert, MD[1,2], Enric Reverter, MD[1,2], Juan G. Abraldes, MD[1,2], Juan Carlos García-Pagán, MD[1,2] and Jaime Bosch, MD[1,2]

OBJECTIVES: Cardiovascular risk factors (CVRF) lead to systemic endothelial dysfunction. It has been suggested that in cirrhosis, cardiovascular risk is low and systemic endothelial function is enhanced. However, there is no prospective study evaluating the relationship between cardiovascular risk and systemic endothelial function in cirrhosis, which was investigated here.

METHODS: In 47 patients with cirrhosis (33 males; median Child-Pugh score 8; median age 55 years), we evaluated: laboratory parameters, hepatic and systemic hemodynamics, CVRF, 10-year global cardiovascular risk by Framingham score, and presence of carotid plaques. Systemic endothelial dysfunction was investigated non-invasively by flow-mediated dilatation (FMD) of the brachial artery by ultrasound and defined as FMD <10%.

RESULTS: Cardiovascular risk (median 7%) was low in 25%, moderate in 26%, moderately high in 40%, and high in 9%. Fifty-three percent of patients had systemic endothelial dysfunction. Systemic endothelial dysfunction (low FMD) increased in parallel with CV risk (linear trend $P=0.039$) and was higher in patients overweight or obese. Conversely, FMD increased in parallel with Child-Pugh/Mayo Clinic Model for End-stage Liver Disease (MELD) score, bilirubin, serum sodium, plasma renin activity, leukocyte count, platelet count, and with lower arterial pressure, suggesting that enhanced FMD is a feature of advanced liver failure and inflammation. Cardiovascular risk, bilirubin, leukocyte count, and arterial pressure remained independently associated with systemic endothelial dysfunction.

CONCLUSIONS: CV risk was not low in our studied patients with cirrhosis, and systemic endothelial dysfunction was frequent in this population. In cirrhosis, similar to general population, cardiovascular risk impaired systemic FMD, although liver failure attenuated endothelial dysfunction.

Am J Gastroenterol 2013; 108:75–82; doi:10.1038/ajg.2012.362; published online 13 November 2012

INTRODUCTION

Cirrhosis is characterized by major circulatory disturbances, in both the intrahepatic and systemic vascular systems. The intrahepatic circulation in cirrhosis exhibits endothelial dysfunction with impaired nitric oxide (NO) bioavailability, which constitutes one of the mechanisms leading to portal hypertension (1). Recent evidence suggests that oxidative stress plays a pivotal role in determining intrahepatic endothelial dysfunction (1). This is comparable to what happens in the systemic vascular bed in patients with atherosclerotic disease, in whom cardiovascular risk factors (CVRF) determine systemic endothelial dysfunction (2), since NO is a key antiatherogenic molecule (3).

On the other hand, the systemic circulation in cirrhosis frequently features NO overproduction (2) and enhanced endothelial function (4–7). These mechanisms are thought to play a key role in the development of the hyperdynamic syndrome that is typically associated with portal hypertension and end-stage liver disease (8). Actually, it has traditionally being thought that liver failure may in some way protect from cardiovascular disease (9-11).

Cirrhosis typically occurs at an age coincidental with that of advanced atherosclerosis, and given that CVRF are mostly secondary to poor lifestyle habits that are increasingly frequent in the general population of western countries, it would be anticipated that patients with cirrhosis should have similar CVRF as

[1]Hepatic Hemodynamic Laboratory, Liver Unit, Barcelona, Spain; [2]Centre de Diagnostic per l'Imatge, Hospital Clinic, Institut d'Investigacions Biomediques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain; [3]Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), University of Barcelona, Barcelona, Spain. **Correspondence:** Jaime Bosch, MD, Hepatic Hemodynamic Laboratory, Liver Unit, Hospital Clinic, c/Villarroel 170, Barcelona 08036, Spain. E-mail: jbosch@clinic.ub.es
Received 2 April 2012; accepted 15 September 2012

© 2013 by the American College of Gastroenterology

non-cirrhotic subjects. Recent retrospective observations in patients on the waiting list for liver transplantation support this hypothesis (12). Therefore, one would expect that exposure to CVRF might negatively affect systemic endothelial function in cirrhosis; however, this issue has not been adequately investigated so far.

Flow-mediated vasodilation (FMD) of the brachial artery by means of ultrasonography (13) is a well established and highly standardized non-invasive test to assess systemic endothelial function in humans in real-time (14,15). The test is based on the assumption that the vasodilatory capacity of a vessel during post-ischemic hyperemia depends on a preserved NO synthesis and release (14). In non-cirrhotic subjects, CVRF impair FMD due to oxidative stress-induced systemic endothelial dysfunction (16). FMD has been used only in one study in patients with cirrhosis (17), showing that it is increased in patients with ascites.

The present study was aimed at investigating: (i) the prevalence of significant CVRF in patients with cirrhosis referred for hepatic hemodynamics assessment to a tertiary Hospital in Barcelona, a Mediterranean city with relatively low incidence of cardiovascular disease;(18,19) (ii) to verify whether in analogy to what occurs in non-cirrhotic subjects, CVRF in patients with cirrhosis might represent an independent factor negatively modulating systemic endothelial function, resulting in a higher prevalence of systemic endothelial dysfunction in patients with higher cardiovascular risk; and (iii) the relationship between systemic endothelial function and liver failure.

METHODS

Patients

This prospective cross-sectional study included 47 consecutive patients with cirrhosis (33 men, 14 women) referred to our Center for the measurement of hepatic venous pressure gradient (HVPG). Patients were considered eligible if the three following inclusion criteria were fulfilled: age 18–75 y/o, cirrhosis proven by biopsy or by clinical, laboratory and radiological data and HVPG ≥10 mm Hg. Patients treated with diuretics due to previous episodes of ascites were considered decompensated.

Exclusion criteria were: pregnancy, ongoing treatment with drugs that can alter FMD (nebivolol, angiotensin-converting enzyme inhibitors, angiotensin receptor blockers, and statins), hepatocellular carcinoma, portal vein thrombosis, and denial of informed consent.

The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Hospital Clinic. The nature of the study was explained to the patients, and informed consent was obtained in each case, according to the principles of the Declaration of Helsinki (revision of Edinburgh 2000).

Assessment of CVRF and global cardiovascular risk

The following CVRF were considered relevant to our study and were specifically investigated through a questionnaire on inclusion: age, personal and family history of cardiac ischemic disease, body mass index, cigarette smoking status, diabetes, systemic arterial hypertension, dyslipidemia (hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia), and alcohol intake. Systolic, diastolic, and mean arterial pressure were measured during the hepatic vein catheterization every 5 min by a non-invasive automatic sphygmomanometer (see below). Laboratory tests were obtained at inclusion.

The 10-year risk of cardiovascular events (global cardiovascular risk) was calculated according to the Framingham algorithm, based on categorical values of age, total cholesterol, high-density lipoprotein-cholesterol, blood pressure, smoking status, and diabetes, for each subject (20). As suggested by ATPIII (21), the cardiovascular risk was categorized as follows: Low risk (≤1 risk factor and 10-years calculated risk <10%), moderate risk (>1 risk factor and calculated risk <10%), moderately high risk (calculated risk 10–20%), and high risk (calculated risk >20%). The presence of atherosclerotic plaques in the right and left common and internal carotid arteries was assessed by ultrasound as a marker of cardiovascular risk (22). Plaques were defined as focal intrusions into the lumen ≥1.2 mm thick, on a standardized imaging protocol (B-mode and color Doppler examination, on both longitudinal and transverse planes by using a linear 10 MHz transducer connected to the same US equipment employed for FMD measurement) (23).

FMD of brachial artery by ultrasound

FMD measurements were performed the day before HVPG measurement by a single operator experienced in this technique who holds a low intra observer variability (<5%). According to current recommendations (24), patients were examined after 20 min of rest in a quiet and darkened room; all were fasting for at least 8 h, and had been instructed of avoiding smoking, drinking alcohol or coffee, and eating food with high-fat content in the previous 12 h. In the supine position, a standard cuff was positioned around the right arm, 2 inches below the antecubital fossa.

A 10-MHz ultrasound linear transducer connected to ACUSON Sequoia 512 (Acuson, Mountain View, CA, USA) ultrasound system was used to acquire images of the right brachial artery. After baseline images were obtained for 2 min, the cuff was inflated to 250 mm Hg above to occlude the right brachial artery. The cuff was kept inflated for 5 min. Images of the right brachial artery were captured continuously for 5 min after cuff deflation. Videos of the acquired images of the brachial artery were analyzed with a previously validated semiautomated system (Brachyal analyzer, Medical Imaging Application LLC, USA).

The semiautomated readings (media-adventitial interfaces to media-adventitial interfaces) of these digitized images generated the baseline and maximum diameters of the brachial artery from which % FMD was computed as: ((maximum diameter – baseline diameter)/baseline diameter)×100. Endothelial dysfunction was defined as an FMD <10% (25).

HVPG measurement and systemic hemodynamics assessment

Patients underwent hepatic vein catheterization in the morning after at least 8 h fasting. Under local anesthesia, with ultrasonographic guidance (SonoSite, Bothell, WA) an 8-F venous catheter

introducer (Axcess; Maxxim Medical, Athens, TX, USA) was placed in the right internal jugular vein using the Seldinger technique. Thereafter, a 7-F balloon-tipped catheter (Edwards Lifesciences, Irvine, CA) was advanced into the right hepatic vein to measure wedged and free hepatic venous pressures (WHVP and FHVP, respectively) by the connection to external electro-mechanical transducer and polygraph (Mac-Lab, GE Healthcare, Freiburg, Germany). HVPG was calculated as WHVP – FHVP (26).

Under fluoroscopic control, a Swan-Ganz catheter (Edwars Laboratory, Los Angeles, CA) was advanced into the pulmonary artery for measurement of cardiopulmonary pressures and CO (cardiac output) by thermal dilution. Systolic, diastolic, and mean arterial pressure were measured every 5 min by a non-invasive automatic sphygmomanometer (Marquette Electronics, Milwaukee, WI). Heart rate was derived from continuous electrocardiogram monitoring. The systemic vascular resistance (dyne×s×cm^{-5}) was calculated as MAP (mm Hg) – right atrial pressure (mm Hg)×80/CO (l/min).

All hemodynamic measurements were performed in triplicate, and permanent tracings were recorded (26).

Statistical analysis

Data are described as mean±s.d.; for non-normally distributed variables median and range are also given. Comparisons between groups was made by Student's *t*-test or Mann–Whitney test when appropriate; proportions were compared by Fisher's test. Kruskal–Wallis test was used to compare continuous variables among different cardiovascular risk categories. Natural logarithmic (Ln) transformation was used for continuous numerical variables to achieve a normal distribution.

Correlations between FMD and continuous numerical variables were made by linear correlation Pearson's test (where *R* indicates the correlation coefficient) or by Spearman's test, respectively, for normally and non-normally distributed variables.

In order to identify which factors were independently associated with systemic endothelial dysfunction in our cohort of patients with cirrhosis, we generated and evaluated all possible models from those variables significant on univariate analysis (P value <0.10) by a specific SPSS script (*AllSetsReg V2011-02-04*, Domenech JM and Navarro JB, Laboratori d'Estadistica Aplicada, UAB, Barcelona, Spain). This script considers all possible combinations of the variables specified by the researchers and performs a backward stepwise logistic regression analysis; those variables explaining a statistically significant proportion of the variance ($P<0.1$) are maintained in the final model using the likelihood ratio test. The script finally classifies the calculated models according to different statistical parameters, including the AUC (area under the Receiver Operating Characteristic curve) and the Mallow's Cp. In this paper, the best model was chosen as the one with the minimum number of variables and minimum Mallow's Cp criterion.

The α value was set at 0.05. All P values are two-sided. Statistical analysis was performed with SPSS 15.0 package (SPSS, Chicago, IL).

RESULTS

Table 1 summarizes the main clinical, laboratory, and hemodynamic features of the included population.

FMD and cardiovascular risk

Table 1 shows in detail the distribution of CVRF in the studied population. As expected, smoking habit (40%), diabetes (23%), arterial hypertension (21%), dyslipidemia (19%), overweight or obesity (47%), and a family history of cardiovascular diseases (26%) were frequent in our patients with cirrhosis, especially in men.

The median 10-year global cardiovascular risk in the whole population was 7% (8% in men, 4.5% in women). According to the risk stratification suggested by ATPIII (21), 12/47 (25.5%) of the patients had a low cardiovascular risk, 12/47 (25.5%) had moderate cardiovascular risk, 19/47 (40.4%) had moderately high cardiovascular risk, and 4/47 (8.6%) had a high cardiovascular risk. The prevalence of carotid plaques increased (from 33% to 75%) as cardiovascular risk increased (Table 2).

All patients well tolerated the 5-min ischemia during FMD by brachial artery by means of ultrasonography. Mean FMD was 10.9±6.9% (median 9.6%) (Table 2). No gender differences in FMD were observed (males: 10.2±6.2% vs. females: 13.2±8.4%, NS), and in this population FMD did not correlate with age, plasma glucose, cholesterol, low-density lipoprotein-cholesterol, and triglycerides.

Twenty-two patients (47%) had a normal FMD (≥10%), while systemic endothelial dysfunction (FMD <10%) was observed in 25 patients (53%; mean FMD 6.4±2.8%). The proportion of patients with systemic endothelial dysfunction increased significantly as cardiovascular risk increased (Tables 2 and 3), being the lowest (17%) in patients with low cardiovascular risk and the highest (75%) in patients with high cardiovascular risk (Figure 1a). The only CVRF associated with systemic endothelial dysfunction was overweight/obesity (Figure 1b). Prevalence of carotid plaques was not statistically different in patients with and without endothelial dysfunction (44.0 vs. 63.6%, $P=0.178$).

FMD and markers of liver failure, portal hypertension, and hyperdynamic syndrome

FMD did not differ among the different etiologies of liver disease, except in patients with non-alcoholic steato-hepatitis-related cirrhosis who showed a trend for lower FMD (5.7±3.2 vs. 11.5±6.9%, $P=0.087$). FMD was similar in patients with and without esophageal varices (10.9±7.5 vs. 11.4±5.7%, $P=0.804$), as well as in those with and without ascites (11.6±7.2 vs. 10.8±6.9%, $P=0.702$), and did not correlate with HVPG or cardiopulmonary pressures.

FMD increased in parallel with worsening of liver function (bilirubin, Child, and MELD score), as well as with indicators of hyperdynamic syndrome (lower serum sodium, higher plasma renin activity, higher heart rate, and lower mean arterial pressure) (Table 3). Accordingly, the proportion of patients with systemic endothelial dysfunction decreased with deterioration of Child-Pugh class: (Figure 1c), being higher in compensated patients belonging to Child A class (71.4%), and the lowest in decompensated patients in Child C class (25%). However, within each of

© 2013 by the American College of Gastroenterology

Table 1. Main clinical and hemodynamic characteristics, and cardiovascular risk factors of the studied population

Characteristic	Total (n=47)
Age (years)	55±10
Etiology (alcohol/virus/NASH/auto-immune/Wilson/hemo-cromatosis)	24/17/3/1/1/1
Compensated/decompensated	16/31
Esophageal varices (n)	No=16 small=12 large=19
Ascites (%)	47.8%
Albumin (g/dl)	31.0±6.1
Bilirubin (mg/dl)	2.9±2.4
INR	1.52±0.41
Creatinine (mg/dl)	0.78±0.24
Serum sodium (mEq/l)	135±6
Plasma renin act. (ng/ml/h)	1.63±4.15
Median (range)	0.20 (0.01–19.50)
Child score	7.9±2.3
Median (range)	8 (5–12)
MELD score	13±5
Median (range)	12 (5–29)
Platelet count (n^3/mmc)	111±79
Leukocyte count (n^3/mmc)	5.3±2.6
HVPG (mmHg)	18.1±4.3
Mean arterial pressure (mmHg)	83±14
Heart rate (beats/min)	74±11
Systolic blood pressure (mmHg)	118±19
Diastolic blood pressure (mmHg)	65±13
Body mass index (kg/m²)	26.0±4.5
Overweight, n (%)	15 (31.9)
Obese, n (%)	8 (17.0)
Cardiac index (l/min/m²)	4.5±1.5
Systemic vascular resistance (dynes×s×cm^{-5})	861±338
Right atrial pressure (mmHg)	6.2±2.9
Fasting glucose (mg/dl)	104±24
Total cholesterol (mg/dl)	136±45
HDL-cholesterol (mg/dl)	31±45
LDL-cholesterol (mg/dl)	87±33
Triglycerides (mg/dl)	89±42
Diabetes (%)	23.4
Smoking (%)	40.4
Hypertension (%)	21.3
Dyslipidemia (%)	19.1
Family history of ischemic CV disease (%)	25.5
Personal history of myocardial infarction (%)	0
Alcohol no/active drinker/<1 year abstinence/>1 year abst	22/5/9/11

CV, cardiovascular; HDL, high-density lipoprotein; HVPG, hepatic venous pressure gradient; INR, international normalized ratio; LDL, low-density lipoprotein; MELD, Mayo Clinic Model for End-stage Liver Disease; NASH, non-alcoholic steato-hepatitis.
Data are represented as mean±s.d.

the Child-Pugh classes, the proportion of systemic endothelial dysfunction increased according to the cardiovascular risk (Figure 2).

Finally, FMD showed a positive correlation with leukocyte count ($r=0.462$, $P<0.001$) and platelet count ($r=0.377$, $P=0.010$).

Independent predictors of systemic endothelial dysfunction in cirrhosis

Variables significantly different on univariate analysis are shown in Table 3. All the remaining CV-risk associated variables (age, systolic blood pressure, diastolic blood pressure, fasting glucose, total cholesterol, high-density lipoprotein-cholesterol, low-density lipoprotein-cholesterol, triglycerides, prevalence of diabetes, smoking, hypertension, dyslipidemia, family history of acute myocardial infarction, carotid plaques), and chronic liver disease-associated variables (prevalence of decompensated cirrhosis, esophageal varices, ascites, albumin, international normalized ratio, creatinine, HVPG, CO, systemic vascular resistance, right arterial pressure, and mean pulmonary arterial pressure) were similar in patients with and without endothelial dysfunction.

According to the results of univariate analysis, the following sets of variables were included in the multivariate analysis: class of cardiovascular risk according to ATPIII (categorical), presence of overweight/obesity (categorical); heart rate, mean arterial pressure, plasma renin activity, and serum sodium; bilirubin, Child score, and MELD score; leukocyte count and platelet count. Pulmonary capillary pressure was not included in the multivariate analysis due to a scarce biological plausibility of an association with FMD.

Table 4 summarizes the final model (AUC 0.907; Cp 4.199, $P<0.0001$), including four independent variables. As shown, cardiovascular risk class increased the odds of systemic endothelial dysfunction, while Ln bilirubin, Ln leukocyte count, and Ln mean arterial pressure decreased the odds of systemic endothelial dysfunction.

Since carotid plaques are an objective and well-accepted marker of CV risk while Framingham score has not been specifically validated in cirrhosis, we performed a multivariate analysis forcing presence/absence of carotid plaques in the analysis instead of CV risk category. In this case, the final model included Ln bilirubin (OR (odds ratio): 0.29; 95% CI (confidence interval): 0.10–0.83; $P=0.02$), Ln leukocytes (OR: 0.07; 95% CI: 0.009–0.55; $P=0.01$) and presence of overweight (OR: 4.33; 95% CI: 1.02–25.5; $P=0.04$) or obesity (OR: 35.9; 95% CI: 1.06–74.1; $P=0.04$) as independent predictors of systemic endothelial dysfunction, with bilirubin and leukocytes protective, and obesity a risk factor.

DISCUSSION

Cardiovascular risk has been traditionally considered low in patients with cirrhosis (27–29). However, cirrhosis markedly shortens the life span, and due to the competing risk of death from liver-related events, it is likely that cardiovascular risk may have been underestimated in this population. In the liver transplantation era, the assessment of cardiovascular risk in patients with cirrhosis has gained importance (30), since the risk of cardiovascular

Table 2. Brachial artery diameters, flow-mediated dilatation (FMD), and prevalence of systemic endothelial dysfunction and of carotid plaques in the total population and according to cardiovascular risk class

	Total population (n=47)	Low CV risk (n=12)	Moderate CV risk (n=12)	Moderately high CV risk (n=19)	High CV risk (n=4)	*P* value
Baseline diameter (mm)	4.74±1.61	3.84±1.12	5.09±1.98	4.81±1.40	5.83±1.80	0.009
Post-deflation diameter (mm)	5.23±1.75	4.42±1.24	5.64±2.20	5.21±1.47	6.34±2.27	0.044
FMD (%)	10.9±6.9	15.9±8.6	11.0±7.2	8.6±4.6	7.7±4.4	0.046
Systemic endothelial dysfunction, *n* (%)	25/47 (53.1%)	2/12 (16.6%)	6/12 (50%)	14/19 (73.7%)	3/4 (75%)	0.039
Prevalence of carotid plaques, *n* (%)	27/47 (57.4%)	4/12 (33.3%)	6/12 (50%)	12/19 (63.2%)	3/4 (75%)	0.064

CV, cardiovascular.
P value refers to Kruskal–Wallis test of the comparison of the different cardiovascular risk class.

Table 3. Cardiovascular risk factors and cirrhosis-related variables which were found significantly different in patients with and without systemic endothelial dysfunction on univariate analysis ($P \leq 0.10$ in bold)

Characteristic	Normal systemic endothelial function (FMD ≥10%, n=22)	Systemic endothelial dysfunction (FMD <10%, n=25)	*P* value	Linear correlation (*R*) with FMD	*P* value
Mean arterial pressure (mmHg)	82±14	88±15	**0.081**	−0.243	0.103
Body mass index (kg/m²)	24.5±4.2	27.3±4.2	**0.037**	−0.131	0.393
Overweight, *n* (%)	5 (22.7)	10 (40.0)			
Obese, *n* (%)	2 (9.1)	6 (24.0)			
Heart rate (beats/min)	77±12	71±9	**0.046**	0.167	0.273
CV risk class (%)					
Low	45.5	8			
Moderate	27.3	24	**0.015**		
Moderately high	22.7	56			
High	4.5	12			
Child-Pugh score	8.8±2.5	7.2±1.8	**0.016**	0.277	**0.063**
MELD score	15±6	12±4	**0.066**	0.265	**0.076**
Bilirubin (mg/dl)	3.9±2.9	2.9±1.3	**0.004**	0.345	**0.019**
Serum sodium (mEq/l)	133±7	137±3	**0.015**	−0.497	**<0.0001**
Plasma renin activity (ng/ml/h)	2.88±5.22	0.69±1.38	**0.088**	0.537	**0.001**
Platelet count (n³/mmc)	127±101	96±51	0.190	0.377	**0.010**
Leukocyte count (n³/mmc)	6.58±3.00	4.24±1.68	**0.002**	0.462	**0.001**
Pulmonary capillary pressure (mmHg)	8.7±4.0	11.4±5.0	**0.064**	−0.090	0.563

CV, cardiovascular; FMD, flow-mediated dilatation; MELD, Mayo Clinic Model for End-stage Liver Disease.

events after orthotopic liver transplantation (OLT) is increased (31), and patients with a high pre-OLT cardiovascular risk are at higher risk of suffering fatal cardiovascular events after OLT (32). Indeed, significant coronary artery disease is found in 2.5 to 27% of patients screened on listing for OLT (33).

In this cross-sectional, prospective study, we assessed thoroughly the global cardiovascular risk according to the ATPIII guidelines (21) in a group of consecutive patients with cirrhosis. Our findings indicate that cardiovascular risk is not unremarkable in this population; indeed in this population, we observed a high prevalence of carotid plaques, which are an accepted predictor of occult coronary artery disease and coronary events (22,34). In this regard, the 57.4% prevalence of carotid plaques in this study was nearly identical to the 56.8% prevalence reported in a recent Italian US-Doppler study in patients with cirrhosis (27), and is very similar to that observed in an age-matched general population in our geographical area (57%) (23). Nonetheless, it should be acknowledged that we included only patients referred for HVPG measurement to

© 2013 by the American College of Gastroenterology

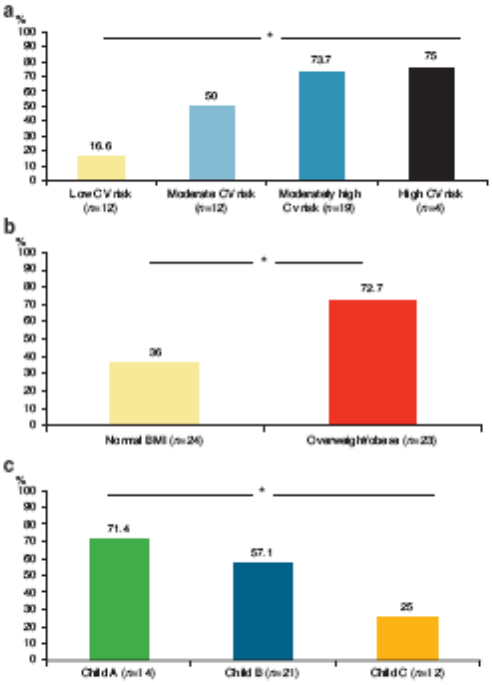

Figure 1. Proportion of patients with systemic endothelial dysfunction (flow-mediated dilatation (FMD) <10%) according to: (a) cardiovascular risk stratification (χ^2 $P=0.06$; *linear trend $P=0.039$). (b) Normal weight vs. overweight/obesity (*$P=0.012$). (c) Child-Pugh class (χ^2 $P=0.05$; *linear trend $P=0.021$).

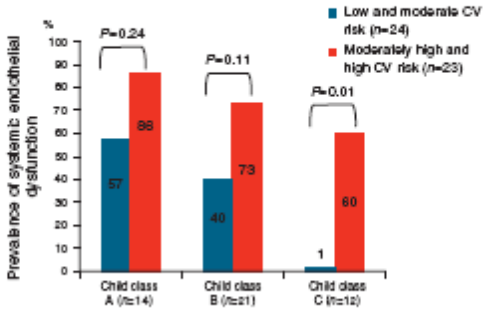

Figure 2. Proportion of patients with systemic endothelial dysfunction according to categorized severity of the liver disease (Child-Pugh class A, B, and C), and cardiovascular risk (low and moderate risk vs. moderately high and high risk). Please note that the proportion of patients with systemic endothelial dysfunction decreases as liver failure worsens, but that within each Child class a higher cardiovascular risk is associated with increased frequency of systemic endothelial dysfunction.

a tertiary referral center and we cannot exclude that a selection bias might be present, leading to over- or underestimation of the real burden of CV risk in real-life patients with cirrhosis.

In the general population, many studies have shown that the non-invasive test of FMD is capable of predicting long-term cardiovascular risk, and then has been widely used (13,15,16,25).

In this context, at first glance it would seem somehow surprising that in half of our patients with cirrhosis, FMD was not reduced, but above normal values (14) and that it increased further in parallel with worsening liver failure. However, these data are in agreement with previous studies showing an increased systemic vascular endothelial-dependent reactivity in cirrhosis, as assessed with other techniques (4–7) and with the limited experience using FMD (17). Having said that, our data also demonstrate that about half of patients with cirrhosis show systemic endothelial dysfunction, which is particularly frequent among those with a greater number of CVRF and thereby with a higher 10-year cardiovascular risk, as assessed by the Framingham equation. Indeed, multivariate analysis pointed out that cardiovascular risk is an independent factor worsening FMD in cirrhosis, as opposed to factors related with liver failure, that are independently associated with better FMD. Because of the influence of these opposing factors on systemic vascular reactivity, FMD in patients with cirrhosis and portal hypertension may not reflect accurately the global cardiovascular risk of these patients. This is strengthened by the observation that when we forced in the multivariate analysis, an objective marker of CV disease—namely presence of carotid plaques, instead of CV risk category—only liver-related variables and overweight/obesity were identified as independent predictors of systemic endothelial dysfunction. This suggests that liver failure indeed acts as a confounder when interpreting the results of FMD in patients with cirrhosis. In agreement with this interpretation, previous data suggested that in patients with cirrhosis and no known CVRF, more advanced degrees of liver failure were associated with greater increases in FMD (35). This confounding effect should be especially considered in patients with advanced liver failure, such as those listed for OLT, in whom FMD may be normal (and therefore suggest a low cardiovascular risk) despite the coexistence of several CVRF, and hence a high cardiovascular risk, due to the fact that the hyperdynamic syndrome of advanced cirrhosis masks the altered vascular reactivity. In this regard, we acknowledge that a limitation of the present study is the lack of a long-term follow-up allowing assessing the real incidence of CV events in this specific population. In the absence of such a robust clinical end point it cannot be ruled-out that our findings could not have a different interpretation. Specifically, it might be hypothesised that normal/high FMD in cirrhosis indicates a true low CV risk due to a protective effect of liver disease against CV disease, while standard CV risk classification is not effective in this population. Even if this is possible from a speculative point of view, it is not supported by recent prospective data showing that patients with genotype 1 hepatitis C virus-related chronic liver disease have a high risk

Table 4. Variables independently associated with systemic endothelial on multivariate analysis

Variable	Multivariate OR (95% CI)	*P* value
Class of CV risk[a]		0.009
Low	1	
Moderate	6.15 (1.3–68.2)	
Moderately high	35.9 (2.1–98.1)	
High	49.4 (2.5–152.0)	
Ln leukocyte count	0.02 (0.001–0.40)	0.01
Ln bilirubin	0.33 (0.09–0.91)	0.028
Ln mean arterial pressure	0.03 (0–8.86)	0.115

CI, confidence interval; CV, cardiovascular; Ln, natural logarithm; OR, odds ratio.
[a]Low CV risk was used as reference category.

of early carotid atherosclerosis independent of traditional risk factors, suggesting that liver disease *per se* should be considered a CV risk factor in this setting (36). Obviously, this open question can only be answered by specifically designed prospective studies in patients with cirrhosis using robust clinical end points.

We could not reproduce the result obtained by Cazzaniga *et al.* (17) showing that FMD was increased in patients with ascites vs. compensated patients. This might be due to differences in the profile of cardiovascular risk of the patients included in the two studies, since only non-smokers and non-hypertensive patients were included in the published study (17); moreover, the above-mentioned study included a large proportion of patients with very severe liver failure (Child C), with an extremely high FMD.

Another interesting finding of our study is that leukocyte count is also independently and positively related with FMD. The interpretation of this finding remains speculative; however, increased leukocyte count in cirrhosis is frequently a clue of clinical infection or subclinical bacterial DNA translocation (37), which are associated with increased release of pro-inflammatory cytokines, augmented systemic NO bioavailability, splanchnic vasodilatation, and hyperdynamic syndrome. An increased FMD in this setting might represent another manifestation of this hemodynamic derangement. This interpretation would be in agreement with a previous study reporting that FMD increased in parallel with renal vasoconstriction (17), which represents the end of the spectrum of circulatory manifestations initiated by portal hypertension and splanchnic vasodilatation.

In conclusion, our findings suggest that systemic vascular reactivity in cirrhosis is influenced by a dual mechanism: it is up-regulated by liver failure and portal hypertension, while the presence of CVRF determines a decreased vascular reactivity, which is relevant in this population. The confounding effect of liver-related variables on FMD suggests that, contrary to the general population, this research tool cannot be used to predict the global cardiovascular risk in patients with cirrhosis. Studies using this method and studies addressing the cardiovascular system in patients with cirrhosis (such those about cirrhotic cardiomyopathy) should take into account an accurate inquire of the presence of CVRF and markers of cardiovascular disease, such as carotid atherosclerotic plaques.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been done as part of a PhD degree in Medicine of Eva Erice, at the Universitat Autònoma de Barcelona, Spain. We thank Ms. M.A. Baringo, L. Rocabert, and R. Saez for their expert technical hemodynamic assistance. We also express our gratitude to Ms. Clara Esteva for her secretarial support.

CONFLICT OF INTEREST

Guarantor of the article: Jaime Bosch, MD.
Specific author contributions: Designed the study: Annalisa Berzigotti and Jaime Bosch; collected the data: Annalisa Berzigotti and Eva Erice; performed the statistical analysis: Annalisa Berzigotti and Juan G. Abraldes; wrote the paper: Annalisa Berzigotti; performed the HVPG measurements and gave important intellectual contribution: Juan G. Abraldes, Eva Erice, and Enric Reverter; supervised the manuscript preparation: Juan Carlos García-Pagan and Jaime Bosch. All the authors read and approved the final version of the paper.
Financial support: This work was supported in part by grants from Instituto de Salud Carlos III (PS09/01261), Ministry of Economy and Competitivity; CIBERehd was funded by Instituto de Salud Carlos III.
Potential competing interests: None.

Study Highlights

WHAT IS CURRENT KNOWLEDGE

- ✓ In cirrhosis, systemic endothelial function is thought to be enhanced.
- ✓ Cardiovascular risk factors (CVRF) lead to systemic endothelial dysfunction in the general population.
- ✓ Systemic endothelial function can be studied non-invasively by a ultrasound-based method (flow-mediated dilatation of brachial artery, FMD).
- ✓ There is no prospective study evaluating the relationship between CVRF, systemic endothelial function, and liver function in patients with cirrhosis and portal hypertension.

WHAT IS NEW HERE

- ✓ Over a half of patients with cirrhosis shows systemic endothelial dysfunction and overall the cardiovascular risk is not low in cirrhosis.
- ✓ Systemic vascular reactivity in cirrhosis is increased by liver failure and portal hypertension, while it is decreased by cardiovascular risk factors.
- ✓ Flow-mediated dilatation (FMD) cannot be used to predict the global cardiovascular risk in patients with cirrhosis.

REFERENCES

1. Bosch J, Abraldes JG, Fernandez M *et al.* Hepatic endothelial dysfunction and abnormal angiogenesis: new targets in the treatment of portal hypertension. J Hepatol 2010;53:558–67.
2. Wiest R, Groszmann RJ. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough. Hepatology 2002;35:478–91.

© 2013 by the American College of Gastroenterology

3. Kharbanda RK, Deanfield JE. Functions of the healthy endothelium. Coron Artery Dis 2001;12:485–91.
4. Albillos A, Rossi I, Cacho G *et al.* Enhanced endothelium-dependent vasodilation in patients with cirrhosis. Am J Physiol 1995;268:G459–64.
5. Claria J, Jimenez W, Ros J *et al.* Increased nitric oxide-dependent vasorelaxation in aortic rings of cirrhotic rats with ascites. Hepatology 1994;20:1615–21.
6. Gadano AC, Sogni P, Yang S *et al.* Endothelial calcium-calmodulin dependent nitric oxide synthase in the *in vitro* vascular hyporeactivity of portal hypertensive rats. J Hepatol 1997;26:678–86.
7. Weigert AL, Martin PY, Niederberger M *et al.* Endothelium-dependent vascular hyporesponsiveness without detection of nitric oxide synthase induction in aortas of cirrhotic rats. Hepatology 1995;22:1856–62.
8. Iwakiri Y, Groszmann RJ. Vascular endothelial dysfunction in cirrhosis. J Hepatol 2007;46:927–34.
9. Howell WL, Manion WC. The low incidence of myocardial infarction in patients with portal cirrhosis of the liver: a review of 639 cases of cirrhosis of the liver from 17,731 autopsies. Am Heart J 1960;60:341–4.
10. Marchesini G, Ronchi M, Forlani G *et al.* Cardiovascular disease in cirrhosis--a point-prevalence study in relation to glucose tolerance. Am J Gastroenterol 1999;94:655–62.
11. Vanecek R. Atherosclerosis and cirrhosis of the liver. Bull World Health Organ 1976;53:567–70.
12. Blei AT, Mazhar S, Davidson CJ *et al.* Hemodynamic evaluation before liver transplantation: insights into the portal hypertensive syndrome. J Clin Gastroenterol 2007;41 (Suppl 3): S323–9.
13. Faulx MD, Wright AT, Hoit BD. Detection of endothelial dysfunction with brachial artery ultrasound scanning. Am Heart J 2003;145:943–51.
14. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ *et al.* Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. J Am Coll Cardiol 2002;39:257–65.
15. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM *et al.* Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. Lancet 1992;340:1111–5.
16. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K *et al.* Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. Circulation 2001;104:2673–8.
17. Cazzaniga M, Salerno F, Visentin S *et al.* Increased flow-mediated vasodilation in cirrhotic patients with ascites: relationship with renal resistive index. Liver Int 2008;28:1396–401.
18. INE base Instituto Nacional de Estadística (INE). Instituto Nacional de Estadística (INE), España 2010. Available from http://www.ine.es/inebmenu/indice.htm.
19. Grau M, Elosua R, Cabrera de LA *et al.* Cardiovascular risk factors in Spain in the first decade of the 21st Century, a pooled analysis with individual data from 11 population-based studies: the DARIOS study. Rev Esp Cardiol 2011;64:295–304.
20. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D *et al.* Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. Circulation 1998;97:1837–47.
21. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP). Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. Circulation 2002;106:3143–421.
22. Inaba Y, Chen JA, Bergmann SR. Carotid plaque, compared with carotid intima-media thickness, more accurately predicts coronary artery disease events: a meta-analysis. Atherosclerosis 2012;220:128–33.
23. Junyent M, Gilabert R, Nunez I *et al.* Carotid ultrasound in the assessment of preclinical atherosclerosis. Distribution of intima-media thickness values and plaque frequency in a Spanish community cohort. Med Clin (Barc) 2005;125:770–4.
24. Thijssen DH, Black MA, Pyke KE *et al.* Assessment of flow-mediated dilation in humans: a methodological and physiological guideline. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2011;300:H2–12.
25. Neunteufl T, Heher S, Katzenschlager R *et al.* Late prognostic value of flow-mediated dilation in the brachial artery of patients with chest pain. Am J Cardiol 2000;86:207–10.
26. Bosch J, Garcia-Pagan JC, Berzigotti A *et al.* Measurement of portal pressure and its role in the management of chronic liver disease. Semin Liver Dis 2006;26:348–62.
27. Berzigotti A, Bonfiglioli A, Muscari A *et al.* Reduced prevalence of ischemic events and abnormal supraortic flow patterns in patients with liver cirrhosis. Liver Int 2005;25:331–6.
28. Kane WC, Aronson SM. Cerebrovascular disease in an autopsy population. 4. Reduced frequency of stroke in patients with liver cirrhosis. Trans Am Neurol Assoc 1971;96:259–60.
29. Melato M, Mucli E, Poldrugo F *et al.* Stroke-cirrhosis relationship: an autopsy study in a heavy drinking population. Ital J Gastroenterol 1991;23:211–4.
30. Raval Z, Harinstein ME, Skaro AI *et al.* Cardiovascular risk assessment of the liver transplant candidate. J Am Coll Cardiol 2011;58:223–31.
31. Johnston SD, Morris JK, Cramb R *et al.* Cardiovascular morbidity and mortality after orthotopic liver transplantation. Transplantation 2002;73:901–6.
32. Dec GW, Kondo N, Farrell ML *et al.* Cardiovascular complications following liver transplantation. Clin Transplant 1995;9:463–71.
33. Keeffe BG, Valantine H, Keeffe EB. Detection and treatment of coronary artery disease in liver transplant candidates. Liver Transpl 2001;7:755–61.
34. Cournot M, Bura A, Cambou JP *et al.* arterial ultrasound screening as a tool for coronary risk assessment in asymptomatic men and women. Angiology 2012;63:282–8.
35. Angeloni L, Berzigotti A, Bianchi G *et al.* Systemic endothelial function evaluated by flow-mediated dilatation of brachial artery in patients with liver cirrhosis. J Hepatol 2005;42 (Suppl 2): 64.
36. Petta S, Torres D, Fazio G *et al.* Carotid atherosclerosis and chronic hepatitis C: a prospective study of risk associations. Hepatology 2012;55:1317–23.
37. Bellot P, Garcia-Pagan JC, Frances R *et al.* Bacterial DNA translocation is associated with systemic circulatory abnormalities and intrahepatic endothelial dysfunction in patients with cirrhosis. Hepatology 2010;52:2044–52.

1. Justificación y objetivos específicos

Los factores de riesgo cardiovascular están íntimamente relacionados con la aparición de disfunción endotelial en la población general, dando lugar a la aparición de complicaciones cardiovasculares. La cirrosis hepática como enfermedad vascular, también presenta alteraciones en el lecho vascular, produciéndose por un lado una disfunción endotelial a nivel intrahepático debido a una menor biodisponibilidad de NO. Por el contrario, a nivel de la circulación sistémica existe una superproducción de NO dando lugar a un estado circulatorio hiperdinámico. La población que padece cirrosis habitualmente también puede presentar de forma paralela hipertensión arterial, dislipemia o diabetes y desarrollar enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, este escenario tan frecuente en la práctica clínica diaria no ha sido evaluado, en el sentido de conocer si la presencia de factores cardiovasculares influye negativamente sobre la función endotelial sistémica incrementándose el riesgo cardiovascular, como ocurre en los pacientes no cirróticos, así como su influencia sobre el grado de hipertensión portal. A partir de esta reflexión, la *hipótesis* de este artículo fue que la presencia de factores de riesgo cardiovascular podrían influir de forma negativa tanto en la función endotelial sistémica como en la intrahepática en la cirrosis. Por consiguiente el *objetivo principal* de este estudio fue el de evaluar la relación existente entre el grado de disfunción endotelial sistémica y el grado de hipertensión portal según la presencia de factores cardiovasculares en un grupo de pacientes diagnosticados de cirrosis hepática. Como *objetivo secundario* se planteó la búsqueda de factores independientes predictivos del riesgo cardiovascular entre la población con cirrosis.

2. Resultados

- Las características clínicas y hemodinámicas de la muestra se exponen en la Tabla 1 del artículo. Se incluyeron 47 pacientes con cirrosis hepática de etiología enólica (51%) y vírica (35%) predominantemente, con una insuficiencia hepatocelular moderada (valor medio de 8 ± 2,3 puntos en la clasificación Child Pugh). La esteatosis hepática no alcohólica, como etiología de la cirrosis, estuvo representada en 3 pacientes. El 50% de los pacientes presentaban ascitis en el momento del estudio y el 65% de los pacientes presentaban varices esofágicas en la endoscopia digestiva alta. Todos presentaban hipertensión portal con un valor medio del GPVH 18 ± 4,3 mmHg.

- Los factores de riesgo cardiovascular se distribuyeron de la siguiente manera: 40 % tabaquismo, 23 % diabetes mellitus, 21% hipertensión arterial, 19% dislipemia , 47% sobrepeso u obesidad. Ningún paciente había presentado algún evento cardiovascular previamente y un 26 % de los pacientes presentaba antecedentes familiares de enfermedades cardiovasculares.

- El riesgo global de eventos cardiovasculares a 10 años (índice de Framingham) de todo la muestra fue bajo con una mediana de 7% (8% en hombres y 4,5 % en mujeres). El riesgo cardiovascular se estratificó como riesgo bajo en el 25,5 % de los pacientes, moderado en un 25,5%, moderadamente alto en el 40,4% y elevado riesgo cardiovascular en un 8,6% (4/47) de los pacientes.

- Las placas de ateroma en la arteria carótida se encontraron presentes en un 57,4% de los pacientes (Tabla 2 del artículo). Su presencia se incrementaba paralelamente con el grado de riesgo cardiovascular (desde un 33% al 75%; p=0.054).

- Se utilizó la dilatación mediada por flujo tras un estímulo de isquemia de la arteria braquial (DMF) para evaluar la presencia de disfunción endotelial sistémica, definiéndose

como una dilatación post-isquemia < 10%. El valor medio de la DMF de toda la cohorte fue de 10,9 ±6,9 %, de los cuales 22 pacientes presentaron valores normales de dilatación (≥10%), mientras que en 25 (53%) se evidenció una disfunción endotelial sistémica (media 6,4%±2,8) (Tabla 2 del artículo).

- No se halló correlación entre el grado de DMF y el GPVH o las presiones cardiopulmonares, la presencia de varices o de ascitis. Entre las diferentes etiologías, sólo los pacientes con esteatohepatitis no alcohólica presentó valores de dilatación post-isquemia inferiores pero sin alcanzar significación estadística respecto a otras etiologías (5,7% ±7,2 *vs* 10,8% ±6,9; p= 0.087).

- El grado de dilatación post-isquemia se incrementaba de forma paralela con el empeoramiento de la función hepática (clasificación Child Pugh o el índice MELD). Los pacientes con función endotelial sistémica normal (≥10% DMF) presentaban un estado de vasodilatación sistémica reflejo del síndrome hiperdinámico propio de la cirrosis (niveles más bajos de sodio plasmático, actividad aumentada de la enzima renina y menor presión arterial media (Tabla 3 del artículo). Consecuentemente, se halló un relación inversa entre la presencia de disfunción endotelial y la clasificación de Child-Pugh (71,4% Child A, 57,1% Child B, 25% Child C; p=0,021) (Figura 1c del artículo). Cuando se estratificaba según la clasificación Child-Pugh, dentro de cada clase, los pacientes con un riesgo cardiovascular moderadamente alto o elevado se asociaban con una mayor prevalencia de disfunción endotelial sistémica (Figura 2). Estas diferencias a pesar de ser importantes no llegaron a la significación estadística.

- El grado de dilatación post- isquemia (DMF) disminuía cuanto mayor era el grado de riesgo cardiovascular, por lo que la proporción de pacientes con disfunción endotelial sistémica también se incrementaba con el riesgo cardiovascular (p=0,039). De este modo, un 75% de los pacientes con un riesgo cardiovascular elevado tenían disfunción

endotelial sistémica, mientras que tan sólo un 17 % de los pacientes con un riesgo bajo lo presentaban. (Figura 1 a del artículo). La presencia de placas de ateroma se asociaba con la presencia de disfunción endotelial pero dicha asociación no alcanzó significación estadística (63,6 % vs 44%; p= 0.178).

- El índice de masa corporal (IMC) fue el único factor cardiovascular aislado que se asoció con disfunción endotelial sistémica (35% en pacientes con IMC normal *vs* 72,7% en pacientes con sobrepeso u obesidad; p= 0,012) (Figura 1b del artículo)

- El análisis multivariado identificó la escala de riesgo cardiovascular, el recuento leucocitario y los niveles de bilirrubina plasmática como factores independientes predictores de disfunción endotelial (Tabla 4 artículo 2). La escala de riesgo cardiovascular fue la única variable que incrementaba el riesgo de presentar disfunción endotelial. Los pacientes que presentaban un riesgo cardiovascular bajo presentaba una OR 1, riesgo moderado una OR 6,15 (1,3-68,2 , 95%IC), moderadamente alto una OR 35,9 (2,1-98,1 95%IC) y el subgrupo con riesgo elevado una OR 49,4% (2,5-152 95%IC). Mientras, un mayor recuento leucocitario y unos niveles más elevados de bilirrubina plasmática se asociaban con una menor presencia de disfunción endotelial (Tabla 3 del artículo), variables relacionadas con una peor función hepatocelular .

3. Conclusiones

- Los factores de riesgo cardiovascular están también presentes en los pacientes con cirrosis hepática y se asocian, como en la población general, con el desarrollo de disfunción endotelial sistémica.

- La presencia de disfunción endotelial sistémica no influye sobre el grado de hipertensión portal o la hemodinámica sistémica en la cirrosis.

- La técnica de la DMF para evaluar la presencia de disfunción endotelial sistémica aumenta según el grado de disfunción hepatocelular de forma independiente a la escala de riesgo cardiovascular, por lo que no debería utilizarse en la cirrosis hepática como método predictivo de eventos cardiovasculares.

4. Discusión

En congruencia con la literatura existente, el artículo 2 confirma que los pacientes cirróticos no están exentos de presentar eventos cardiovasculares. La existencia de RI y disfunción endotelial a partir de la presencia de factores cardiovasculares es habitual también en esta población, al igual que en la población no cirrótica. Por otra parte, el presentar un riesgo cardiovascular elevado no se acompaña de una peor función hepática pero sí de un mayor grado de disfunción endotelial sistémica y por tanto de la posibilidad de presentar eventos cardiovasculares.

Sin embargo, el presente estudio demuestra que la reactividad vascular sistémica en la cirrosis se encuentra sometida a un mecanismo dual y opuesto. Por un lado, existe un detrimento en la producción de NO debido a la presencia de factores cardiovasculares y por otro lado a una sobreproducción del mismo debido al síndrome hiperdinámico relacionado con la cirrosis. Este segundo mecanismo parece enmascarar la respuesta vasodilatadora que se obtiene en la dilatación mediada por flujo mediante ecografía cuando queremos evaluar la presencia de disfunción endotelial sistémica. Debido a este segundo mecanismo se obtienen respuestas aparentemente normales o incrementadas a pesar de presentar un elevado riesgo cardiovascular según el índice de Framinghan.

La excelente asociación que hallamos entre el riesgo cardiovascular y disfunción endotelial según la DMF en la población general, no aparece en los pacientes cirróticos, por lo que no debería utilizarse en esta población. La presencia de placas de aterosclerosis en las arterias

carótidas podría ser un marcador de disfunción endotelial y en consecuencia de eventos cardiovasculares. Sin embargo el presente estudio no fue capaz de demostrar dicha asociación. El análisis multivariado, identificó a la clasificación del riego cardiovascular como variable categórica capaz de predecir la presencia de disfunción endotelial sistémica. Sin embargo, debido al diseño transversal del estudio no se pudo evaluar si este riesgo cardiovascular se traduce realmente en mayor número de eventos cardiovasculares.

En resumen, el artículo 2 muestra que es frecuente hallar factores de riesgo cardiovascular en la población cirrótica. Éstos se asocian con la presencia de disfunción endotelial sistémica pero sin influir sobre el grado de hipertensión portal, las presiones cardiopulmonares o la progresión de la propia enfermedad hepática.

VI. DISCUSIÓN GLOBAL

El enfoque de la presente tesis doctoral desde el punto de vista del **deterioro vascular** en la cirrosis, ha permitido realizar una serie de paralelismos con las enfermedades vasculares y plantear una hipótesis de trabajo con el objetivo de buscar nuevos mecanismos que nos ayuden a entender un poco más la fisiopatología de la hipertensión portal en la cirrosis.

El incremento del tono vascular hepático es importante tanto en el desarrollo de la hipertensión portal como en la progresión de la enfermedad y se relaciona con la presencia inicial y progresiva de disfunción endotelial sinusoidal. Como se ha comentado anteriormente, entre las múltiples alteraciones presentes en la cirrosis, destaca la menor biodisponibilidad de NO a nivel de la circulación hepática.

La RI se encuentra estrechamente vinculada a la presencia de disfunción endotelial, fenómeno responsable de una reactividad vascular sistémica defectuosa y precursora de la aparición de enfermedades cardiovasculares.

Por otra parte, la RI también es un fenómeno frecuente en los pacientes cirróticos tanto por la propia enfermedad hepática como por la presencia concomitante de factores cardiovasculares. Por esta razón, resulta plausible pensar que la RI pudiera influir de algún modo sobre la hemodinámica hepática y sistémica en la cirrosis hepática. Si así fuera, la búsqueda de marcadores de sensibilidad a la insulina sencillos y de fácil aplicación en la práctica clínica podrían ser de ayuda para identificar aquellos pacientes con peor pronóstico de su enfermedad hepática, así como para plantear nuevas terapias “sensibilizadoras “ con el fin de retrasar la progresión de la enfermedad hepática.

El artículo 1 se centra en la RI de causa hepática con el objetivo de evaluar su posible relación directa con la hipertensión portal. Se excluyeron aquellos pacientes que presentaban otros factores relacionados con RI. Se utilizó el método no invasivo y de fácil aplicación, el actualizado índice HOMA-2 estandarizado en la población general para evaluar la presencia de RI y que se asocia estrechamente con la presencia de disfunción endotelial. El artículo concluye que la presencia de resistencia hepática a la insulina, según el índice HOMA-2, no influye en la aparición o progresión de la hipertensión portal.

El índice HOMA ha sido ampliamente validado en la población general pero no entre la población cirrótica. Petrides et al (7, 8) ya estudió hace años el efecto de la hiperinsulinemia crónica presente en la cirrosis sobre la sensibilidad a la insulina demostrando la existencia de RI mediante su *gold-standard* (clamp euglucémico insulinémico). Sin embargo, no se han realizado estudios de validación de este índice comparándolo con el *gold standard* en la población cirrótica, estableciendo puntos de corte (probablemente mayores que indiquen insulino resistencia) y teniendo en cuenta la peculiaridad de esta hiperinsulinemia "fisiológica" debido a la circulación colateral y que tanto puede influir en los valores de insulina basal.

El artículo 1 muestra que la repercusión vascular de la RI sobre la cirrosis hepática no se ve reflejada a través del índice HOMA-2 como podría plantearse en un principio. Sin embargo, este índice probablemente indique más la presencia del fenómeno de colateralización presente en la cirrosis con hipertensión portal; de forma indirecta podría resultar ser un marcador de HPCS. En congruencia con esta afirmación, un reciente estudio publicado demuestra como se normalizaban los valores de insulina plasmática con la oclusión de shunts porto-sistémicos y su relación con las varices esofágicas (6).

No obstante, la correlación débil entre el grado de hipertensión portal y el índice HOMA, como ha sucedido en otros estudios publicados, descarta que pueda sustituir el estudio

hemodinámico para valorar la existencia de HPCS. El desarrollo de hipertensión portal y su progresión no sólo se ve reflejada en el desarrollo de circulación colateral, sino también en los cambios estructurales y vasculares que a aparecen a nivel hepático y esplénico y que el índice HOMA no representa. Hasta la fecha no se ha desarrollado un método no invasivo que pueda sustituir la medición del GPVH. Actualmente, existen numerosos estudios centrados en la en búsqueda de marcadores no invasivos que sean capaces de predecir la presencia y progresión de la hipertensión portal en el curso de una hepatopatía crónica. Entre ellos, destaca la evaluación del grado de fibrosis hepática mediante la elastografía hepática (Fibroscan®) por los resultados obtenidos no sólo en determinar la presencia de fibrosis significativa, sino también por la capacidad de reflejar el incremento progresivo del grado de hipertensión portal. Sin embargo, presenta limitaciones en la aplicación clínica de este segundo punto debido a la variabilidad de los valores de corte obtenidos para determinar HPCS. La combinación de la elastografía hepática, el recuento plaquetario y el tamaño del bazo mediante ecografía presenta mayor precisión en identificar e HPCS y/o varices esofágicas en lugar de utilizar sólo un método en pacientes diagnosticados de cirrosis compensada de diferentes etiologías (3). En este sentido, varios estudios han probado la utilidad de la combinación del índice HOMA y la relación entre el recuento plaquetario y el diámetro del bazo para predecir la presencia de varices esofágicas en pacientes con cirrosis por la infección crónica por VHC Child A, B y C (9, 10).

El desarrollo durante la evolución de la cirrosis de la conocida diabetes hepatógena, parece estar relacionada con la presencia de RI hepática. Sin embargo, desconocemos con exactitud sus implicaciones clínicas. Históricamente, está bien documentada la diabetes en más de un 70% de los pacientes con cirrosis. Sin embargo, su posible relación con la progresión de la enfermedad hepática después de su diagnóstico es más novedosa. Los resultados de diversos estudios clínicos parecen indicar que la diabetes pudiera estar relacionada con un riesgo

incrementado de desarrollar complicaciones derivadas de la cirrosis (insuficiencia hepática, hepatocarcinoma, hemorragia digestiva por hipertensión portal)(11).

Con el objetivo de obtener un grupo homogéneo y eliminar posibles factores de confusión al interpretar el índice HOMA, durante el período de inclusión del artículo 1, se excluyeron 44 pacientes ya diagnosticados de diabetes que se encontraban bajo tratamiento hipoglucemiante (datos no mostrados en el artículo). Un 29,5% de ellos (13 pacientes) había presentado un episodio de hemorragia digestiva por varices gastro-esofágicas y un 20% se encontraban en profilaxis primaria. Diversos estudios clínicos retrospectivos sugieren el impacto negativo de la diabetes sobre la historia natural de la cirrosis. Un reciente estudio clínico publicado halló una correlación positiva entre la diabetes, el sangrado variceal y el GPVH indicando que la presencia de diabetes empeora el pronóstico de la cirrosis (12). Sin embargo, será necesario diseñar estudios longitudinales prospectivos que evalúen el potencial efecto de la diabetes sobre la progresión de la enfermedad hepática.

El artículo 2 explora la influencia de la RI de causa no hepática (la presencia de factores de riesgo cardiovascular) sobre la hemodinámica hepática y sistémica en pacientes con cirrosis. En él se concluye que la presencia de factores de riesgo cardiovascular se asocia con la existencia de disfunción endotelial sistémica en la cirrosis, pero ésta no influye sobre el grado de hipertensión portal o las presiones cardiopulmonares. La DMF mediante ecografía, como método para evaluar la presencia de disfunción endotelial, no puede utilizarse en la población cirrótica ya que refleja esta dualidad hemodinámica sistémica: el grado de dilatación post-isquemia aumenta con el grado de insuficiencia hepatocelular independientemente del riesgo cardiovascular.

Existen en la literatura algunos estudios que evalúan la presencia de factores y eventos cardiovasculares entre la población cirrótica, la mayoría en el período post-trasplante

hepático. Un trabajo observacional retrospectivo publicado en 2010 (13), determinó una prevalencia del 20 % en eventos cardiovasculares en una población cirrótica pre-trasplante hepática y la diabetes mellitus como el factor predictivo de eventos cardiovasculares de toda la muestra pero sin llegar a alcanzar significación estadística cuando sólo se evaluaba el grupo con cirrosis. Así mismo, no existen estudios prospectivos que evalúen el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y la presencia de factores de riesgo cardiovascular en pacientes cirróticos durante el período pre-trasplante hepático.

En conclusión, según los resultados obtenidos y los métodos utilizados en los dos artículos, no hemos podido encontrar una relación entre la presencia de RI e hipertensión portal en la cirrosis. La elección del modo de evaluación de la sensibilidad a la insulina así como los métodos para evaluar los efectos vasculares y metabólicos de la misma son puntos importantes que deberíamos considerar para evaluar adecuadamente la sensibilidad a la insulina en la cirrosis hepática. No obstante, el índice HOMA-2, a pesar de no reflejar este estado, puede indicar la presencia de circulación colateral en la cirrosis y por ende de hipertensión portal clínicamente significativa.

VII. CONCLUSIONES GLOBALES

1. La resistencia a la insulina es un fenómeno frecuente en los pacientes con cirrosis tanto por la propia enfermedad hepática como por la presencia de factores de riesgo cardiovascular (tabaquismo, hipertensión arterial, dislipemia,diabetes y obesidad).

2. La presencia de resistencia hepática a la insulina, según el índice HOMA-2, no influye en la aparición o progresión de la hipertensión portal.

3. Sin embargo, el índice HOMA-2 podría indicar el fenómeno de colateralización porto-sistémica presente en la cirrosis. De forma indirecta, podría ser un marcador de hipertensión portal clínicamente significativa.

4. La presencia de factores de riesgo cardiovascular como causa no hepática de resistencia a la insulina se asocia también con la existencia de disfunción endotelial sistémica en pacientes con cirrosis. Sin embargo, no influyen sobre el grado de hipertensión portal o las presiones cardiopulmonares.

5. La técnica de la dilatación mediada por flujo para evaluar la presencia de disfunción endotelial no debería utilizarse en pacientes con cirrosis ya que el grado de dilatación aumenta según el grado de insuficiencia hepatocelular, de forma independiente a la presencia de factores de riesgo cardiovascular.

6. La elección del modo de evaluación de la sensibilidad a la insulina así como los métodos para evaluar sus efectos vasculares y metabólicos deben tenerse en cuenta para evaluar adecuadamente la sensibilidad a la insulina en la cirrosis hepática.

VII. BIBLIOGRAFÍA

(Bibliografía complementaria para la realización de la tesis doctoral)

1. Bosch J. Vascular Deterioration in Cirrhosis. The big picture. *J Clin Gastroenterol 2007 41 Suppl 3: S247-S253.*

2. Bosch J, Abraldes JG, Berzigotti A, Garcia-Pagan JC. The clinical use of HVPG measurements in chronic liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2009;6:576-582.*

3. Kim MY, Jeong WK, Baik SK. Invasive and non-invasive diagnosis of cirrhosis and portal hypertension. *World J Gastroenterol 2014 Apr 21;20(15):4300-4315.*

4. Muniyappa R, Lee S, Chen H, Quon MJ. Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. *Am J Physiol Endocrinol Metab 2008 Jan;294(1):E15-E26.*

5. Peters SA, den Ruijter HM, Bots ML. The incremental value of brachial flow-mediated dilation measurements in risk stratification for incident cardiovascular events: a systematic review. *Ann Med 2012 Jun;44(4):305-312.*

6. Ishikawa T, Shiratsuki S, Matsuda T, Iwamoto T, Takami T, Uchida K, et al. Occlusion of portosystemic shunts improves hyperinsulinemia due to insulin resistance in cirrhotic patients with portal hypertension. *J Gastroenterol 2013 Published online Oct 5.*

7. Petrides AS, DeFronzo RA. Glucose and insulin metabolism in cirrhosis. *J Hepatol 1989 Jan;8(1):107-114.*

8. Petrides AS, Strohmeyer G, DeFronzo RA. Insulin resistance in liver disease and portal hypertension. *Prog Liver Dis 1992;10:311-328.*

9. Camma C, Petta S, Di M, V, Bronte F, Ciminnisi S, Licata G, et al. Insulin resistance is a risk factor for esophageal varices in hepatitis C virus cirrhosis. *Hepatology 2009 Jan;49(1):195-203.*

10. Li X, Wu K, Fan D. Insulin resistance and platelet count/spleen diameter ratio: two simple, easy-to-get tests for predicting esophageal varices in cirrhosis 14. *Hepatology 2009 Apr;49(4):1394-1395.*

11. Hickman IJ, Macdonald GA. Impact of diabetes on the severity of liver disease. *Am J Med 2007 Oct;120(10):829-834.*

12. Jeon HK, Kim MY, Baik SK, Park HJ, Choi H, Park SY, et al. Hepatogenous diabetes in cirrhosis is related to portal pressure and variceal hemorrhage. *Dig Dis Sci 2013 Nov;58(11):3335-3341.*

13. Kalaitzakis E, Rosengren A, Skommevik T, Bjornsson E. Coronary artery disease in patients with liver cirrhosis. *Dig Dis Sci 2010 Feb;55(2):467-475.*