





Universidad Miguel Hernández

Departamento de Farmacología, Pediatría y Química Orgánica

División de Farmacología

**TESIS DOCTORAL**

**Cambios funcionales de los receptores  $\beta_2$   
adrenérgicos en pacientes cirróticos con  
hipertensión portal.**

**Flavia Tamara Hernández Rocamora**

Diciembre 2004

D. JOSÉ FRANCISCO HORGA DE LA PARTE, Dr. en Medicina, Catedrático de Farmacología Clínica de la Universidad Miguel Hernández y D. PEDRO ZAPATER HERNÁNDEZ, Dr. en Medicina y Farmacólogo Clínico del Hospital General Universitario de Alicante.

**CERTIFICAN:**

Que Dña Flavia Tamara Hernández Rocamora, natural de Alicante, con D.N.I 48373210-R, licenciada en Farmacia por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo: **“Cambios funcionales de los receptores  $\beta_2$  adrenérgicos en pacientes cirróticos con hipertensión portal”** y presenta esta memoria para optar al grado de Doctor.

Fdo. Dr. JF. Horga

Fdo. Dr. P. Zapater.



Este trabajo ha sido financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (Ministerio de Sanidad y Consumo) con el número de proyecto: 01/0486, periodo 2001-2003.

 *Miguel  
Hernández*

## **AGRADECIMIENTOS:**

En primer lugar quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Profesor José F<sup>co</sup> Horga de la Parte por darme la oportunidad de conocer qué es esto de la ciencia y por supuesto, por sufrir la dirección de este trabajo.

No menos importante ha sido para mi el Dr. Pedro Zapater que ha sido capaz de transmitirme el gran entusiasmo que posee por todo. Muchas gracias por ayudarme con la tesis, los experimentos y el cromatógrafo.

A toda la Unidad de Farmacología Clínica del Hospital General Universitario de Alicante.

A toda la Unidad de Digestivo del Hospital General Universitario de Alicante y muy especialmente al Dr. José M<sup>a</sup> Palazón que confió en mi para llevar a cabo este proyecto y al Dr. Enrique de Madaria Pascual por facilitarme los datos clínicos de los pacientes.

A todo el Servicio de Radiología Vascular del Hospital General Universitario de Alicante por participar en la medida de los gradientes de los pacientes y a Maite y Curro por avisarme cada día que había un estudio hemodinámico.

Al Laboratorio del Hospital Universitario de San Juan por el contaje celular de las muestras sanguíneas.

A Alicia Blasco Fraile, por mediar con la empresa de seguridad del parking del Hospital de Alicante para que me dejasen entrar con el coche.

A mis compañeros de otros grupos de investigación por hacer mi estancia aquí más agradable y ofrecerme lo mejor de cada uno: Jonathan Jones, Pili Sepulcre, Patricia Ñeco, José Antonio Ortiz, José Antonio Bernal, Mar Castillo, Luismi Valor, Pepe Mulet, Inma López, Dani Giner, Sonia Bonilla, Roberto Enseñat, Isabel Maestre, Isabel Ochando, Hugo Alonso, Marta Beltra, Pilar Vaca. Y que me perdonen si se me he olvidado de alguno de ellos. A Luismi Gutiérrez por ser tan amable y encantador conmigo. Gracias a todos por esos momentos y esas cenas tan maravillosas que hemos compartido juntos.

A Encarna Fuster y Mar Francés por ofrecerme todo lo que necesitado durante estos años, desde un reactivo hasta su cariño y amistad.

A Juanjo Ripoll, por conseguirme artículos a los que yo no tenía acceso, por ayudarme en todo lo que ha estado en sus manos y por ser mi mejor amigo y confidente aquí. Gracies Juanjet per tot.

A todo el laboratorio del Dr. Niels Juel Christensen del Hospital de Herlev (Dinamarca) por hacerme sentir como una más y por enseñarme un modo diferente de entender la ciencia y lo que es más importante, la vida.

A todos los pacientes que dieron su consentimiento para participar en el estudio.

A la familia Gregori por su paciencia y apoyo incondicional en todo momento.

A toda mi familia y amigos que me han ayudado a llegar hasta el final de este trabajo.

A todas las señoras de la limpieza del edificio de departamentos de San Juan, pero muy especialmente a Lola Ivorra Climent.



A mi abuela que no pudo ver cómo su nieta terminaba este estudio.

A mis padres y a mi hermano, por apoyarme en todas mis decisiones y estar siempre a mi lado.

Y me dejo para el final lo mejor. La persona que en todo momento ha estado ayudándome en mis días malos, pero también disfrutando de mis días buenos. Gracias Juan Pablo por la comprensión, cariño y sobre todo, paciencia que has tenido conmigo.

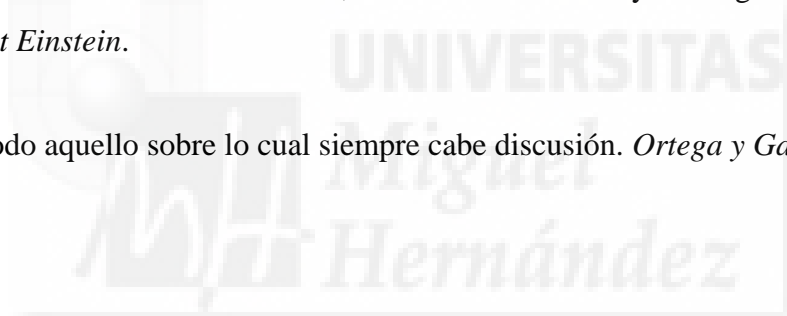


Lo último que uno sabe, es por donde empezar. *Blaise Pascal.*

La verdadera ciencia enseña, sobre todo, a dudar y a ser ignorante. *Miguel de Unamuno.*

Si tu intención es describir la verdad, hazlo con sencillez y la elegancia déjasela al sastre. *Albert Einstein.*

Ciencia es todo aquello sobre lo cual siempre cabe discusión. *Ortega y Gasset.*





**GLOSARIO DE ABREVIATURAS**  
**GLOSARIO DE TABLAS**  
**GLOSARIO DE FIGURAS**

<b>PARTE I: INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>1. INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	2
<b>2. SISTEMA NERVIOSO ADRENÉRGICO</b>	2
<b>3. LOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS (ADRENOCEPTORES)</b>	3
3.1. INTRODUCCIÓN	3
3.1.1. Concepto de adrenoceptor	3
3.1.2. Clasificación y evolución de los adrenoceptores	3
3.2. ESTRUCTURA DEL RECEPTOR $\beta$ -ADRENÉRGICO	7
3.3. FUNCIONAMIENTO DE LOS RECEPTORES $\beta$ -ADRENÉRGICOS	8
3.4. ACOPLAMIENTO DEL AGONISTA CON LA PROTEINA RECEPTORA	9
3.5. ACOPLAMIENTO DEL RECEPTOR $\beta$ -ADRENÉRGICO CON LA PROTEÍNA G	12
3.6. ACTIVACIÓN E INHIBICIÓN DE LA ADENILATO CICLASA	14
3.7. DESCUBRIMIENTO Y MECANISMO DE ACCIÓN DEL AMPc	15
<b>4. REGULACIÓN DEL SISTEMA RECEPTOR ADRENÉRGICO/ADENILATO CICLASA</b>	16
<b>5. POLIMORFISMOS DE LOS RECEPTORES <math>\beta</math>-ADRENÉRGICOS</b>	17
<b>6. ACCIONES DE LOS IONES SOBRE EL SISTEMA ADRENOCEPTOR/ADENILATO CICLASA</b>	18
6.1. ION MAGNESIO	18
6.2. ION MANGANESO	18
6.3. ION CALCIO	18
<b>7. MÉTODOS DE ESTUDIO DEL SISTEMA RECEPTOR ADRENÉRGICO/ADENILATO CICLASA</b>	19
<b>8. EL RECEPTOR <math>\beta</math>-ADRENÉRGICO EN EL HEMATÍE</b>	21
8.1. PRODUCCIÓN, CIRCULACIÓN Y DESTRUCCIÓN DE HEMATÍES	21
8.2. ESTRUCTURA DE LA MEMBRANA DEL HEMATÍE	21
8.3. EL HEMATÍE COMO MODELO DE ESTUDIO DEL RECEPTOR $\beta$ -ADRENÉRGICO	22
8.3.1. El hematíe de pavo como modelo de estudio del receptor $\beta$ -adrenérgico	23
8.3.2. El receptor $\beta$ en hematíes de batracios	23
8.3.3. Estudio de la variabilidad de respuesta de la adenilato ciclasa en reticulocitos y hematíes de ratas	23
8.3.4. Estudios de hematíes en humanos	24
<b>9. DIFERENCIAS EN LA ACTIVIDAD DEL SISTEMA AC-RECEPTOR <math>\beta</math> ENTRE LOS ESTUDIO IN VIVO E IN VITRO</b>	24
<b>10. EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DEL SNA</b>	25
10.1. REFLEJOS CARDIOVASCULARES EN LA VALORACIÓN NO INVASIVA DEL SISTEMA NERVIOSO AUTÓNOMO	25
10.2 NIVELES DE CATECOLAMINAS CIRCULANTES	27
10.3. DOPAMINA BETA-HIDROXILASA (DBH)	28

10.3.1. Introducción	28
10.3.2. Ensayos de la actividad de la DBH sérica	30
10.3.3. Valores de actividad de la DBH sérica	31
10.3.4. Fuentes y destino de la DBH sérica	31
10.3.5. Edad y sexo en humanos	32
10.3.6. Efecto de la herencia sobre la DBH	32
10.3.7. Ritmo circadiano	32
10.3.8. Fármacos y efectos hormonales	32
10.3.9. Efectos del estrés	33
10.3.10. DBH sérica en diferentes enfermedades	33
10.4. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS RECEPTORES $\beta$ EN PACIENTES	34
<b>11. CIRROSIS HEPÁTICA</b>	34
<b>12. HIPERTENSIÓN PORTAL (HTP)</b>	35
12.1. INTRODUCCIÓN	35
12.2. FISIOPATOLOGÍA	35
12.2.1. Mecanismos implicados en la fisiopatología de la hipertensión portal	36
12.3. BASES RACIONALES PARA LA TERAPIA FARMACOLÓGICA DE LA HTP	37
<b>13. VARICES ESOFÁGICAS</b>	37
13.1. FORMACIÓN	37
13.2. FRECUENCIA DE PRESENTACIÓN (Y/O FORMACIÓN)	38
13.3. EPIDEMIOLOGÍA DEL SANGRADO POR VARICES ESOFÁGICAS	39
13.4. FACTORES DE RIESGO IMPLICADOS EN EL EPISODIO INICIAL DE SANGRADO POR VARICES	39
<b>14. PROFILAXIS DEL SANGRADO POR VARICES ESOFÁGICAS</b>	40
14.1. PROFILAXIS 1 <sup>ARIA</sup> DEL SANGRADO POR VARICES ESOFÁGICAS	40
14.2. PROFILAXIA 2 <sup>ARIA</sup> DEL SANGRADO POR VARICES ESOFÁGICAS	40
<b>15. TRATAMIENTO DE LA HTP CON <math>\beta</math>-BLOQUEANTES NO SELECTIVOS</b>	41
15.1. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO	43
15.2. IMPORTANCIA DE LA IDENTIFICACIÓN DE PACIENTES NO RESPONDEDORES AL TRATAMIENTO CON PROPRANOLOL	45
15.3. ALTERNATIVAS AL TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO CON PROPRANOLOL	46
<b>16. FUNCIONALIDAD DEL SNA EN LA HTP</b>	47
16.1. RESULTADOS DE LOS TEST EN PACIENTES CIRRÓTICOS	47
16.2. NIVELES DE CATECOLAMINAS EN CIRRÓTICOS	48
16.3. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LA DOPAMINA BETA HIDROXILASA EN CIRRÓTICOS	48
<b>17. RELACIÓN ENTRE LOS RECEPTORES <math>\beta</math>-ADRENÉRGICOS Y LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE VARICES ESOFÁGICAS</b>	49
 <b>PARTE II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	 50
<b>1. HIPÓTESIS</b>	51
<b>2. OBJETIVOS</b>	51

<b>PARTE III. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	52
<b>1. DISEÑO DEL ESTUDIO</b>	53
1.1. PACIENTES	53
1.2. ESQUEMA TEMPORAL DEL ESTUDIO	53
1.2.1. Estudio basal	53
1.2.1.1. Método	53
1.2.1.2. Pacientes de profilaxis primaria	54
1.2.1.3. Pacientes de profilaxis secundaria	54
1.2.2. Segunda determinación del GPVH tras la administración iv de propranolol	54
1.2.2.1. Durante la prueba hemodinámica	54
1.2.3. Tercer periodo	54
1.2.4. Extracción de las muestras de sangre	54
1.2.5. Suspensión de $\beta$ -bloqueantes en los pacientes que recibían tratamiento previo	55
<b>2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ADENILATO CICLASA ACOPLADA AL RECEPTOR <math>\beta_2</math></b>	56
2.1. OBTENCIÓN DE LAS MEMBRANAS CELULARES DE ERITROCITOS Y LINFOCITOS	56
2.1.1. Fundamentos	56
2.1.2. Preparación de reactivos	56
2.1.3. Descripción del método	56
2.2. SELECCIÓN CELULAR CON PERCOLL	60
2.2.1. Fundamentos	60
2.2.2. Preparación de reactivos	60
2.2.3. Descripción del método	62
2.3. SELECCIÓN CELULAR CON FICOLL	62
2.3.1. Fundamento	62
2.3.2. Reactivos	62
2.3.3. Descripción del método	62
2.4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS: MÉTODO DE BRADFORD	63
2.4.1. Fundamentos	63
2.4.2. Reactivos	63
2.4.3. Procedimiento del ensayo	64
2.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ADENILATO CICLASA	64
2.5.1. Preparación de reactivos	65
2.5.2. Preparación de las muestras	65
2.5.3. Determinación del AMPc producido mediante radioinmunoanálisis (RIA)	68
2.5.3.1. Fundamento	68
2.5.3.2. Descripción del método	68
2.5.3.3. Cálculo del AMPc producido	71
<b>3. ENSAYO FOTOMÉTRICO DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA DOPAMINA BETA HIDROXILASA (DBH)</b>	73
3.1. INTRODUCCIÓN	73
3.2. SOLUCIONES DE TRABAJO	73
3.3. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO ENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA DBH	75

<b>4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	76
<b>ANEXO: COPIA DE LA APROBACIÓN POR EL COMITÉ ÉTICO PARA LA INVESTIGACIÓN CLÍNICA (CEIC)</b>	78

## **PARTE IV: RESULTADOS** 80

<b>1. VALIDACIÓN DE LAS TÉCNICAS</b>	81
1.1. MEDIDA DE PROTEÍNAS (TÉCNICA DE BRADFORD)	81
1.1.1. Recta estándar media	81
1.1.2. Variabilidad interdía	82
1.1.3. Variabilidad intradía	83
1.2. MEDIDA DE AMPc	83
1.2.1. Variabilidad interdía	84
1.2.2. Variabilidad intradía	84
1.2.3. Influencia de las condiciones experimentales sobre la medida de AMPc	85
1.2.3.1. Producción de AMPc en presencia de $Mn^{2+}$ 9 mM, $Mg^{2+}$ 9 mM, ATP 2 mM, IBMX 1 mM y 10 minutos de incubación	85
1.2.3.2. Composición celular de las muestras	85
1.2.3.3. Estabilidad de los kits de AMPc	87
1.2.3.4. Influencia del modelo de contador de centelleo, tiempo de contaje y agitación	88
1.2.3.5. Efecto de separar los elementos celulares de las muestras con Percoll, Ficoll o con centrifugación simple	88
1.3. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LA DBH	90
1.3.1. Recuperación de octopamina	90
1.3.2. Variabilidad interdía	91
1.3.3. Efectos del ácido ascórbico	91
1.3.4. Efecto de la mezcla: acetato sódico, ascorbato, fumarato, pargilina, N-etilamaleimida, catalasa y $H_2O$	91
1.3.5. Determinación de la actividad de la DBH en muestras de suero control	91
1.3.6. Linealidad de la determinación	92
1.3.7. Recta estándar de calibración	92
<b>2. PACIENTES Y CONTROLES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO</b>	93
2.1. EFECTO DE LA EDAD DE LOS PACIENTES SOBRE LOS VALORES DE AMPc	96
<b>3. ACTIVIDAD DEL SISTEMA DE LA ADENILATO CICLASA (AC) EN MEMBRANAS DE HEMATÍES DE PACIENTES CIRRÓTICOS CON HTP EN EL MOMENTO DEL EH INICIAL</b>	99
3.1. ACTIVIDAD DE LA AC PREVIA A LA ADMINISTRACIÓN DE PROPRANOLOL IV	99
3.1.1. Pacientes	99
3.1.1.1. Análisis de las posibles correlaciones entre la actividad de la AC y las variables clínicas de todos los pacientes incluidos en el estudio antes de la administración de un bolus iv de propranolol (EH inicial)	100
3.1.1.1.1. Actividad basal	100
3.1.1.1.2. Tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M	102

3.1.1.2. Análisis de las posibles correlaciones entre la capacidad de respuesta al isoproterenol $10^{-4}$ M (estímulo relativo del isoproterenol) durante el EH inicial o basal y las variables clínicas y/o demográficas en los pacientes cirróticos con HTP	104
3.1.1.3. Análisis de las posibles correlaciones entre la capacidad de bloqueo del propranolol $10^{-5}$ M (bloqueo relativo del propranolol) y las variables clínicas y/o demográficas de los pacientes cirróticos con HTP durante el EH inicial	108
3.1.2. Pacientes del grupo de profilaxis primaria	110
3.1.2.1. Análisis de las posibles correlaciones entre la actividad de la AC y las características de los pacientes de profilaxis primaria durante el EH inicial	111
3.1.2.1.1. Actividad basal	111
3.1.2.1.2. Tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M	114
3.1.2.2. Análisis de las posibles correlaciones entre la capacidad de respuesta al isoproterenol $10^{-4}$ M (estímulo relativo del isoproterenol) durante el EH inicial o basal y las variables clínicas y/o demográficas en los pacientes de profilaxis primaria	118
3.1.2.3. Análisis de las posibles correlaciones entre la capacidad de bloqueo del propranolol $10^{-5}$ M (bloqueo relativo del propranolol) y las variables clínicas y/o demográficas de los pacientes de profilaxis primaria durante el EH inicial	122
3.1.3. Pacientes del grupo de profilaxis secundaria	126
3.1.3.1. Análisis de las posibles correlaciones entre la actividad de la AC y las características de los pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial	127
3.1.3.1.1. Actividad basal	127
3.1.3.1.2. Tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M	131
3.1.3.2. Análisis de las posibles correlaciones entre la capacidad de respuesta al isoproterenol $10^{-4}$ M (estímulo relativo del isoproterenol) y las variables clínicas y/o demográficas en los pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial o basal	136
3.1.3.3. Análisis de las posibles correlaciones entre la capacidad de bloqueo del propranolol $10^{-5}$ M (bloqueo relativo del propranolol) y las variables clínicas y/o demográficas durante el EH inicial en los pacientes de profilaxis secundaria	140
<b>3.2. ACTIVIDAD DE LA AC EN LAS MEMBRANAS DE HEMATÍES DE LAS MUESTRAS DE SANGRE EXTRAIDAS A LOS PACIENTES 30 MINUTOS DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE UN BOLUS DE PROPRANOLOL IV</b>	<b>143</b>
3.2.1. Pacientes	143
3.2.1.1. Análisis de las posibles correlaciones entre la actividad de la AC y las variables clínicas de los pacientes cirróticos con HTP tras la administración de un bolus iv de propranolol	146
3.2.1.1.1. Actividad basal	146
3.2.1.1.2. Tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M	151
3.2.1.2. Análisis de las posibles correlaciones entre la capacidad de respuesta al isoproterenol $10^{-4}$ M (estímulo relativo del isoproterenol) después de la administración iv de propranolol y las variables clínicas y/o demográficas en los pacientes cirróticos con HTP	153
3.2.1.3. Análisis de las posibles correlaciones entre la capacidad de bloqueo del propranolol $10^{-5}$ M (bloqueo relativo del propranolol) y las variables clínicas y/o demográficas de los pacientes cirróticos con HTP después de la administración de un bolus iv de propranolol	158
3.2.1.4. Análisis de los posible cambios en las variables hemodinámicas tras la administración de un bolus iv de propranolol en los pacientes cirróticos con HTP	164

3.2.2. Pacientes del grupo de profilaxis primaria	165
3.2.2.1. Análisis de las posibles correlaciones entre la actividad de la AC y las variables clínicas de los pacientes de profilaxis primaria tras la administración de un bolus iv de propranolol	165
3.2.2.1.1. Actividad basal	165
3.2.2.1.2. Tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M	168
3.2.2.2. Análisis de las posibles correlaciones entre la capacidad de respuesta al isoproterenol $10^{-4}$ M (estímulo relativo del isoproterenol) y las variables clínicas y/o demográficas en los pacientes de profilaxis primaria después de la administración de un bolus iv de propranolol	172
3.2.2.3. Análisis de las posibles correlaciones entre la capacidad de bloqueo del propranolol $10^{-5}$ M (bloqueo relativo del propranolol) y las variables clínicas y/o demográficas en los pacientes de profilaxis primaria después de la administración de un bolus iv de propranolol	174
3.2.2.4. Análisis de los posible cambios en las variables hemodinámicas tras la administración de un bolus iv de propranolol en los pacientes de profilaxis primaria	176
3.2.3. Pacientes del grupo de profilaxis secundaria	178
3.2.3.1. Análisis de las posibles correlaciones entre la actividad de la AC y las variables clínicas de los pacientes de profilaxis secundaria tras la administración de un bolus iv de propranolol	178
3.2.3.1.1. Actividad basal	178
3.2.3.1.2. Tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M	182
3.2.3.2. Análisis de las posibles correlaciones entre la capacidad de respuesta al isoproterenol $10^{-4}$ M (estímulo relativo del isoproterenol) y las variables clínicas y/o demográficas en los pacientes de profilaxis secundaria después de la administración de un bolus iv de propranolol	185
3.2.3.3. Análisis de las posibles correlaciones entre la capacidad de bloqueo del propranolol $10^{-5}$ M (bloqueo relativo del propranolol) y las variables clínicas y/o demográficas de los pacientes de profilaxis secundaria después de la administración de un bolus iv de propranolol	187
3.2.3.4. Análisis de los posible cambios en las variables hemodinámicas tras la administración de un bolus iv de propranolol en los pacientes de profilaxis secundaria	196
<b>4. ACTIVIDAD DEL SISTEMA DE LA AC EN MEMBRANAS DE HEMATÍES DE LOS PACIENTES CIRRÓTICOS CON HTP TRAS 3 MESES DE TRATAMIENTO CON PROPRANOLOL ORAL</b>	198
4.1. VALORACIÓN DE TODOS LOS PACIENTES CIRRÓTICOS	198
4.1.1. Análisis de las posibles correlaciones entre las variables clínicas y la producción basal de AMPc en los pacientes cirróticos con HTP tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral	201
4.1.1.1. Actividad basal	201
4.1.1.2. Tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M	203
4.1.2. Análisis de las posibles correlaciones entre la capacidad de respuesta al isoproterenol $10^{-4}$ M (estímulo relativo del isoproterenol) y las variables clínicas y/o demográficas en los pacientes cirróticos con HTP tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral	206
4.1.3. Análisis de las posibles correlaciones entre la capacidad de bloqueo del propranolol $10^{-5}$ M (bloqueo relativo del propranolol) y las variables clínicas y/o demográficas en los pacientes cirróticos con HTP tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral	209

4.1.4. Análisis de los posibles cambios en las variables hemodinámicas tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral en los pacientes cirróticos con HTP	213
<b>4.2. SUBGRUPO DE PACIENTES QUE RECIBIERON PROPRANOLOL COMO PROFILAXIS PRIMARIA</b>	<b>214</b>
4.2.1. Análisis de las posibles correlaciones entre la actividad de la AC y las características de los pacientes de profilaxis primaria después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral	215
4.2.1.1. Actividad basal	215
4.2.1.2. Tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M	217
4.2.2. Análisis de las posibles correlaciones entre la respuesta al isoproterenol $10^{-4}$ M (estímulo relativo del isoproterenol) y las variables clínicas y/o demográficas en los pacientes de profilaxis primaria después de un tratamiento con propranolol oral durante 3 meses	218
4.2.3. Análisis de las posibles correlaciones entre la capacidad de bloqueo del propranolol $10^{-5}$ M (bloqueo relativo del propranolol) y las variable clínicas y/o demográficas en los pacientes de profilaxis primaria después de un tratamiento con propranolol oral de 3 meses	220
4.2.4. Análisis de las posibles cambios en las variables hemodinámicas en los pacientes de profilaxis primaria después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral	223
<b>4.3. PACIENTES DE PROFILAXIS SECUNDARIA</b>	<b>225</b>
4.3.1. Análisis de las posibles correlaciones entre la actividad de la AC y las características de los pacientes de profilaxis secundaria después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral	227
4.3.1.1. Actividad basal	227
4.3.1.2. Tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M	229
4.3.2. Análisis de las posibles correlaciones entre la respuesta al isoproterenol $10^{-4}$ M (estímulo relativo del isoproterenol) y las variables clínicas en los pacientes de profilaxis secundaria después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral	231
4.3.3. Análisis de las posibles correlaciones entre la capacidad de bloqueo del propranolol $10^{-5}$ M (bloqueo relativo del propranolol) y las variables clínicas en los pacientes de profilaxis secundaria después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral	233
4.3.4. Análisis de las posibles cambios en las variables hemodinámicas de los pacientes de profilaxis secundaria después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral	237
<b>5. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LA DOPAMINA <math>\beta</math>-HIDROXILASA</b>	<b>241</b>
<b>6. FACTORES HEMODINÁMICOS RELACIONADOS CON LA ACTIVIDAD DEL SISTEMA NERVIOSO SIMPÁTICO</b>	<b>244</b>
<b>PARTE V: DISCUSIÓN</b>	<b>247</b>
<b>PARTE VI: CONCLUSIONES</b>	<b>258</b>
<b>PARTE VII: BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>260</b>

## ABREVIATURAS:

$\alpha$ : alfa.  
 $\beta$ : beta.  
 $\gamma$ : gamma.  
 $\mu\text{g}$ : microgramos.  
 $\alpha\text{i}$ : subunidad alfa de la proteína G inhibidora.  
 $\mu\text{l}$ : microlitros.  
 $\alpha\text{s}$ : subunidad alfa de la proteína G estimuladora.  
 $\bar{X}$ : media.  
 $^{125}\text{I}$ : isótopo del yodo.  
 $1^{\text{aria}}$ : primaria.  
 $2^{\text{aria}}$ : secundaria.  
 $^{32}\text{P}$ : isótopo del fósforo.  
 $^3\text{H}$ : tritio.  
9q34: región 34 del brazo corto del cromosoma 9.  
A: adrenalina.  
Å: amstrongs.  
AC: adenilato ciclasa.  
Ach: acetilcolina.  
ADNc: ácido desoxiribonucleico complementario.  
AMP: adenosín monofosfato.  
AMPc: adenosín monofosfato cíclico.  
Arg: arginina.  
Asn: asparragina.  
Asp: aspartato.  
ATP: adenosín trifosfato.  
AUC: área bajo la curva.  
Bb: bilirrubina.  
C: subunidad catalítica de la proteína Kinasa.  
cP: centipoise.  
c.p.m: cuentas por minuto.  
 $\text{Ca}^{2+}$ : catión calcio en forma de cloruro de calcio (II).  
Cmax: concentración máxima de fármaco.  
 $\text{CO}_2$ : dióxido de carbono.  
Cols: colaboradores.  
C-terminal: extremo carboxi terminal.  
 $\text{Cu}^{2+}$ : catión cobre (II).  
CV: coeficiente de variación.  
Cys: cisteína.  
DBH: dopamina beta hidroxilasa.  
Ds: desviación estándar.  
EDTA: etilendiamina tetraacético.  
EH: estudio hemodinámico.  
EPO: eritropoyetina.  
FA: fosfatasa alcalina.  
FC: frecuencia cardiaca.  
fmol: femtomoles.  
G: guanina.



GC: gasto cardiaco.  
Gi: proteína G inhibidora.  
Gln: glutamina.  
Glu: ácido glutámico o glutamato.  
Gly: glicina.  
GPCR: receptor acoplado a proteína G.  
GPVH: gradiente de presión venoso portal.  
GRK: kinasa del receptor acoplado a proteína G.  
Gs: proteína G estimuladora.  
GTP: guanosín trifosfato.  
H: hormona.  
H<sub>2</sub>O: agua.  
HTP: hipertensión portal.  
IBMX: isobutil metil xantina.  
IC: intervalo de confianza.  
ISMN: mononitrato de isosorbide.  
ISO: isoproterenol.  
iv: intravenoso.  
K: constante de equilibrio del receptor en reposo.  
K\*: constante de equilibrio del receptor “activado”.  
K<sup>+</sup>: catión potasio.  
Kb: kilobases.  
L: litro.  
M: molar.  
Mg<sup>2+</sup>: catión magnesio en forma de cloruro de magnesio (II).  
min: minutos.  
ml: mililitro.  
mM: milimolar.  
mmHg: milímetros de mercurio.  
mS: milisiemens.  
Mn<sup>2+</sup>: catión manganeso en forma de cloruro de manganeso (II).  
NA: noradrenalina.  
Na<sup>+</sup>: sodio  
NaCl: cloruro sódico.  
nm: nanómetros.  
nmol: nanomoles.  
NS: no significativo.  
°C: grados centígrados.  
ρ: densidad.  
PAD: presión arterial diastólica.  
PAM: presión arterial media.  
PAS: presión arterial sistólica.  
PDEs: fosfodiesterasas.  
PE: presión enclavada.  
pg: picogramo.  
pH: potencial de hidrogeniones.  
Phe: fenilalanina.  
PKA: fosfokinasa A.  
PKC: fosfokinasa C.  
PL: presión libre.

PLC: fosfolipasa C.  
pmol: picomol.  
PNMT: fenil etanolamina N-metiltransferasa.  
PPi: pirofosfato inorgánico.  
Pi: fosfato inorgánico.  
Q: flujo sanguíneo dentro del sistema venoso portal.  
R: receptor de membrana.  
Rv: resistencia del sistema venoso portal.  
R\*: receptor activado.  
s: segundos.  
SAM: S-adenosílmationina.  
Ser: serina.  
SNA: sistema nervioso adrenérgico.  
SNC: sistema nervioso central.  
SNIP: polimorfismo de un único nucleótido.  
SNS: sistema nervioso simpático.  
T: timina.  
 $T_{1/2}$ : semivida de eliminación.  
Thr: treonina.  
TIPS: shunt transyugular intrahepático.  
TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa..  
UA: unidades de absorbancia.  
UI: unidades internacionales.  
VC: vasoconstricción.  
VD: vasodilatación.



TABLAS	Página
Tabla 1. Clasificación de los receptores adrenérgicos.	6
Tabla 2. Diferencias en el sistema AC-receptor $\beta$ entre células intactas y membranas fraccionadas.	25
Tabla 3. Resumen de los diferentes test para la evaluación de la funcionalidad del sistema nervioso simpático y parasimpático.	26
Tabla 4. Patologías en las que los niveles de catecolaminas están alterados.	28
Tabla 5. Preparación de las condiciones de estudio de la adenilato ciclasa.	65
Tabla 6. Relación entre los nmoles de octopamina que integran la recta estándar y la concentración correspondiente.	74
Tabla 7. Valores de absorbancia para cada concentración de albúmina de la recta de calibración del método de Bradford.	81
Tabla 8. Variabilidad interdía de la técnica de Bradford.	82
Tabla 9. Variabilidad intradía de la técnica de Bradford.	83
Tabla 10. Variabilidad interdía de los valores de AMPc.	84
Tabla 11. Variabilidad intradía de los valores de AMPc.	84
Tabla 12. Ecuaciones de las rectas de AMPc en función del modelo de contador de centelleo.	88
Tabla 13. Valores de AMPc obtenidos en los controles (pmol AMPc/mg proteína/10 min) utilizando un gradiente de Ficoll, Percoll o una centrifugación a 1000 r.p.m.	88
Tabla 14. Recuperación de octopamina.	90
Tabla 15. Variabilidad interdía de la determinación de DBH.	91
Tabla 16. Características clínicas de los pacientes cirróticos incluidos en el estudio.	94
Tabla 17. Parámetros hemodinámicos de los pacientes que participan en el estudio.	95
Tabla 18. $X \pm Ds$ (n) del estímulo relativo y absoluto para isoproterenol y bloqueo relativo y absoluto para propranolol en membranas de hematíes de pacientes cirróticos y en voluntarios sanos.	100
Tabla 19. Análisis del grado de correlación existente entre la producción de AMPc basal y las variables clínicas cuantitativas en membranas de hematíes de pacientes cirróticos con HTP durante el EH inicial.	100
Tabla 20. Producción de AMPc basal ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas estudiadas en los pacientes cirróticos con HTP durante el EH inicial.	101
Tabla 21. Análisis del grado de correlación existente entre la producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M y las variables clínicas cuantitativas en membranas de hematíes de pacientes cirróticos con HTP durante el EH inicial.	102
Tabla 22. Producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas evaluadas en el conjunto de pacientes cirróticos con HTP durante el EH inicial.	103
Tabla 23. Análisis del grado de correlación existente entre el estímulo relativo del isoproterenol y las variables clínicas cuantitativas en las membranas de hematíes de los pacientes cirróticos con HTP durante el EH inicial.	104
Tabla 24. Estímulo relativo del isoproterenol ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas en membranas de hematíes de pacientes cirróticos con HTP antes de la administración de un bolus iv de propranolol.	105

---

Tabla 25. Análisis del grado de correlación existente entre el bloqueo relativo del propranolol y las variables clínicas cuantitativas en las membranas de hematíes de los pacientes cirróticos con HTP durante el EH basal (antes de la administración de un bolus iv de propranolol).	108
Tabla 26. Bloqueo relativo del propranolol ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas en las membranas de hematíes de pacientes cirróticos con HTP durante el estudio basal.	109
Tabla 27. Cuadro resumen de las correlaciones entre la actividad de la AC en membranas de hematíes y las variables clínicas de los pacientes cirróticos con HTP durante el EH inicial.	110
Tabla 28. $\bar{X} \pm Ds$ (n) del estímulo relativo y absoluto para el isoproterenol y el bloqueo relativo y absoluto para propranolol en membranas de hematíes de pacientes de profilaxis primaria durante el EH inicial	111
Tabla 29. Análisis del grado de correlación existente entre la producción de AMPc basal y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes de profilaxis primaria durante el EH inicial.	111
Tabla 30. Producción de AMPc basal ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas evaluadas en las membranas de hematíes de los pacientes de profilaxis primaria durante el EH inicial.	112
Tabla 31. Análisis del grado de correlación existente entre la producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M y las variables clínicas cuantitativas en las membranas de hematíes de los pacientes de profilaxis primaria durante el EH inicial.	114
Tabla 32. Producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas estudiadas en los pacientes de profilaxis primaria durante el EH inicial.	115
Tabla 33. Análisis del grado de correlación existente entre el estímulo relativo del isoproterenol en membranas de hematíes y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes de profilaxis primaria durante el EH inicial.	118
Tabla 34. Estímulo relativo del isoproterenol ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas en las membranas de hematíes de los pacientes de profilaxis primaria durante el EH inicial.	119
Tabla 35. Análisis del grado de correlación existente entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes de profilaxis primaria durante el estudio basal.	122
Tabla 36. Bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes en función de las variables clínicas cualitativas en los pacientes de profilaxis primaria durante el estudio basal.	123
Tabla 37. Cuadro resumen de las correlaciones entre la actividad de la AC en membranas de hematíes y las variables clínicas de los pacientes cirróticos con HTP evaluados para la profilaxis primaria en los de profilaxis primaria durante el EH inicial.	125
Tabla 38. $\bar{X} \pm Ds$ (n) del estímulo relativo y absoluto para el isoproterenol y el bloqueo relativo y absoluto para propranolol en membranas de hematíes de pacientes de profilaxis primaria y secundaria.	126
Tabla 39. Análisis del grado de correlación existente entre la producción de AMPc basal en membranas de hematíes y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.	127

---

---

Tabla 40. Producción de AMPc basal ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en membranas de hematíes en función de las variables cualitativas clínicas estudiadas en los pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.	128
Tabla 41. Análisis del grado de correlación existente entre la producción de AMPc en membranas de hematíes tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.	131
Tabla 42. Producción de AMPc ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en membranas de hematíes tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M en función de las variables cualitativas clínicas estudiadas en los pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.	132
Tabla 43. Análisis del grado de correlación existente entre el estímulo relativo del isoproterenol en membranas de hematíes y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.	136
Tabla 44. Estímulo relativo del isoproterenol ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en membranas de hematíes en función de las variables clínicas cualitativas en los pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.	137
Tabla 45. Análisis del grado de correlación existente entre el bloqueo relativo del propranolol y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.	140
Tabla 46. Bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas en los pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.	141
Tabla 47. Cuadro resumen de las correlaciones entre la actividad de la AC en membranas de hematíes y las variables clínicas en los pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.	143
Tabla 48. Valores de AMPc (pmol/mg proteína/10 min) de los pacientes en su conjunto, de los pacientes de profilaxis primaria y secundaria, antes y tras la administración de un bolus iv de propranolol.	144
Tabla 49: $\bar{X} \pm Ds$ (n) del estímulo relativo y absoluto para el isoproterenol y el bloqueo relativo y absoluto para propranolol en membranas de hematíes de pacientes de profilaxis primaria y secundaria y en los pacientes cirróticos evaluados en su conjunto antes y después de la administración del bolus iv de propranolol.	145
Tabla 50. Análisis del grado de correlación existente entre la producción de AMPc basal en membranas de hematíes y las variables clínicas en los pacientes cirróticos con HTP en las muestras de sangre obtenidas tras la administración del bolus iv de propranolol.	146
Tabla 51. Producción de AMPc basal ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en membranas de hematíes en función de las variables clínicas evaluadas en los pacientes cirróticos con HTP en las muestras obtenidas tras la administración del bolus iv de propranolol.	147
Tabla 52. Análisis del grado de correlación existente entre la producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M en membranas de hematíes y las variables clínicas cuantitativas en las muestras de sangre de los pacientes cirróticos con HTP tras recibir un bolus iv de propranolol.	151
Tabla 53. Producción de AMPc ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en membranas de hematíes tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M en función de las variables clínicas cualitativas evaluadas en muestras de sangre de los pacientes cirróticos tras la administración de un bolus iv de propranolol.	152

---

Tabla 54. Análisis del grado de correlación existente entre el estímulo relativo del isoproterenol en membranas de hematíes y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes cirróticos con HTP después de la administración iv de propranolol.	153
Tabla 55. Estímulo relativo del isoproterenol en membranas de hematíes ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas en los pacientes cirróticos con HTP después de la administración de un bolus iv de propranolol.	154
Tabla 56. Análisis del grado de correlación existente entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes cirróticos con HTP después de la administración de un bolus iv de propranolol.	158
Tabla 57. Bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas en los pacientes cirróticos con HTP después de la administración de un bolus iv de propranolol.	159
Tabla 58. Cuadro resumen de las correlaciones entre la actividad de la AC en membranas de hematíes y las variables clínicas de los pacientes cirróticos con HTP tras la administración de un bolus iv de propranolol.	164
Tabla 59. Análisis del grado de correlación existente entre la producción de AMPc basal en membranas de hematíes y las variables clínicas en los pacientes de profilaxis primaria tras la administración de un bolus iv de propranolol.	165
Tabla 60. Producción de AMPc basal ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en membranas de hematíes en función de las variables clínicas cualitativas en los pacientes de profilaxis primaria tras la administración de un bolus iv de propranolol.	166
Tabla 61. Análisis del grado de correlación existente entre la producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M en membranas de hematíes y las variables clínicas en los pacientes de profilaxis primaria tras la administración de un bolus iv de propranolol.	168
Tabla 62. Producción de AMPc ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en membranas de hematíes tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M en función de las variables cualitativas clínicas estudiadas en los pacientes de profilaxis primaria tras la administración de un bolus iv de propranolol.	169
Tabla 63. Análisis del grado de correlación existente entre el estímulo relativo del isoproterenol en membranas de hematíes y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes de profilaxis primaria después de la administración de un bolus iv de propranolol.	172
Tabla 64. Estímulo relativo del isoproterenol en membranas de hematíes ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas en los pacientes de profilaxis primaria después de la administración de un bolus iv de propranolol.	173
Tabla 65. Análisis del grado de correlación existente entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y las variables clínicas en los pacientes de profilaxis primaria después de la administración de un bolus iv de propranolol.	174
Tabla 66. Bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas en los pacientes de profilaxis primaria después del bolus iv de propranolol.	175
Tabla 67. Cuadro resumen de las correlaciones entre la actividad de la AC y las variables clínicas en los pacientes de profilaxis primaria incluidos en el estudio tras la administración del bolus iv de propranolol.	177
Tabla 68. Análisis del grado de correlación entre la producción de AMPc basal y/o antes del estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M en membranas de hematíes y las	178

---

variables clínicas cuantitativas estudiadas en los pacientes de profilaxis secundaria tras la administración de un bolus iv de propranolol.	
Tabla 69. Producción de AMPc basal ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en membranas de hematíes en función de las variables clínicas cualitativas estudiadas en los pacientes de profilaxis secundaria tras la administración de un bolus iv de propranolol.	179
Tabla 70. Análisis del grado de correlación entre la producción de AMPc en membranas de hematíes tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M en función de las variables clínicas cuantitativas estudiadas en los pacientes de profilaxis secundaria tras la administración de un bolus iv de propranolol.	182
Tabla 71. Producción de AMPc ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en membranas de hematíes tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M en función de las variables cualitativas clínicas estudiadas en los pacientes de profilaxis secundaria tras la administración de un bolus iv de propranolol.	183
Tabla 72. Análisis del grado de correlación existente entre el estímulo relativo del isoproterenol en membranas de hematíes y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes de profilaxis secundaria después de recibir un bolus iv de propranolol.	185
Tabla 73. Estímulo relativo del isoproterenol ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas en las membranas de hematíes de pacientes de profilaxis secundaria después de la administración de un bolus iv de propranolol.	186
Tabla 74. Análisis del grado de correlación existente entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes de profilaxis secundaria después de la administración de un bolus iv de propranolol.	187
Tabla 75. Bloqueo relativo del propranolol ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en membranas de hematíes en función de las variables clínicas cualitativas en los pacientes de profilaxis secundaria después de la administración de un bolus iv de propranolol.	188
Tabla 76. Cuadro resumen de las correlaciones entre la actividad de la AC en membranas de hematíes y las variables clínicas en los pacientes de profilaxis secundaria incluidos en el estudio tras la administración de un bolus iv de propranolol.	197
Tabla 77. $\bar{X} \pm Ds$ (n) del estímulo relativo y absoluto para el isoproterenol y el bloqueo relativo y absoluto para propranolol en membranas de hematíes de pacientes cirróticos con HTP tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral y durante el EH inicial.	199
Tabla 78. Análisis del grado de correlación existente entre las variables clínicas cuantitativas y la producción de AMPc en membranas de hematíes de los pacientes cirróticos con HTP tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral.	201
Tabla 79. Producción de AMPc ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en membranas de hematíes en función de las variables clínicas cualitativas evaluadas en los pacientes cirróticos tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral.	202
Tabla 80. Análisis del grado de correlación existente entre la producción de AMPc en membranas de hematíes tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M y las variables clínicas en los pacientes cirróticos con HTP tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral.	203
Tabla 81. Producción de AMPc ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en membranas de hematíes tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M en función de las variables clínicas cualitativas de los pacientes cirróticos tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral.	204

---

Tabla 82. Análisis del grado de correlación existente entre el estímulo relativo del isoproterenol en membranas de hematíes y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes cirróticos con HTP después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral.	206
Tabla 83. Estímulo relativo del isoproterenol ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas en los pacientes cirróticos con HTP después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral.	207
Tabla 84. Análisis del grado de correlación existente entre el bloqueo relativo del propranolol y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes cirróticos con HTP después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral.	209
Tabla 85. Bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas en los pacientes cirróticos con HTP tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral.	210
Tabla 86 . Cuadro resumen de las correlaciones entre la actividad de la AC en membranas de hematíes y las variables clínicas en los pacientes cirróticos con HTP incluidos en el estudio tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral.	213
Tabla 87. $\bar{X} \pm Ds$ (n) del estímulo relativo y absoluto para el isoproterenol y el bloqueo relativo y absoluto para propranolol en membranas de hematíes de pacientes de profilaxis primaria antes de la administración iv de propranolol y después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral.	215
Tabla 88. Análisis del grado de correlación existente entre la producción basal de AMPc en membranas de hematíes y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes de profilaxis primaria tras 3 meses de tratamiento con propranolol por vía oral.	215
Tabla 89. Producción basal de AMPc ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en membranas de hematíes en función de las variables clínicas cualitativas en los pacientes de profilaxis primaria tras 3 meses de tratamiento con propranolol por vía oral.	216
Tabla 90. Análisis del grado de correlación existente entre la producción de AMPc en membranas de hematíes tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes de profilaxis primaria después de 3 meses de tratamiento con propranolol por vía oral.	217
Tabla 91. Producción de AMPc en membranas de hematíes tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas en los pacientes de profilaxis primaria después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral.	217
Tabla 92. Análisis del grado de correlación existente entre el estímulo relativo del isoproterenol en membranas de hematíes y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes de profilaxis primaria después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral.	218
Tabla 93. Estímulo relativo del isoproterenol en membranas de hematíes ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas en los pacientes de profilaxis primaria después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral.	219
Tabla 94. Análisis del grado de correlación existente entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes de profilaxis primaria después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral.	220
Tabla 95. Bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas en los pacientes de profilaxis primaria después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral.	221
Tabla 96. Cuadro resumen de las correlaciones entre la actividad de la AC en	224



---

membranas de hematíes y las variables clínicas en los pacientes de profilaxis primaria tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral.	
Tabla 97. $\bar{X} \pm Ds$ (n) del estímulo relativo y absoluto para el isoproterenol y el bloqueo relativo y absoluto para propranolol en membranas de hematíes de pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial y después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral.	225
Tabla 98. $\bar{X} \pm Ds$ (n) del estímulo relativo y absoluto para el isoproterenol y el bloqueo relativo y absoluto para propranolol en membranas de hematíes de pacientes de profilaxis primaria y secundaria tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral.	226
Tabla 99. Análisis del grado de correlación existente entre la producción de AMPc basal en membranas de hematíes y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes de profilaxis secundaria tras 3 meses de tratamiento con propranolol por vía oral.	227
Tabla 100. Producción basal de AMPc en membranas de hematíes ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas estudiadas en los pacientes de profilaxis secundaria tras 3 meses de tratamiento con propranolol por vía oral.	228
Tabla 101. Análisis del grado de correlación existente entre la producción de AMPc en membranas de hematíes tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes de profilaxis secundaria después de 3 meses de tratamiento con propranolol por vía oral.	229
Tabla 102. Producción de AMPc en membranas de hematíes tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas en los pacientes de profilaxis secundaria tras 3 meses de tratamiento con propranolol por vía oral.	230
Tabla 103. Análisis del grado de correlación existente entre el estímulo relativo del isoproterenol en membranas de hematíes y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes de profilaxis secundaria después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral.	231
Tabla 104. Estímulo relativo del isoproterenol en membranas de hematíes ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas en los pacientes de profilaxis secundaria después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral.	232
Tabla 105. Análisis del grado de correlación existente entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y las variables clínicas en los pacientes de profilaxis secundaria después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral.	233
Tabla 106. Bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas en los pacientes de profilaxis secundaria después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral.	234
Tabla 107. Cuadro resumen de las correlaciones entre la actividad de la AC en membranas de hematíes y las variables clínicas en los pacientes de profilaxis secundaria tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral.	238
Tabla 108. Resumen con las correlaciones relevantes entre la actividad de la AC en membranas de hematíes y las variables clínicas en función de la profilaxis de los pacientes.	239
Tabla 109. Resumen de las correlaciones relevantes entre la actividad de la AC en membranas de hematíes y las variables clínicas de los pacientes cirróticos con HTP.	240

---

FIGURAS	Página
Figura 1. Esquema de un receptor $\beta$ -adrenérgico tipo.	8
Figura 2. Funcionamiento del sistema receptor $\beta$ -adrenérgico.	9
Figura 3. Reconocimiento espacial de la adrenalina por el receptor $\beta_2$ -adrenérgico.	10
Figura 4: Esquema del modelo de los 2 estados.	11
Figura 5. Secuencia de eventos tras la activación del receptor $\beta$ -adrenérgico por la hormona.	14
Figura 6. Representación de la enzima proteína quinasa específica para AMPc.	15
Figura 7. Estructura de la membrana del hematíe.	22
Figura 8. Mecanismos implicados en la fisiopatología de la HTP.	36
Figura 9. Representación esquemática de la formación de varices esofágicas.	38
Figura 10. Representación de las acciones mediadas por la activación de los receptores adrenérgicos.	42
Figura 11. Acción de los fármacos $\beta$ -bloqueantes no selectivos.	42
Figura 12. Diseño del estudio.	55
Figura 13. Método de Hirata y separación con Percoll para la obtención de membranas de hematíes.	57
Figura 14. Método de Hirata y separación con Ficoll para la obtención de membranas de hematíes.	58
Figura 15. Continuación del método de Hirata para la obtención de membranas de hematíes.	59
Figura 16. Preparación de las muestras para la obtención de AMPc.	67
Figura 17. Protocolo para la determinación de AMPc por radioinmunoanálisis (RIA).	70
Figura 18. Protocolo para el ensayo de la actividad de la dopamina-beta-hidroxilasa.	77
Figura 19. Recta de calibración media para el método de Bradford.	82
Figura 20. Valores medios de las rectas estándares de AMPc.	83
Figura 21. Producción de AMPc en individuos sanos bajo condiciones estándares de trabajo.	85
Figura 22. Representación de las c.p.m alcanzadas en 2 días diferentes de estudio.	87
Figura 23. C.p.m obtenidas tras un periodo de 2 meses con un kit almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .	87
Figura 24. Representación gráfica de los valores de AMPc en muestras de controles separadas con Percoll.	89
Figura 25. Actividad basal de la AC en los controles en función del procedimiento de separación de los elementos celulares.	89
Figura 26. Actividad de la AC tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}\text{ M}$ en función del procedimiento de separación de los elementos celulares.	90
Figura 27. Linealidad de la cuantificación de octopamina.	92
Figura 28. Recta estándar de calibración de octopamina.	92
Figura 29. Representación de los valores de AMPc en membranas de hematíes ( $\bar{X}$ ) e IC 95% en los grupos de edad separados por el valor de la mediana de la edad en situación basal.	96
Figura 30. Representación de los valores de AMPc en membranas de hematíes ( $\bar{X}$ ) e IC 95% después de un estímulo con isoproterenol $10^{-4}\text{ M}$ en los grupos	97

---

de edad separados por el valor de la mediana de la edad.	
Figura 31. Representación de los picomoles de AMPc en membranas de hematíes en función de la edad de los pacientes en situación basal.	98
Figura 32. Representación de los picomoles de AMPc en membranas de hematíes en función de la edad de los pacientes después de un estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M.	98
Figura 33. Funcionalidad de la AC en membranas de hematíes de pacientes cirróticos y en controles.	99
Figura 34. Correlación existente entre el estímulo relativo del isoproterenol y la frecuencia cardiaca en las membranas de hematíes de pacientes cirróticos con HTP durante el EH inicial.	106
Figura 35. Correlación existente entre el estímulo relativo del isoproterenol y la GGT en las membranas de hematíes de pacientes cirróticos con HTP durante el EH inicial.	106
Figura 36. Correlación existente entre el estímulo relativo del isoproterenol y los niveles de bilirrubina en las membranas de hematíes de pacientes cirróticos con HTP durante el EH inicial.	107
Figura 37. Comparación entre el estímulo relativo del isoproterenol y la toma o no de espirolactona en el mes previo al EH en las membranas de hematíes de pacientes cirróticos con HTP durante el EH inicial.	107
Figura 38. Actividad de la AC en membranas de hematíes en el subgrupo de pacientes de profilaxis primaria durante el EH inicial.	110
Figura 39. Correlación entre la actividad basal de la AC en membranas de hematíes y la edad de los pacientes de profilaxis primaria durante el EH inicial.	113
Figura 40. Correlación entre la actividad basal de la AC en membranas de hematíes y el índice de Quick en los pacientes de profilaxis primaria durante el EH inicial.	113
Figura 41. Correlación entre la actividad de la AC estimulada por isoproterenol $10^{-4}$ M en membranas de hematíes y la edad de los pacientes en profilaxis primaria durante el EH inicial.	116
Figura 42. Correlación entre la actividad de la AC estimulada por isoproterenol $10^{-4}$ M en membranas de hematíes y la presión arterial diastólica de los pacientes en profilaxis primaria durante el EH inicial.	116
Figura 43. Comparación entre la actividad de la AC estimulada por isoproterenol $10^{-4}$ M en membranas de hematíes y el sexo de los pacientes en profilaxis primaria durante el EH inicial.	117
Figura 44. Correlación entre el estímulo relativo del isoproterenol y la fosfatasa alcalina en membranas de hematíes de pacientes de profilaxis primaria durante el EH inicial.	120
Figura 45. Correlación entre el estímulo relativo del isoproterenol en membranas de hematíes y la creatinina en los pacientes de profilaxis primaria durante el EH inicial.	120
Figura 46. Comparación entre el estímulo relativo del isoproterenol en membranas de hematíes y la espirolactona en el mes previo al EH inicial en los pacientes de profilaxis primaria.	121
Figura 47. Correlación entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y el GPVH en los pacientes de profilaxis primaria durante el EH inicial.	124
Figura 48. Correlación entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y el índice de Quick en los pacientes de profilaxis primaria durante	124

---

---

el EH inicial.	
Figura 49. Actividad de la AC ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en las membranas de hematíes de los pacientes de profilaxis secundaria durante el EH basal.	126
Figura 50. Correlación entre la producción basal de AMPc en membranas de hematíes y el índice de Quick en pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.	129
Figura 51. Correlación entre la producción basal de AMPc en membranas de hematíes y la presión arterial sistólica en pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.	129
Figura 52. Correlación entre la producción basal de AMPc en membranas de hematíes y la frecuencia cardiaca en pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.	130
Figura 53. Correlación entre la producción de AMPc en membranas de hematíes en respuesta a isoproterenol $10^{-4}$ M y la presión arterial sistólica en los pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.	133
Figura 54. Correlación entre la producción de AMPc en membranas de hematíes en respuesta a isoproterenol $10^{-4}$ M y la presión arterial media en los pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.	133
Figura 55. Correlación entre la producción de AMPc en respuesta a isoproterenol $10^{-4}$ M en membranas de hematíes y la frecuencia cardiaca en los pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.	134
Figura 56. Correlación entre la producción de AMPc en respuesta a isoproterenol $10^{-4}$ M en membranas de hematíes y los niveles de glucosa en los pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.	134
Figura 57. Correlación entre la producción de AMPc en respuesta a isoproterenol $10^{-4}$ M en membranas de hematíes y el índice de Quick en los pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.	135
Figura 58. Comparación entre la producción de AMPc en respuesta a isoproterenol $10^{-4}$ M en membranas de hematíes y el consumo activo de alcohol en los pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.	135
Figura 59. Correlación entre el estímulo relativo del isoproterenol y las concentraciones plasmáticas de GOT en pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.	138
Figura 60. Correlación entre el estímulo relativo del isoproterenol y las concentraciones plasmáticas de GGT en pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.	138
Figura 61. Correlación entre el estímulo relativo del isoproterenol y las concentraciones plasmáticas de bilirrubina en pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.	139
Figura 62. Comparación entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y la etiología de la cirrosis en los pacientes de profilaxis secundaria.	142
Figura 63. Correlación entre la producción basal de AMPc en membranas de hematíes y la edad en los pacientes cirróticos con HTP en muestras extraídas tras la administración de un bolus iv de propranolol.	148
Figura 64. Correlación entre la producción basal de AMPc en membranas de hematíes y la presión enclavada en los pacientes cirróticos con HTP en muestras extraídas tras la administración de un bolus iv de propranolol.	149

---

---

Figura 65. Correlación entre la producción basal de AMPc en membranas de hematíes y la presión libre en los pacientes cirróticos con HTP en muestras extraídas tras la administración de un bolus iv de propranolol.	149
Figura 66. Comparación entre la producción basal de AMPc en membranas de hematíes y la toma o no de espironolactona en el mes previo al EH inicial en los pacientes cirróticos con HTP en muestras extraídas tras la administración de un bolus iv de propranolol.	150
Figura 67. Correlación entre el estímulo relativo del isoproterenol en membranas de hematíes y la enzima GOT en los pacientes cirróticos con HTP después de la administración de un bolus iv de propranolol.	155
Figura 68. Correlación entre el estímulo relativo del isoproterenol en membranas de hematíes y la GPT en los pacientes cirróticos con HTP después de la administración de un bolus iv de propranolol.	155
Figura 69. Correlación entre el estímulo relativo del isoproterenol en membranas de hematíes y el peso de los pacientes cirróticos con HTP después de la administración de un bolus iv de propranolol.	156
Figura 70. Comparación entre el estímulo relativo del isoproterenol en membranas de hematíes después de la administración de un bolus iv de propranolol y la toma o no de $\beta$ -bloqueantes en el mes previo al EH inicial en los pacientes cirróticos con HTP.	157
Figura 71. Correlación entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y la presión arterial diastólica en los pacientes cirróticos con HTP después de la administración de un bolus iv de propranolol.	160
Figura 72. Correlación entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y la presión arterial media en los pacientes cirróticos con HTP después de la administración de un bolus iv de propranolol.	161
Figura 73. Correlación entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y la puntuación Child en los pacientes cirróticos con HTP después de la administración de un bolus iv de propranolol.	162
Figura 74. Correlación entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y los niveles de creatinina en los pacientes cirróticos con HTP después de la administración de un bolus iv de propranolol.	163
Figura 75. Correlación entre la producción de AMPc en membranas de hematíes y la edad en pacientes de profilaxis primaria tras la administración de un bolus iv de propranolol.	167
Figura 76. Correlación entre la producción de AMPc en membranas de hematíes y el índice de Quick en pacientes de profilaxis primaria tras la administración de un bolus iv de propranolol.	167
Figura 77. Correlación entre la frecuencia cardiaca y la producción de AMPc en membranas de hematíes tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M en pacientes de profilaxis primaria que han recibido un bolus iv de propranolol.	170
Figura 78. Correlación entre el índice de Quick y la producción de AMPc en membranas de hematíes tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M en pacientes de profilaxis primaria que han recibido un bolus iv de propranolol.	170
Figura 79. Comparación entre el sexo y la producción de AMPc en membranas de hematíes tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M en pacientes de profilaxis primaria que han recibido un bolus iv de propranolol.	171
Figura 80. Correlación entre las presiones libres tras la administración de un bolus iv de propranolol y el EH inicial, y el descenso en la producción de AMPc en membranas de hematíes inducido por propranolol $10^{-5}$ M (bloqueo	176

---

---

absoluto del propranolol) durante el EH inicial en los pacientes de profilaxis primaria.	
Figura 81. Correlación entre la actividad de la AC en membranas de hematíes y la frecuencia cardiaca en pacientes de profilaxis secundaria tras la administración de un bolus iv de propranolol.	180
Figura 82. Correlación entre la actividad de la AC en membranas de hematíes y la presión enclavada en los pacientes de profilaxis secundaria tras la administración de un bolus iv de propranolol.	180
Figura 83. Correlación entre la actividad de la AC en membranas de hematíes y la concentración de fosfatasa alcalina en pacientes de profilaxis secundaria tras la administración de un bolus iv de propranolol.	181
Figura 84. Correlación entre la actividad de la AC en membranas de hematíes estimulada por isoproterenol $10^{-4}$ M y los niveles plasmáticos de glucosa en pacientes de profilaxis secundaria tras la administración de un bolus iv de propranolol.	184
Figura 85. Correlación entre la actividad de la AC en membranas de hematíes estimulada por isoproterenol $10^{-4}$ M y los niveles plasmáticos de fosfatasa alcalina en pacientes de profilaxis secundaria tras la administración de un bolus iv de propranolol.	184
Figura 86. Correlación entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y la presión enclavada en pacientes de profilaxis secundaria tras la administración de un bolus iv de propranolol.	189
Figura 87. Correlación entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y la presión arterial sistólica en pacientes de profilaxis secundaria tras la administración de un bolus iv de propranolol.	190
Figura 88. Correlación entre el bloqueo relativo del propranolol y la presión arterial diastólica en pacientes de profilaxis secundaria tras la administración de un bolus iv de propranolol.	191
Figura 89. Correlación entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y la presión arterial media en pacientes de profilaxis secundaria tras la administración de un bolus iv de propranolol.	192
Figura 90. Correlación entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y la puntuación Child en pacientes de profilaxis secundaria tras la administración de un bolus iv de propranolol.	193
Figura 91. Correlación entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y los niveles plasmáticos de creatinina en pacientes de profilaxis secundaria tras la administración de un bolus iv de propranolol.	194
Figura 92. Comparación entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y la respuesta al EH en pacientes de profilaxis secundaria tras la administración de un bolus iv de propranolol.	195
Figura 93. Correlación entre las presiones enclavadas tras la administración de un bolus iv de propranolol y el EH inicial, y el descenso en la producción de AMPc en membranas de hematíes inducido por propranolol $10^{-5}$ M (bloqueo absoluto del propranolol) en los pacientes de profilaxis secundaria.	196
Figura 94. Valores medios de AMPc en membranas de hematíes durante el EH inicial y tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral en los pacientes cirróticos con HTP.	198
Figura 95. Representación de los valores individuales de AMPc de los pacientes cirróticos medidos en membranas de hematíes en condiciones basales (sin estímulo), tras un estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M y en presencia de	199

---

---

propranolol durante el EH inicial.	
Figura 96. Representación de los valores individuales de AMPc de los pacientes cirróticos medidos en membranas de hematíes en condiciones basales (sin estímulo), tras un estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M y en presencia de propranolol después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral.	200
Figura 97. Comparación entre la producción de AMPc en membranas de hematíes tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral y la toma o no de espironolactona en el mes previo al EH inicial.	205
Figura 98. Correlación entre el estímulo relativo del isoproterenol en membranas de hematíes de pacientes cirróticos con HTP y la presión libre después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral.	208
Figura 99. Correlación entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes de pacientes cirróticos con HTP tras 3 meses de tratamiento con propranolol y el número de bolsas de sangre que se transfundieron a los pacientes durante el episodio de sangrado.	211
Figura 100. Comparación entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes de pacientes cirróticos con HTP tras 3 meses de tratamiento con propranolol y la toma o no de lactulosa antes del EH inicial.	212
Figura 101. Actividad de la AC en membranas de hematíes de pacientes de profilaxis primaria tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral.	214
Figura 102. Correlación entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y la presión arterial diastólica en los pacientes de profilaxis primaria tras 3 meses de tratamiento con propranolol por vía oral.	222
Figura 103. Correlación entre las frecuencias cardíacas tras 3 meses de tratamiento con propranolol por vía oral y el EH inicial, y el incremento en la producción de AMPc inducido por isoproterenol $10^{-4}$ M (estímulo absoluto del isoproterenol) en membranas de hematíes tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral en los pacientes de profilaxis primaria.	223
Figura 104. Actividad de la AC en membranas de hematíes en los pacientes de profilaxis secundaria tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral.	225
Figura 105. Correlación entre el bloqueo relativo del propranolol y el número de bolsas de sangre transfundidas en los pacientes de profilaxis secundaria tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral.	235
Figura 106. Comparación entre el bloqueo relativo del propranolol y la toma o no de lactulosa en el mes previo al EH inicial en los pacientes de profilaxis secundaria tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral.	236
Figura 107. Correlación entre los cambios en las presiones arteriales sistólicas tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral y el EH inicial, y el incremento en la producción de AMPc inducido por isoproterenol $10^{-4}$ M (estímulo absoluto del isoproterenol) en pacientes de profilaxis secundaria después de 3 meses de tratamiento con propranolol.	237
Figura 108. Actividad de la DBH sérica (UI) en controles sanos y pacientes cirróticos.	241
Figura 109. Correlación entre la actividad de la DBH sérica (UI DBH) y la producción basal de AMPc en las membranas aisladas de hematíes en pacientes cirróticos.	242
Figura 110. Correlación entre la actividad de la DBH sérica (UI DBH) y la formación de AMPc tras la incubación de las membranas de hematíes con isoproterenol $10^{-4}$ M en pacientes cirróticos.	242

---

---

Figura 111. Correlación entre la actividad de la DBH sérica (UI DBH) y el incremento neto en la producción de AMPc formado tras la incubación de membranas de hematíes con isoproterenol $10^{-4}$ M en pacientes cirróticos.	243
Figura 112. Correlación entre los valores de AMPc en membranas de hematíes y la presión arterial sistólica en los pacientes de profilaxis primaria.	244
Figura 113. Correlación entre los valores de AMPc en membranas de hematíes y la frecuencia cardiaca en pacientes de profilaxis primaria.	245
Figura 114. Correlación entre los valores de AMPc en membranas de hematíes y la presión arterial sistólica en pacientes de profilaxis secundaria.	245
Figuras 115. Correlaciones entre los valores de AMPc en membranas de hematíes y la frecuencia cardiaca en los pacientes de profilaxis secundaria.	246

---







## **INTRODUCCIÓN**

---

## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL:

El trabajo cuya memoria se presenta es un estudio de la funcionalidad de los receptores  $\beta_2$  adrenérgicos en hematíes de pacientes cirróticos con hipertensión portal y varices esofágicas. Se evalúa si existen cambios en la función de dichos receptores en pacientes cirróticos respecto a la funcionalidad en voluntarios sanos, y si los cambios guardan alguna relación con la respuesta al tratamiento preventivo del sangrado por varices esofágicas con antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos no selectivos. En esta introducción se detalla el funcionamiento y características del sistema nervioso adrenérgico (SNA), el receptor  $\beta$  y el hematíe como modelo de trabajo, haciendo un énfasis especial sobre lo que acontece en estos pacientes.

## 2. SISTEMA NERVIOSO ADRENÉRGICO (SNA):

El SNA juega un papel fundamental en la regulación homeostática de una gran variedad de funciones fisiológicas, como la frecuencia y la fuerza de las contracciones cardíacas, el tono vascular, la presión arterial, el tono de las vías aéreas bronquiales, el metabolismo de los hidratos de carbono y ácidos grasos, la liberación de hormonas (insulina, hormonas hipofisarias), la afectividad, el apetito, la conducta sexual, la actividad psicomotora, y en general, todos los mecanismos implicados en las reacciones de miedo, defensa y huida (Hoffman y Taylor, 2003).

La multitud de cambios fisiológicos y metabólicos que siguen a la estimulación de los nervios simpáticos de los mamíferos ocurre normalmente en respuesta a la actividad física forzada, el estrés, las reacciones alérgicas generalizadas y otras situaciones en que el organismo es provocado (Weiner, 1985), y está mediada por la liberación de los neurotransmisores adrenérgicos, que son catecolaminas: noradrenalina (NA) y adrenalina (A), desde las terminaciones nerviosas.

La adrenalina sólo cumple un papel de neurotransmisor en el Sistema Nervioso Central (SNC), mientras que en la periferia únicamente se ha descrito su función como hormona, ya que es secretada por las células cromafines de la médula suprarrenal, desde donde pasa a la circulación sistémica para ejercer diversas funciones adrenérgicas en tejidos periféricos. Esta adrenalina secretada por la médula suprarrenal no actúa directamente en el SNC, dado que las catecolaminas no atraviesan la barrera hematoencefálica.

Los efectos de estos neurotransmisores van a depender de los tipos de receptores adrenérgicos que existan en cada tejido, de sus densidades relativas, de su localización en los distintos tipos celulares, de su localización en la sinapsis (pre- o post- sináptica) y de la capacidad del neurotransmisor para estimularlos. Así, la adrenalina estimula preferentemente los adrenoceptores  $\alpha$  ( $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ ),  $\beta_1$  y  $\beta_2$ , mientras que la noradrenalina estimula en condiciones normales los adrenoceptores  $\alpha$  ( $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ ),  $\beta_1$  y  $\beta_3$  (Russel y Moran, 1980; Minneman y cols, 1981; Bryan y cols, 1981; Lefkowitz y cols, 1983; Bylund y cols, 1994; Hoffman y Taylor, 2003).

Existe otra catecolamina natural, la dopamina, que se encuentra sobre todo en los ganglios de la base y otras localizaciones del SNC, aunque también se ha encontrado en la periferia (Weiner, 1985).

En general, cada neurotransmisor va a ejercer su acción dependiendo del tipo de receptor y número de ellos que haya en un tejido determinado. Revisaremos, por tanto, en profundidad, el concepto de receptor y los tipos de adrenoceptores conocidos.

### **3. LOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS (ADRENOCEPTORES):**

#### **3.1. INTRODUCCIÓN:**

##### **3.1.1. Concepto de adrenoceptor:**

Un receptor es una entidad que reconoce y se une específicamente a un ligando (molécula) determinado (Levitzki, 1984; Ross y Kenakin, 2003), iniciando así la acción de dicho ligando. Más específicamente, un adrenoceptor es el lugar de la membrana celular donde se unen la noradrenalina y adrenalina para ejercer sus efectos como neurotransmisores y hormonas (Guimarães y cols, 2001).

El receptor constituye una entidad molecular compleja y dinámica que tiene la capacidad de alterar su conformación y está dotado de movilidad hacia fuera, hacia dentro y a través de la membrana celular pudiendo penetrar en el citosol. Los receptores son macromoléculas de naturaleza proteica, asociada a veces a radicales lipídicos o hidrocarbonados, que se encuentran localizadas en un gran número en las membranas externas de las células, en el citoplasma, o incluso en el núcleo celular. Su función esencial es la de iniciar complejos fenómenos intracelulares (Pazos, 2003), como:

- Modificaciones iónicas que repercuten en cambios de potencial y en el movimiento de iones a través de la membrana celular con sus consecuencias bioeléctricas y metabólicas.
- Modificaciones de la actividad de múltiples enzimas, lo que se traduce en cambios en el metabolismo de proteínas, hidratos de carbono, lípidos, síntesis de ácidos nucleicos, etc..
- Modificaciones en la estructura de proteínas, que darán origen a cambios funcionales de la célula.

Para poder llevar a cabo todo este conjunto de reacciones, los receptores están ligados a:

- Estructuras de membrana que se comportan como ionóforos o canales iónicos.
- Estructuras (enzimas) capaces de mediar transformaciones básicas tales como: fosforilación, metilación y la glicosilación de proteínas.
- Estructuras capaces de iniciar a nivel de membrana modificaciones profundas en los lípidos tales como los fosfoinositoles o la fosfatidiletanolamina.
- Estructuras intracelulares asociadas a la iniciación o ejecución de procesos metabólicos diversos.

##### **3.1.2. Clasificación y evolución de los adrenoceptores:**

La existencia de múltiples tipos de receptores adrenérgicos fue sugerida por primera vez por Dale (1906) en el sistema cardiovascular, demostrando que la mayor parte de los efectos excitatorios desencadenados por la estimulación de nervios simpáticos, pero no los inhibitorios, eran antagonizados por los alcaloides del

cornezuelo de centeno, lo que sugería que los efectos de la activación simpática se debían a la presencia de dos tipos de receptores, unos de tipo excitatorio y otros inhibitorios.

Ahlquist (1948), observó dos patrones distintos en la capacidad de los agonistas simpaticomiméticos para provocar una respuesta farmacológica en distintos órganos y propuso la división de los adrenoceptores en dos tipos, alfa ( $\alpha$ ) y beta ( $\beta$ ). Esto fue confirmado posteriormente por la identificación de los antagonistas selectivos, fentolamina y ergotamina para los  $\alpha$ -adrenoceptores (Powell y Slater, 1958) y del propranolol para los  $\beta$ -adrenoceptores (Black y cols, 1964).

Posteriormente, el estudio de la potencia relativa de los distintos agonistas, y el desarrollo de agonistas y antagonistas selectivos permitió subclasificar los receptores  $\beta$  en  $\beta_1$  (muy abundante en el músculo cardíaco) y  $\beta_2$  (muy abundante en el músculo liso vascular y bronquial) (Lands y cols, 1967; Kirpekar y cols, 1971; Langer y cols, 1971; Starke, 1971).

Arch y cols (1984) trabajando con adipocitos marrones de rata encontraron un nuevo grupo de receptores  $\beta$ -adrenérgicos que no cumplían los criterios clásicos de los receptores  $\beta_1/\beta_2$ . Posteriormente otros autores han apoyado estos datos (Bojanic y cols, 1985). Finalmente Emorine y cols (1989) caracterizaron molecularmente este nuevo receptor al que denominaron  $\beta_3$ . Este receptor que se había localizado en adipocitos de rata, también se ha encontrado en vasos sanguíneos donde media vasodilatación (Rohrer y cols, 1999). En la actualidad hay indicios de la existencia de un posible  $\beta_4$ -adrenoceptor en tejido adiposo marrón, puesto que algunas observaciones no pueden explicarse totalmente por la existencia solo de  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$  (Guimarães y cols, 2001). Los tres (o cuatro) subtipos de  $\beta$ -adrenoceptores pueden ser activados por noradrenalina y adrenalina. Sin embargo, en contraste con los  $\alpha$ -adrenoceptores, las catecolaminas endógenas poseen diferente afinidad por los subtipos  $\beta$ . Así pues, la primera distinción entre  $\beta_1$  y  $\beta_2$  es la potencia relativa de adrenalina y noradrenalina para estimularles, siendo equipotentes para estimular el  $\beta_1$ -adrenoceptor pero más potente la adrenalina para estimular el receptor  $\beta_2$  (Minneman y cols, 1981). Noradrenalina es más potente que adrenalina como agonista  $\beta_3$ -adrenérgico. La catecolamina sintética, isoproterenol, es un agonista potente de los 3 subtipos de adrenoceptores  $\beta$ , pero no estimula de modo eficaz los adrenoceptores  $\alpha$ . Propranolol y sus diferentes análogos actúan como antagonistas tanto de los receptores  $\beta_1$  como de los  $\beta_2$ . Posteriormente, se han identificado antagonistas sintéticos selectivos para los  $\beta_1$ -adrenoceptores como el metoprolol, practolol, atenolol, betaxolol, esmolol y acebutolol. Entre los agonistas  $\beta_2$  sintéticos cabe señalar la terbutalina, salbutamol, salmeterol y zinterol y entre los antagonistas selectivos  $\beta_2$  hay que incluir la butoxamina y el ICI 118551 (IUPHAR, 1998; Hoffman y cols, 2003; García Sevilla y Meana, 2003).

La existencia de diferentes subtipos de  $\alpha$ -adrenoceptores se hizo evidente a partir de los resultados de Starke y cols (1971) que demostraron que la activación de los  $\alpha$ -adrenoceptores pre- y postsinápticos depende de las potencias relativas de los distintos agonistas: bajas concentraciones de clonidina y oximetazolina activan selectivamente los  $\alpha$ -adrenoceptores presinápticos, mientras que fenilefrina y metoxamina activan selectivamente los  $\alpha$ -adrenoceptores postsinápticos. De forma similar, la potencia relativa de los antagonistas apoyaba esta diferenciación: fenoxibenzamina fue 30 veces más potente en el bloqueo postsináptico (Dubocovich y Langer, 1974) mientras que yohimbina bloqueaba preferencialmente los  $\alpha$ -adrenoceptores presinápticos. Langer (1974) sugirió que los  $\alpha$ -adrenoceptores que

median la respuesta de los órganos efectores se denominasen  $\alpha_1$  y aquellos que median una reducción en la liberación del transmisor durante la estimulación del nervio,  $\alpha_2$ . En la actualidad se conocen distintos subtipos de cada uno de estos receptores  $\alpha$  (Guimarães y cols, 2001).

En la tabla 1 se muestra una clasificación de los receptores adrenérgicos conocidos hasta la fecha.



Tipo	Subtipo	Localización cromosoma humano	Potencia	Localización	Efecto	Agonistas selectivos	Antagonistas selectivos	Potencia antagonistas	2º mensajero y efectores
<b>Alfa adrenérgicos</b>			A= NA>>ISO						
$\alpha_1$	$\alpha_{1A}$ $\alpha_{1B}$ $\alpha_{1D}$ $\alpha_{1L}?$	8 5 20 -		Vasos sanguíneos Útero Ojo Esfínter gastrointestinal y urinario Hígado	Vasoconstricción Contracción del útero Midriasis Contracción esfínter Gluconeogénesis	AG 1603 Fenilefrina	Prazosin 5-metilurapidil SNAP 5089 REC 152739 RS 17053 BMY 7378 SKF 105854	Prazosina ( $pA_2$ 9-10) (+)-niguldipina ( $pA_2$ 9.5-10.5) BMY 7378 ( $pA_2$ 8.0)	Activación PL vía Gp/q y provoca $\uparrow$ entrada de $Ca^{2+}$ al interior celular
$\alpha_2$	$\alpha_{2A}$ $\alpha_{2B}$ $\alpha_{2C}$	10 2 4		Vasos sanguíneos Páncreas Ganglios simpáticos Plaquetas Autoreceptores	Vasoconstricción $\downarrow$ secreción insulina $\downarrow$ liberación de NA $\uparrow$ agregación plaquetaria	Oximetazolina (parcial) $\alpha$ -metilnoradrenalina UK 14304 Desmedetomidina Clonidina	Yohimbina Idazoxan Imiloxan BRL 44408 BRL 48962	Prazosina (Kb 460- 1660 nM) Yohimbina (Kb 5.6 nM) Rauwolscina (Kb 6.6- 15 nM) BRL 44408 (Kb 8.3- 12 nM) Fentolamina (Kb 2.3-34 nM)	Descenso AMPc vía Gi y provoca disminución de la actividad de canales de $Ca^{2+}$ (L y N) vía Go y aumento de la actividad de canales de $K^+$ vía Gi.
<b>Beta adrenérgicos</b>									
$\beta_1$		10	ISO>A= NA	Corazón Riñón	$\uparrow$ cronotropismo $\uparrow$ inotropismo $\uparrow$ secreción renina	Dobutamina Xamoterol Denopamina TO 509	Atenolol Practolol Metoprolol Bisopronol Betaxolol Betaxolol CGP 20712 A	Atenolol ( $pA_2$ 7.6) Bisopronol ( $pA_2$ 7.5) Betaxolol ( $pA_2$ 8.5) Practolol ( $pA_2$ 6.5) CGP 20712 A ( $pA_2$ 9.6)	$\uparrow$ AMPc vía Gs
$\beta_2$		5	ISO>A>>NA	Vasos Sanguíneos Bronquios Útero Hígado	Vasodilatador Broncodilatador Úteroinhibidor Glucoenolisis Gluconeogénesis	Fenoterol Salbutamol Formoterol Terbutalina Salmeterol	Butoxamina ICI 118551	ICI 118551 ( $pA_2$ 9.3)	$\uparrow$ AMPc vía Gs
$\beta_3$		8	ISO = NA>A	Adipocitos	Lipólisis	BRL 37344 CGP 12177 CL 316243	SR 59230 A	ICI 118551 (pKb 5.9) SR 52930 (pKb 8.2-8.8) (-)-bupranolol ( $pA_2$ 550)	$\uparrow$ AMPc vía Gs
$\beta_4?$		-	37344>ISO>NA	Tejido cardiaco	$\uparrow$ Gasto cardiaco	-	Bupranolol	Bupranolol>CGP 207012 A	$\uparrow$ AMPc vía Gs

**Tabla 1.** Clasificación de los receptores adrenérgicos: (IUPHAR, 1998; García-Sevilla y Meana, 2003 y Hoffman, 2003). A: adrenalina; NA: noradrenalina; ISO: isopreterenol; PL: fosfolipasa (A, C, D); AMPc: adenosín monofosfato cíclico; Gp/q: proteína G perteneciente a la familia Gq. Gi/o: proteína G inhibidora. Gs: proteína G estimuladora.  $pA_2$ : logaritmo negativo en base 10 de la concentración molar de antagonista cuya presencia obliga a doblar la concentración de agonista necesaria para alcanzar la respuesta original máxima. Kb: constante del equilibrio de disociación de la combinación de un antagonista competitivo reversible con el receptor. pKb: logaritmo negativo de la constante de equilibrio de la combinación del antagonista competitivo reversible con el sitio de unión. pKb y  $pA_2$  coincidirán sólo si la pendiente es 1.

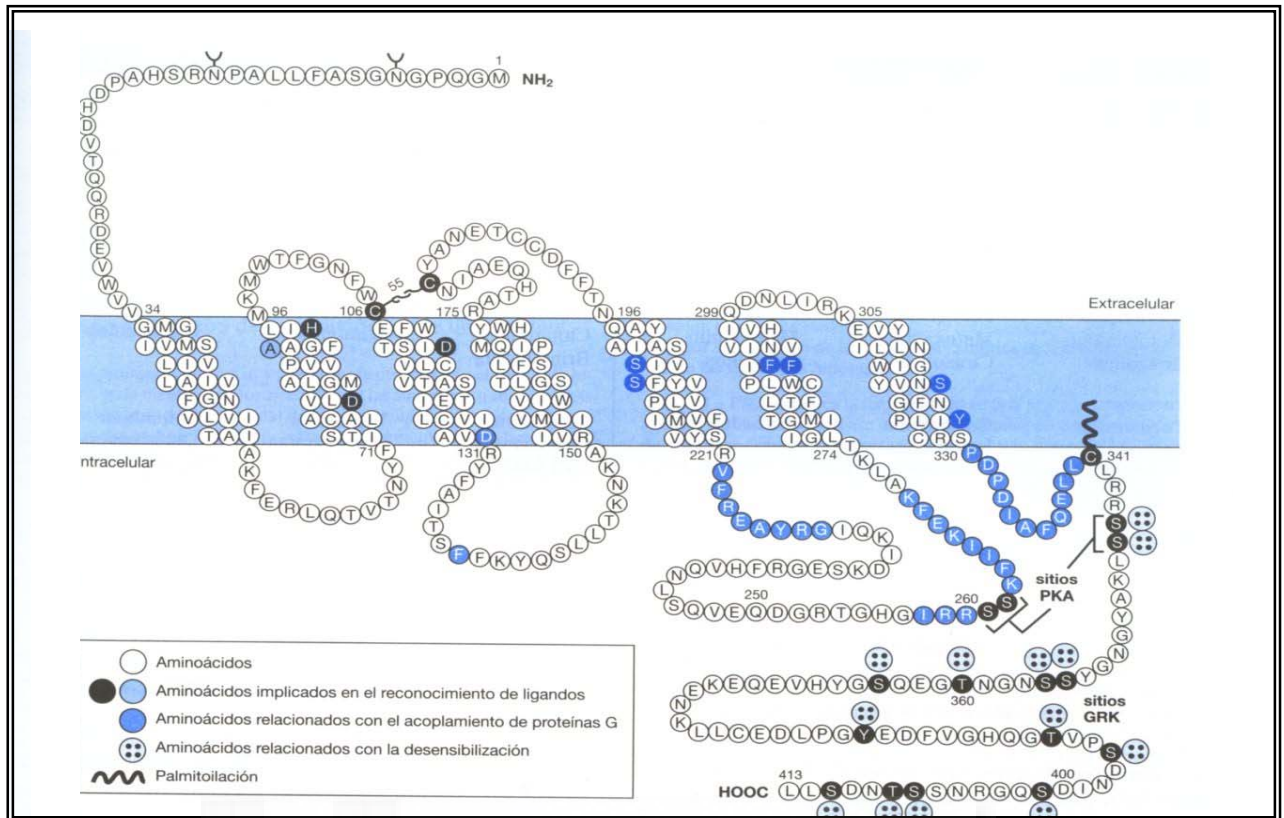
### 3.2. ESTRUCTURA DEL RECEPTOR $\beta$ -ADRENÉRGICO:

Tanto en estructura como en función los receptores adrenérgicos se relacionan con los receptores de gran variedad de hormonas y neurotransmisores que se acoplan a proteínas G (Lefkowitz, 2000).

Dada la baja concentración de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en las membranas celulares (50-500 fmol/mg de proteína), se requiere habitualmente una purificación de hasta 100.000 veces para aislarlos de forma homogénea (Cerione y cols, 1983). La cromatografía de afinidad unida a los métodos tradicionales ha contribuido a mejorar dicho aislamiento (Shorr, 1981). En 1986 se dió un paso importante en este campo cuando Dixon y cols, clonaron el gen y el ADN complementario (ADNc) responsables de la síntesis del receptor  $\beta$ -adrenérgico del mamífero (purificado a partir del pulmón de hamster). De esta forma, conociendo la secuencia de aminoácidos del  $\beta$ -adrenoceptor, observaron la extraordinaria homología en cuanto a secuencia y disposición tridimensional con la molécula rodopsina. En Octubre de ese mismo año, Kubo y cols clonaron y analizaron la secuencia del ADNc del receptor muscarínico en el cerdo mostrando nuevamente una gran homología con el receptor  $\beta$ -adrenérgico y la rodopsina en cuanto a la secuencia de aminoácidos, por lo que se propuso la existencia de una estructura tipo de todos los receptores acoplados a proteínas G. Todos los receptores  $\beta$ -adrenérgicos poseen un patrón estructural común (Levitzki, 1988; Böhm y cols, 1997; Hoffman y Taylor, 2003 y García-Sevilla y Meana, 2003):

1. Contienen 7  $\alpha$ -hélices hidrofóbicas transmembrana de 22-24 residuos cada una, conectadas por tres bucles extracelulares y tres intracelulares. La región de la molécula que se acopla a la proteína G es la tercera asa citoplasmática
2. La región amino-terminal posee 2 sitios propios de N-glicosilación.
3. La región carboxi-terminal contiene varios residuos de serina y de treonina, que son los lugares claves para que se lleve a cabo la fosforilación de estas moléculas receptoras (Homcy y cols, 1991). Se ha barajado que el motivo de dileucina del extremo C-terminal podría estar implicado en la internalización inducida por los agonistas del receptor  $\beta_2$  adrenérgico (Gabilondo y cols, 1997).
4. Ejercen su acción mediante la unión a un tipo de proteínas llamadas proteína G.
5. Estimulan al efector (la adenilato ciclasa) por interacción con la subunidad estimuladora de la proteína Gs.
6. En la unión del agonista (ligando) al receptor es fundamental el aminoácido Asp<sup>113</sup>.

A continuación se muestra una representación de un receptor  $\beta$ -adrenérgico tipo (figura 1):



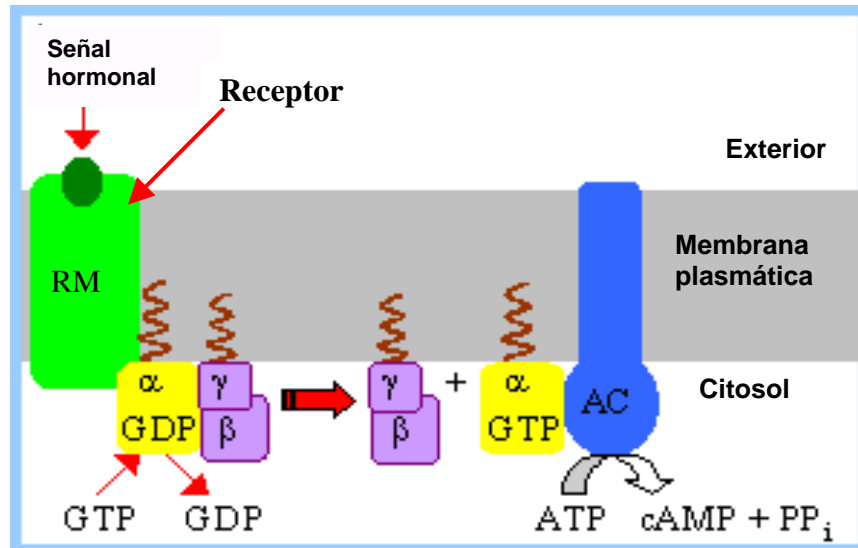
**Figura 1.** Esquema de un receptor  $\beta$ -adrenérgico tipo (García-Sevilla y Meana, 2003).

### 3.3. FUNCIONAMIENTO DE LOS RECEPTORES $\beta$ ADRENÉRGICOS:

Mediante estudios dinámicos se ha visto que el receptor  $\beta$ -adrenérgico propiamente dicho está fijado al citoesqueleto de la membrana, y que sus agonistas provocan la pérdida de esta fijación (Cherskey, 1984). Cuando el agonista se une a la unidad receptora se pone en marcha un proceso de metilaciones que aumenta la fluidez de la membrana en el entorno del receptor (Hirata y cols, 1979). Cerione y cols en 1983 consiguieron insertar receptores  $\beta$ -adrenérgicos, purificados de distintas fuentes, en vesículas de fosfolípidos, y posteriormente fusionaron éstas con células que carecían de dichos receptores; de esta manera lograron transferir la capacidad de respuesta a los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos de las células de las que se purificaron los receptores. Estos experimentos permitieron concluir que los receptores  $\beta$ -adrenérgicos contienen tanto el lugar de unión a los agonistas como el sitio que interacciona con la unidad catalítica, presumiblemente a través de una proteína G reguladora.

El funcionamiento del sistema receptor  $\beta$ -adrenérgico de un modo esquemático es el siguiente (Rodbell, 1980) (figura 2): el receptor de membrana (R) reconoce con una elevada especificidad al agonista o a la hormona (H); la unión del ligando al receptor, activa al receptor (R\*), el cual y como consecuencia de ello interacciona con una proteína G reguladora, que posee la capacidad de unirse a los nucleótidos de guanina. La proteína G se activa, iniciándose de esta forma una secuencia de reacciones que finalmente activan a la unidad catalítica efectora que es la enzima adenilato ciclasa (AC); ésta cataliza el metabolismo de ATP a AMPc (Davoren y Sutherland, 1963), que funcionaría como segundo mensajero (Sutherland y cols, 1965).





**Figura 2.** Funcionamiento del sistema receptor  $\beta$ -adrenérgico. R: receptor acoplado a proteína G; GDP: guanosin difosfato; GTP: guanosin trifosfato; AC: adenilato ciclasa; ATP: adenosin trifosfato; cAMP: adenosin monofosfato cíclico; PP<sub>i</sub>: fosfato inorgánico;  $\alpha$ : subunidad alfa de la proteína G;  $\beta$ : subunidad beta de la proteína G;  $\gamma$ : subunidad gamma de la proteína G.

A continuación expondré con detalle cada uno de estos procesos.

### 3.4. ACOPLAMIENTO DEL AGONISTA CON LA PROTEINA RECEPTORA:

El receptor  $\beta$ -adrenérgico se halla localizado en la membrana celular (Davoren y Sutherland, 1963), concretamente en su superficie y orientado hacia el espacio extracelular (Venter, 1981). La concentración de receptores en la mayoría de los tejidos está en el rango de fmoles/mg de tejido ( $10^{-12}$  a  $10^{-8}$  M) (Levitzki, 1984).

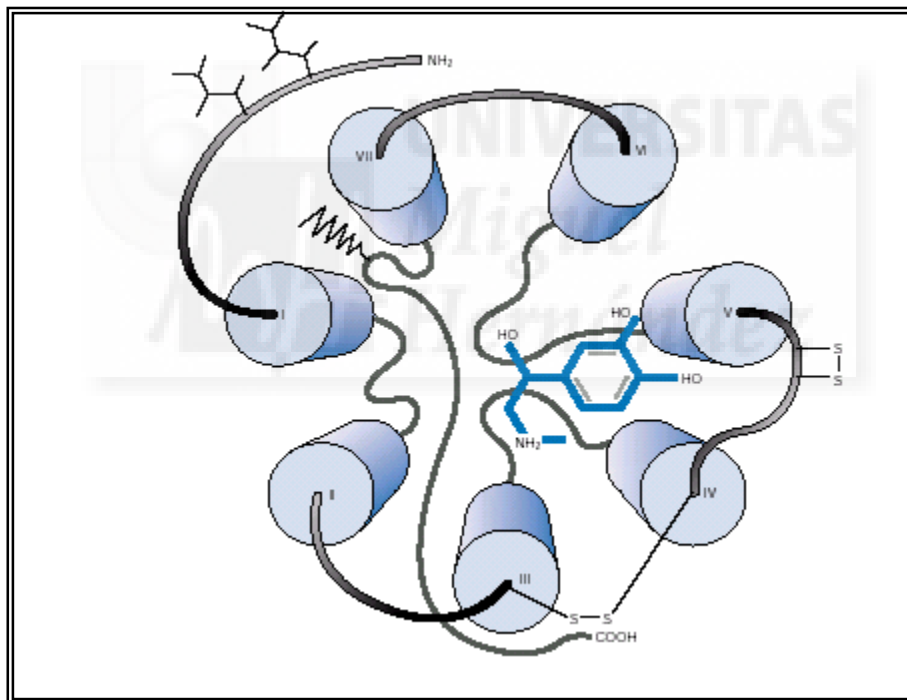
El efecto que produce el agonista sobre el sistema receptor  $\beta$ -adrenérgico/adenilato ciclasa no se explica en base a una reacción de difusión molecular controlada, sino a la verdadera unión a la molécula receptora (Venter, 1981; Levitzki, 1986).

Los 2 requisitos básicos de un receptor farmacológico son *la afinidad* elevada por “su” fármaco, con el que se fija aún en presencia de una concentración muy pequeña de dicho fármaco, y *la especificidad* gracias a la cual puede discriminar a una molécula de otra, aún cuando sean parecidas.

La afinidad se debe a la formación de enlaces entre fármaco y receptor; el más frecuente es el iónico, pero puede reforzarse con otros enlaces: fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas. Excepcionalmente se pueden formar enlaces covalentes que son los más firmes y que suelen originar interacciones irreversibles. Generalmente la fijación de un fármaco a su receptor es de carácter reversible, sobre todo si el fármaco es un agonista. La afinidad de un fármaco por su receptor tiene que ser grande, con valores acordes con los rangos de concentración alcanzados por ese fármaco en la biofase. Muy pocos agonistas  $\beta_2$  han mostrado tener más afinidad que el isoproterenol y de hecho, algunos como el salbutamol tienen relativamente poca afinidad por los  $\beta_2$  adrenoceptores (Johnson, 1998).

La unión del fármaco agonista al receptor  $\beta$ -adrenérgico conduce a cambios conformacionales en los dominios transmembrana III y VI del adrenoceptor  $\beta$  (Gether y cols, 1997) que conllevan por una parte la consiguiente activación de la proteína G, y por otra, la liberación del agonista de su unión al receptor. Mediante estudios de mutagénesis dirigida y el análisis de un gran número de ligandos, se han identificado diferentes residuos de aminoácidos de gran relevancia en la unión del agonista al sitio activo del receptor  $\beta$ -adrenérgico. Cabe destacar el Aspartato (Asp)-residuo 113 (contado desde la región extracelular o N-terminal) del tercer dominio; dos residuos de serinas (Ser), 204 y 207 situadas en el quinto dominio, y dos fenilalaninas (Phe), 259 y 290, en el sexto dominio. Se ha postulado que Asp113 se une al nitrógeno de la molécula agonista del receptor  $\beta$ , mientras que los dos residuos de Ser interactúan con los grupos hidroxilos del anillo de fenilo. También existen otros residuos importantes como Asp39, en el segundo dominio, treonina (Thr)164, Asp117 en el dominio tercero, Ser169 en el dominio cuarto, Ser209/212 en el dominio quinto y Phe309 en el dominio sexto. Wieland y cols (1996) mostraron también la implicación de Asn293 en el reconocimiento estereoespecífico del agonista y en la activación del receptor  $\beta$ .

En la figura 3 se muestra un esquema del reconocimiento espacial de la adrenalina por el receptor  $\beta$ -adrenérgico.



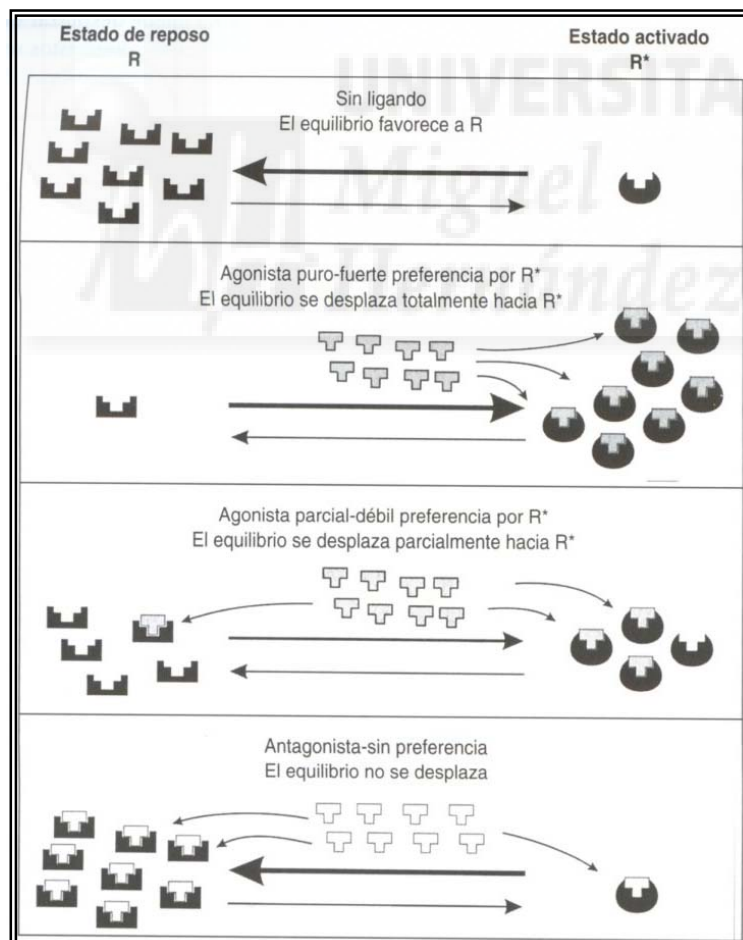
**Figura 3.** Reconocimiento espacial de la adrenalina por el receptor  $\beta_2$ -adrenérgico (García-Sevilla y Meana, 2003).

Los antagonistas no interactúan exactamente con los mismos aminoácidos que los agonistas en su unión al receptor  $\beta$ -adrenérgico. Parece que, aunque los antagonistas probablemente se unan a Asp113 y Asp79, no interactúan con los dos residuos de Ser del quinto dominio pero sí con asparragina (Asn)312 en el dominio siete (Strader, 1989; Strader y cols, 1994; Johnson, 1998).

La especificidad, es decir, la capacidad del receptor para diferenciar distintos fármacos determina que sólo un tipo de fármaco se una de forma absolutamente eficaz a un tipo de receptor. Esta selectividad requiere una estructura química espacial adecuada

para la unión, lo que llevó a la comparación de la interacción fármaco-receptor con la unión llave-cerradura, en la cual el fármaco sería la llave y el receptor la cerradura. Hoy no podemos aceptar esta teoría por lo que tiene de estática, ya que la interacción entre dos moléculas es algo dinámico que da lugar a un complejo con cambios conformacionales de ambas como consecuencia de la existencia de fuerzas intermoleculares. A pesar de que la teoría clásica estática ha devenido en dinámica, sigue siendo válido el concepto de especificidad estereoquímica que implica la complementariedad entre fármaco y receptor.

Además de las propiedades de eficacia y especificidad, existe la de actividad intrínseca que constituye una de las características del complejo fármaco-receptor. Este concepto deriva de la observación de que un mismo agonista actuando sobre el mismo receptor, en un tejido actúa como un agonista completo, generando una respuesta elevada, mientras que en otros tejidos la respuesta es muy inferior y no se consigue la activación óptima del sistema acoplado al receptor (Kenakin, 1993). Para tratar de explicar este hecho se ha propuesto como punto de partida el sencillo esquema conocido como modelo de los dos estados (Colquhoun, 1973 y Leff, 1995) en el que se pretende explicar el fenómeno de la actividad intrínseca por diferencias en la función de transducción y en la densidad de receptores entre tejidos. Un esquema de cómo operaría este modelo se muestra en la figura 4:



**Figura 4.** Esquema del modelo de los 2 estados (Rang y cols, 2000).

El modelo propone que el receptor puede existir en dos estados, “en reposo” (R) y “activado” (R\*), cada uno de los cuales puede fijar una molécula del fármaco con constantes de equilibrio K y K\*, respectivamente. Un cambio en el equilibrio ente estos dos estados a favor de R\* inicia la respuesta. Normalmente, cuando el ligando no está presente, el equilibrio favorece el estado de reposo. Para que la fijación de una molécula cambie el equilibrio a favor de R\* (en otras palabras, para que un fármaco sea agonista), la condición necesaria es que el fármaco tenga una afinidad más alta para R\* que para R ( $K > K^*$ ). A mayor relación  $K/K^*$ , mayor eficacia del fármaco. Si  $K = K^*$ , la fijación no alterará el equilibrio conformacional y el fármaco será un antagonista competitivo puro. Indudablemente, este modelo es demasiado simple y no explicaría el comportamiento de los receptores que actúan a través de procesos de transducción más complejos (Kenakin, 1993).

### **3.5. ACOPLAMIENTO DEL RECEPTOR $\beta$ -ADRENÉRGICO CON LA PROTEÍNA G:**

Las proteínas G son componentes esenciales de los procesos de transducción de las señales de muchos receptores unidos a la membrana (adrenérgicos, acetilcolina (Ach), histamina), como pusieron de manifiesto los trabajos de Rodbell a finales de 1969 y principios de 1970 y posteriormente de Gilman.

Rodbell y Birnbaumer, estudiando el sistema de adenilato ciclasa de células grasas y de membranas hepáticas, observaron que cada sistema parecía contener distintos tipos de receptor acoplados a una ciclasa catalítica común (Birnbaumer y Rodbell, 1969). En 1970 postularon la existencia de una proteína intermedia “transductora” que actuase de eslabón entre el receptor hormonal y el amplificador. Para encontrar este transductor, analizaron la respuesta de las membranas celulares a la hormona glucagón. Sus experimentos demostraron que la guanosina trifosfato (GTP) era necesaria para la transmisión de información desde el receptor unido al glucagón hasta la adenilato ciclasa. Aunque Rodbell y Birnbaumer no identificaron ni aislaron la molécula transductora, probaron que existía, que era dependiente de GTP y que éste era el rasgo característico de todos los receptores que actúan incrementando la actividad de la AC. Ese transductor, como Rodbell y Birnbaumer correctamente dedujeron y Gilman demostró (Ross y Gilman, 1977), es la proteína G heterotrimérica Gs, la cual se acopla al receptor y activa la adenilato ciclasa.

Las proteínas G son proteínas compuestas por 3 subunidades:  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ . La subunidad  $\alpha$  contiene un sitio de unión para nucleótidos de guanina, y, en el estado no activado de esta subunidad, el GDP permanece unido a la misma. Mientras el GDP permanece unido a la subunidad  $\alpha$ , las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  permanecen asociadas como un complejo  $\beta\gamma$  y no tienen capacidad de fijarse a nucleótidos de guanina (Gilman, 1984; Hildebrant 1984). Se han descrito 5 tipos de subunidades  $\beta$  y 10 de subunidades  $\gamma$  (Gudermann y cols, 1996). Las proteínas G pueden contener subunidades  $\alpha$  de dos tipos:  $\alpha_s$  (estimuladoras, PM 42.000), o  $\alpha_i$  (inhibidoras, PM 39.000), denominándose Gs o Gi respectivamente. Las tres subunidades ( $\alpha\beta\gamma$ ) se encuentran ancladas a la membrana mediante una cadena de ácidos grasos. Las proteínas G se encuentran en la cara interna de la membrana celular y pueden difundir libremente por la membrana (Mattera y cols, 1989; Mayor, 1999; Guderman y cols, 1996).

Los residuos de la tercera asa intracelular del receptor están implicados en el acoplamiento a la proteína Gs, puesto que la pérdida de determinados aminoácidos en

las posiciones 222-229 y 239-272 origina la incapacidad de la proteína G de acoplarse con la adenilato ciclasa (AC) (Summers y cols, 1997).

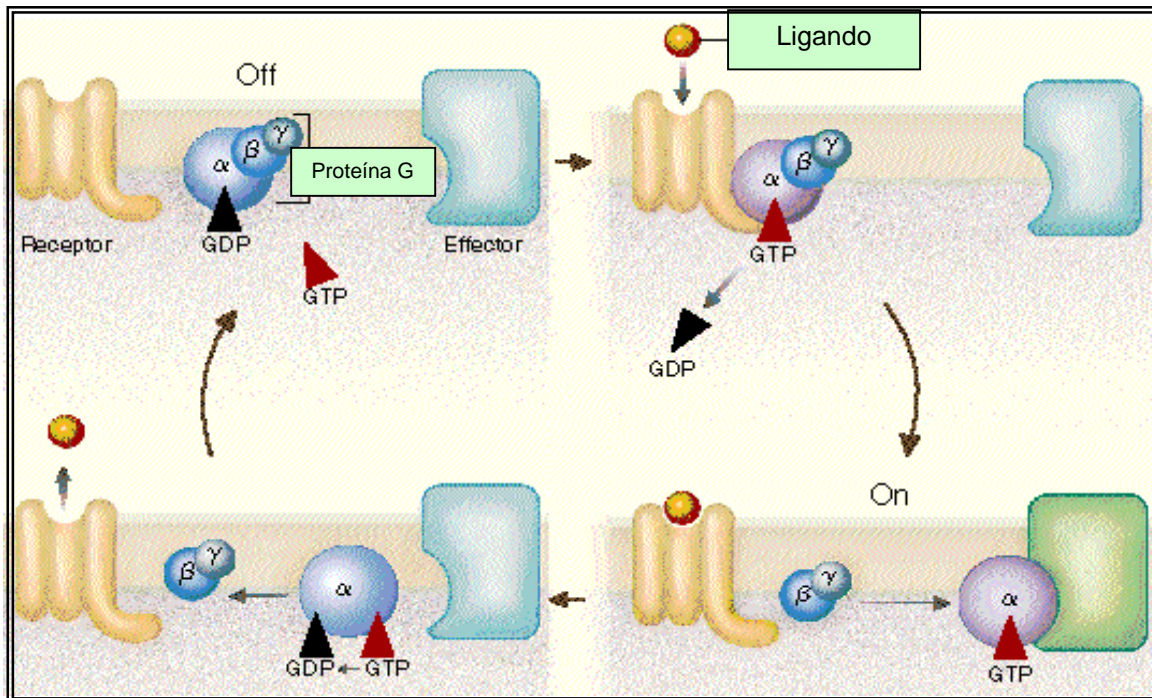
En estado de “repose”, las proteínas G forman un trímero  $\alpha\beta\gamma$  desligado del receptor, en el que el GDP ocupa el lugar de fijación de nucleótidos de guanina en la subunidad  $\alpha$ . Cuando una molécula de agonista ocupa un receptor (R), se forma un complejo agonista-receptor activado ( $R^*$ ), que determina un cambio de conformación del dominio citoplasmático del receptor que adquiere una gran afinidad por el trímero  $\alpha\beta\gamma$ . La asociación  $\alpha\beta\gamma$  con el receptor provoca el cambio de afinidad por nucleótidos de guanina en la subunidad  $\alpha$ , lo que conduce a la disociación del GDP y su reemplazo por GTP (intercambio GDP/GTP)( $G\alpha\beta\gamma$ GDP) lo que, por su parte, desencadena la disociación del trímero de la proteína G con la separación, por un lado, del complejo  $G\alpha$ -GTP y por otro del complejo formado por las subunidades  $\beta\gamma$  (Gisbert, 1987; Flórez, 2003; Ross y Kenakin, 2003). La subunidad  $G\alpha$ GTP es la forma “activada” de la proteína G ( $G^*\alpha$ ), se desplaza por la membrana y puede asociarse a diversos enzimas y canales iónicos, produciendo su activación o inactivación según sea el caso. Dependiendo de si se activan las proteínas Gs (estimuladora) o Gi (inhibitoria), las subunidades  $G\alpha$  activadas pueden estimular o inhibir la actividad de enzimas intracelulares, como la adenilato ciclasa (AC), fosfolipasa C (PLC) o canales iónicos como los de  $K^+$  o  $Ca^{2+}$  (Strange, 1999; Schoneberg y cols, 1999; Bomzon y cols, 2001).

La disociación del complejo  $G^*\alpha$ -efector tiene lugar al desprenderse una molécula de fósforo inorgánico (Pi) del complejo  $\alpha$ GTP debido a la acción GTPasa que posee la subunidad  $\alpha$  originándose por tanto  $\alpha$ -GDP (Levitzki, 1988; Clapham y cols, 1997). El complejo  $\alpha$ -GDP no es activo, se disocia del efector y recupera la afinidad por la subunidad  $\beta\gamma$ , reconstituyéndose la proteína G inicial. Recientemente, Ghanouni y cols, (2001), han desarrollado una técnica que permite monitorizar directamente la formación del estado activo de un receptor acoplado a proteína G mediante la unión de fluoresceína a cisteínas endógenas (Cys 265) de la región citoplasmática del dominio 6 transmembrana de dicho receptor.

En la secuencia de eventos que suceden tras la estimulación del receptor  $\beta$  por la hormona, cabe destacar los siguientes aspectos:

- a) Cuando se añade  $GTP/Mg^{2+}$  al complejo  $R^*G\alpha\beta\gamma$  se provoca la separación del GDP del complejo  $G\alpha$ -GDP, incorporándose al mismo el GTP con la consiguiente liberación del  $G^*\alpha$ .
- b) Se precisa de la función GTPasa de la subunidad  $\alpha$  de la proteína G para revertir el sistema.
- c) Siempre se necesita la presencia del ión  $Mg^{2+}$ . La presencia del  $Mg^{2+}$  a altas concentraciones acelera esta reacción (Hanski y cols, 1981), y por lo tanto simulan la acción de los agonistas adrenérgicos facilitando la activación de la subunidad reguladora por análogos del GTP.

En la figura 5, se muestra la secuencia de pasos que se suceden tras la activación del receptor  $\beta$ -adrenérgico por la hormona.



**Figura 5.** Secuencia de eventos tras la activación del receptor  $\beta$ -adrenérgico por la hormona.

### 3.6. ACTIVACIÓN E INHIBICIÓN DE LA ADENILATO CICLASA:

La activación de la adenilato ciclasa se produce por la acción directa de la fracción  $G_s\alpha GTP$  sobre la unidad catalítica. La inhibición se puede producir mediante 4 vías o mecanismos diferentes:

- Una inhibición directa de la adenilato ciclasa por la fracción  $G_s\alpha GDP$ .
- Una inhibición indirecta por interferencia con el mecanismo de activación de la unidad  $G^*\alpha$ , inhibición realizada por las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  liberadas del complejo  $G_i\alpha\beta\gamma$  por la acción del GTP, que se unen a la subunidad  $G_s\alpha$  y forman el complejo  $G_s\alpha\beta\gamma$ , que es totalmente inactivo.
- Esta última posibilidad está en desacuerdo con el hecho de que hormonas inhibitoras producen inhibición de la adenilato ciclasa en células del sistema CYC, que carecen de la subunidad  $G_s\alpha$  (Jackobs y cols, 1984). Podría explicarse este hecho por una tercera vía de inhibición sugerida por los datos aportados por Katade y cols (1986), que demuestran que el complejo  $\beta\gamma$  es directamente inhibidor de la subunidad catalítica.
- Cuando los ligandos interactúan con  $G_i$  inhiben la producción de AMPc. La proteína  $G_i$  contiene las mismas subunidades  $\beta\gamma$  que la  $G_s$ , pero una diferente subunidad  $\alpha$  ( $G_{\alpha i}$ ). Esta  $G_{\alpha i}$  fija también GDP y GTP. En respuesta al ligando inhibitor, la  $G_{\alpha i}$  libera GDP y fija GTP, se disocia entonces el complejo  $G_{\beta\gamma}$  y la  $G_{\alpha i}-GTP$  inhibe la adenilato ciclasa.

El paso limitante en la activación de la AC es la liberación de GDP de su unión a la subunidad reguladora  $G_s$  (Levitzki, 1986). Por lo tanto, las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  son las responsables últimas para que cese la activación de la adenilato ciclasa, y la sola hidrólisis del complejo  $G^*\alpha GTP$  no es el único método para la desconexión del proceso del activación (Gilman, 1984).

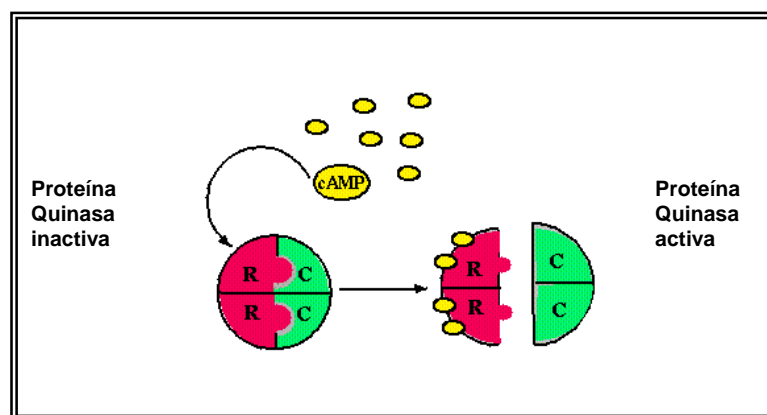
### 3.7. **DESCUBRIMIENTO Y MECANISMO DE ACCIÓN DEL AMPc:**

Sutherland (1971) estudiando el mecanismo por el cual la adrenalina regula la degradación de glucógeno a glucosa en el hígado, descubrió que la adrenalina actúa mediante la activación de una fosforilasa. Esta activación ocurría por la acción de una sustancia desconocida intermediaria. La hormona –el “primer” mensajero- estimulaba la formación de un “segundo mensajero” dentro de las células. La nueva sustancia se identificó como adenosin monofosfato cíclico o AMPc. Sutherland sugirió que las acciones de otras muchas hormonas podrían explicarse de la misma manera.

Se conoce muy poco acerca de la estereoquímica y concretamente de la ciclación de la reacción que forma AMPc. Se ha descrito que la ciclación ocurre con la alteración (inversión) de la configuración de la enzima, que sucede tras una reacción de sustitución nucleofílica en la misma (Eckstein y cols, 1981). De igual forma estos mismos autores demuestran que no interviene covalentemente ningún intermediario enzimático aunque el ión  $Mg^{2+}$  y/o el ión  $Mn^{2+}$  son necesarios en esta reacción porque se unen a la molécula de fosfato del sustrato natural, que es ATP-Mg.

Sin embargo, se sabe que el AMPc, una vez formado, produce cambios enzimáticos en el interior celular a través de su receptor citoplasmático, una proteína quinasa específica, dependiente de AMPc. Esta enzima es un tetrámero que contiene dos subunidades reguladoras (R) y otras dos catalíticas (C). Cada subunidad R contiene dos sitios de fijación para el AMPc; la unión del AMPc a las subunidades R reduce la afinidad de éstas por las subunidades C, las cuales quedan libres para actuar transfiriendo radicales fosfato. Los sustratos de esta fosforilación son un numeroso grupo de proteínas (enzimas metabólicas, receptores de neurotransmisores, proteína quinasas autofosforiladas, proteínas del citoesqueleto celular). Estos sustratos activados son a su vez capaces de fosforilar a otras proteínas amplificando considerablemente la señal inicial.

En la figura 6 se muestra una representación esquemática de la proteína quinasa específica para AMPc.



**Figura 6.** Representación de la enzima proteína quinasa específica para AMPc.

El AMPc a través de su acción sobre la proteína quinasa (Ross y Kenakin, 2003) va a producir distintas respuestas fisiológicas (Bomzon, 2001; Flórez, 2003):

- a) Cambios de permeabilidad de membrana, que originan fenómenos de despolarización o de hiperpolarización.
- b) Bombeo de iones.

- c) Cambios bioeléctricos.
- d) Difusión de H<sub>2</sub>O y solutos.
- e) Variaciones metabólicas (como activación y desactivación de enzimas reguladores del metabolismo).
- f) Cambios mecánicos.
- g) Secreción de enzimas.
- h) Secreción de hormonas.
- i) Cambios en el estado físico-químico de proteínas que, en cooperación con el movimiento del Ca<sup>2+</sup>, van a configurar su estado de contracción.
- j) Alteración de la síntesis de neurotransmisores.
- k) Modificación en la expresión de los genes.
- l) División celular y diferenciación.
- m) Modificación en los movimientos del Ca<sup>2+</sup> celular, con su repercusión sobre muchos otros procesos celulares de exocitosis, transmisión y contracción.

Los efectos del AMPc finalizan por la acción de las fosfodiesterasas intracelulares (PDEs), que tienden a degradarlo a 5'-AMP (Beavo, 1995) y por expulsión al exterior celular mediante transportadores de membrana (Ross y Kenakin, 2003).

#### 4. REGULACIÓN DEL SISTEMA RECEPTOR $\beta$ -ADRENÉRGICO/ADENILATO CICLASA:

La actividad de un receptor acoplado a proteína G (GPCR) es el resultado del balance coordinado entre los mecanismos que regulan los procesos de señalización, desensibilización y resensibilización. La *desensibilización* consiste en la atenuación o desaparición con el tiempo de la respuesta del GPCR al estímulo agonista y representa un importante mecanismo de autorregulación que lo protege contra el exceso de estímulos, sean agudos o crónicos (Strasser y cols, 1985; Chuang y cols, 1996; Mayor, 1999). Existe un proceso de *desensibilización rápida*, que se debe a la fosforilación de la proteína receptora en respuesta a la propia activación del receptor. Esta fosforilación puede deberse a la activación de (Flórez, 2003):

1. Quinasas específicas cuyo único sustrato es el GPCR activado, y se llaman quinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRK); es el caso de la *desensibilización homóloga* (Homcy y cols, 1991). Este proceso implica la intervención de las  $\beta$ -arrestinas, proteínas que interfieren con el acoplamiento del receptor con la proteína G y promueven posteriormente el internamiento y endocitosis rápida de los receptores. Las  $\beta$ -arrestinas tienen la capacidad de unirse al receptor  $\beta$ -adrenérgico cuando está fosforilado por quinasas específicas, regulando por tanto la señalización e internalización (Cheng y cols, 2003; Walker y cols, 2003). Concretamente, las  $\beta$ -arrestinas hacen que se fijen los GPCR a las vesículas cubiertas de clatrina. Posteriormente, los GPCR incluidos en estas vesículas son internados en la célula donde pueden sufrir procesos contrapuestos: degradación en los lisosomas (regulación a la baja), o su mantenimiento en los endosomas para su posterior reciclamiento y recuperación (resensibilización). En presencia continuada de estímulo, las arrestinas aseguran que cada receptor acoplado a proteína G activado se “detenga o pare” antes de reiniciar la señal de transducción (Krupnick y cols, 1998). La habilidad de las



arrestinas para discriminar entre los estados fosforilados y no fosforilados del receptor indica que hay una región de las arrestinas que específicamente contacta con la correspondiente porción del receptor fosforilado y se postuló que esta región (denominada región de reconocimiento de la fosforilación) era una región catiónica (Palczewski y cols, 1991).

2. Quinasas dependientes de segundos mensajeros (PKA, PKC) que pueden ser activadas por la estimulación producida por ligandos sobre otros receptores; es la *desensibilización heteróloga* (Strasser, 1985), donde la fosforilación altera la conformación del receptor y su afinidad por la proteína G.

Las mismas moléculas que contribuyen a la desensibilización del receptor estimulado por el agonista en el caso de la desensibilización homóloga (GRK y  $\beta$ -arrestinas) son las que inician y regulan los posteriores procesos de endocitosis, tráfico intracelular y resensibilización. El secuestro de los  $\beta_2$ -adrenoreceptores fue originalmente propuesto como un mecanismo para la desensibilización (Waldo, 1983). Posteriormente se propuso que este secuestro de  $\beta_2$ -adrenoreceptores reestablece su función originando el reciclado del receptor de nuevo a la superficie celular (Pippig y cols, 1995).

Cuando la activación se prolonga o se repite, aparece un proceso en el que la endocitosis se acompaña de la degradación de las proteínas receptoras e incluso de una reducción en su resíntesis, lo que significa que habrá una reducción en el recuento o número total de moléculas de ese receptor. Esta disminución del número de receptores se denomina *regulación a la baja* (down-regulation).

Deben distinguirse, pues, tres situaciones: a) lo que es el fenómeno estricto de pérdida de respuesta al estímulo (desensibilización) por modificaciones en el acoplamiento del GPCR a la proteína G, en respuesta a la fosforilación del receptor; b) la reducción en el número de receptores sólo en la membrana, como consecuencia de la endocitosis e internalización del receptor, y c) la disminución en el número de receptores en la célula por facilitación de los mecanismos de degradación o por depresión de síntesis (regulación a la baja) (Strasser y cols, 1984; Homcy, 1991; Koenig y cols, 1997; Böhm, 1997). Los intervalos de tiempo asignados a estos procesos oscilan entre segundos (fosforilación), minutos (endocitosis) y horas (regulación a la baja).

Además de todo lo explicado anteriormente se ha visto que la función de los receptores puede ser modificada por reacciones que afectan a la formación de enlaces ya sean covalentes (fosforilación del receptor, puentes disulfuro, proteólisis del receptor) o no, a la alteración del potencial de membrana, alteración de la distribución de los receptores per se, inhibición de la microagregación, interacciones alostéricas, alteraciones de los lípidos de membrana, etc (Hollenberg, 1985).

## **5. POLIMORFISMO DE LOS RECEPTORES $\beta_2$ -ADRENÉRGICOS:**

Independientemente de los fenómenos comentados, es importante señalar que puede haber variaciones interindividuales en la respuesta al estímulo de los receptores  $\beta_2$  adrenérgicos debido a modificaciones de base hereditaria, es decir, al polimorfismo genético (Büscher y cols, 1999; Rana y cols, 2001; Small y cols, 2003; Bruck y cols, 2003).

Recientemente se han descrito diferentes polimorfismos en el gen que codifica el receptor  $\beta_2$  adrenérgico humano. Existen 2 polimorfismos comunes, uno en el codón 16 y otro en el codón 27 (Arg16Gly y Gln27Glu) (Dishy y cols, 2001). Ya en 1994, Green

y cols, mostraron mediante mutagénesis dirigida y expresión recombinante de los receptores en fibroblastos de hámster chinos, que estas variaciones no implican alteración en la unión del agonista ni en el acoplamiento funcional a Gs; sin embargo, estas mutaciones, alteran marcadamente el grado de down-regulation promovido por el agonista. Los mismos hechos fueron confirmados por Bruck y cols, en el 2003.

## **6. ACCIONES DE LOS IONES SOBRE EL SISTEMA $\beta$ -ADRENOCEPTOR/ADENILATO CICLASA:**

Diversos iones están presentes como factores en algunos puntos de la cadena de funcionamiento del sistema  $\beta$ -adrenoceptor/adencilato ciclasa. Su intervención puede ser crucial en los procesos de activación e inhibición del receptor, pero los estudios realizados para su correcto análisis han sido llevados a cabo en distintas líneas celulares, y por lo tanto los datos obtenidos son parciales y hay que tomarlos con reservas a la hora de hacer generalizaciones.

### **6.1. ION MAGNESIO:**

La activación de la adenilato ciclasa es dependiente no sólo de la presencia del sustrato ATP-Mg<sup>2+</sup>, sino también de un exceso de Mg<sup>2+</sup> que va a actuar como coenzima. Hanski y cols, 1981, ya apuntaban la posibilidad de que el Mg<sup>2+</sup> jugara un papel central en el proceso de activación de la adenilato ciclasa. Bockaert y cols en 1984 demostraron que la inhibición de la adenilato ciclasa por la proteína Gi es debida a una disminución en la afinidad del sistema por el Mg<sup>2+</sup>.

### **6.2. ION MANGANESO:**

Este catión permite la activación de la enzima adenilato ciclasa del eritrocito de pavo a concentraciones menores de 0.1 mM tras la estimulación del receptor  $\beta$ -adrenérgico por el agonista (Braun y cols, 1982).

Se ha demostrado que se puede estimular la subunidad G de la adenilato ciclasa cuando el ion manganeso sustituye al ion magnesio (Braun y cols, 1982).

### **6.3. ION CALCIO:**

Estudios realizados en eritrocitos de pavo y en membranas celulares de linfoma S49 CYC (células deficientes de proteína G) muestran que el Ca<sup>2+</sup> es capaz de inhibir el sistema  $\beta$ -adrenérgico/adencilato ciclasa. Esta inhibición no es competitiva con respecto al ATP-Mg y parece ser independiente de su acción sobre la calmodulina (Lasker y cols, 1982). Este efecto inhibitorio del Ca<sup>2+</sup> sobre la adenilato ciclasa sucede por competición directa con el Mg<sup>2+</sup> en su unión al sitio regulador que parece estar en la misma unidad catalítica. Además, este efecto inhibitorio es reversible si se añaden quelantes de este ión (Piascik y cols, 1985). Trabajos de Piascik y cols, 1985, confirman lo observado por Lasker y su grupo, mostrando que a bajas concentraciones el Ca<sup>2+</sup> activa la enzima vía calmodulina, mientras que a altas concentraciones la inhibe por acción directa sobre la

unidad catalítica, y que esta inhibición es reversible mediante la quelación del  $\text{Ca}^{2+}$  por proteínas específicas fijadoras de este ión.

Nuestro equipo (Horga y cols, 2000) mostró, en membranas de eritrocitos humanos, que el isoproterenol en un medio con calcio (1-10 mM, rango que incluye las concentraciones plasmáticas fisiológicas) incrementa la activación de la adenilato ciclasa y este efecto es bloqueado por propranolol.

## 7. METODOS DE ESTUDIO DEL SISTEMA RECEPTOR $\beta$ -ADRENÉRGICO/ADENILATO CICLASA:

Se han utilizado distintos métodos de estudio para determinar la presencia y las características de receptores  $\beta$ -adrenérgicos en diferentes preparaciones tisulares. Los primeros trabajos se centraban en el estudio hormonal y la observación de la respuesta fisiológica provocada en el animal entero o en tejidos aislados (Dale, 1906; Ahlquist, 1948; Lands y cols, 1967), utilizándose para ello diferentes agonistas y antagonistas competitivos que modulan con mayor o menor selectividad las respuestas alfa y beta, y establecieron las bases para el estudio y clasificación de los adrenoceptores.

Williams y Lefkowitz (1976 y 1978), realizaron investigaciones con estereoisómeros de ligandos de adrenoceptores  $\beta$  desarrollando métodos para identificar y cuantificar los lugares de reacción o sitios de fijación. Posteriormente, se han introducido nuevos fármacos y reactivos que han permitido ampliar el potencial experimental de este método (Carmankrzan, 1983). Uno de los más utilizados es la fijación específica de radioligandos marcados con tritio ( $^3\text{H}$ )  $\{(^3\text{H})\text{propranolol}, (^3\text{H})\text{dihidroalprenolol}\}$  o con yodo radiactivo ( $^{125}\text{I}$ )  $\{(^{125}\text{I})\text{hidroxibenzilpindolol}, ^{125}\text{I}(-)\text{cianopindolol}\}$  (Levitzi, 1988). Mediante esta técnica se ha podido cuantificar el número de receptores/unidad superficie celular, así como definir su especificidad y su cinética de interacción con otras moléculas. No obstante, las técnicas de fijación específica de radioligandos sólo nos informan del número de moléculas receptoras, no de su funcionalidad. La tendencia actual se orienta hacia el estudio dinámico del mecanismo molecular bajo el cual tiene lugar en los adrenoceptores la estimulación, la transducción y la respuesta a nivel celular. Es decir, consisten en el estudio de:

1. La interacción ligando-receptor.
2. El acoplamiento entre el receptor y el sistema efector.
3. Las reacciones bioquímicas intracelulares que llevan a una respuesta fisiológica.
4. La distribución e internalización de receptores.

El estudio global de la actividad dinámica de la enzima se ha llevado a cabo fundamentalmente valorando la producción de AMPc como índice de activación de la unidad catalítica de la AC por las catecolaminas, y sirve como medida de la funcionalidad de los receptores  $\beta$  (Wolf y cols, 1977).

La cuantificación de la concentración total de AMPc se ha llevado a cabo:

1. Por unión a una proteína competitiva (Brown y cols, 1972).
2. Por radioinmunoensayo (Steiner y cols, 1972; Strada, 1990).

Las limitaciones a estas técnicas son las pequeñas cantidades de AMPc que se producen sobre unos niveles basales relativamente altos. Por este motivo y para solucionar este problema, Krishna y cols, 1968, introdujeron un método muy sensible en el cual se medía la conversión de (alfa $^{32}\text{P}$ )-ATP en (alfa $^{32}\text{P}$ )-AMPc. El principal inconveniente de esta técnica era la gran interferencia que se producía por problemas de contaminación de fondo con el producto inicial (consecuencia de la baja tasa de conversión del

(alfa<sup>32</sup>P)-ATP a (alfa<sup>32</sup>P)-AMPc. Salomón en 1974 solucionó este problema utilizando columnas de cromatografía en serie (Dowex y alúmina), método excelente y fiable pero sujeto a un manejo engorroso, y cuyo principal inconveniente es la escasa estabilidad del (alfa<sup>32</sup>P). Posteriormente, se ha efectuado una nueva modificación al método de Salomón (Krstulovic y cols, 1979), al utilizar la cromatografía líquida de alta afinidad (HPLC) para purificar y separar de forma rápida el ( $\alpha^{32}\text{P}$ )-AMPc formado de otros nucleótidos de la muestra aportando:

1. Un acortamiento en el tiempo de experimentación.
2. Una disminución de la variabilidad inter e intraensayo.
3. Un alto índice de recuperación del AMPc.
4. Una automatización del procesamiento con un detector de radiactividad.

Los esfuerzos posteriores se centraron en simplificar estos métodos. Así, Albano y cols, (1973), ejecutaron ciertos cambios que permiten utilizar métodos de fijación a una proteína específica con unos resultados altamente fiables, evitando de esta forma la purificación repetida y el complicado manejo de las muestras evaluadas. Por otro lado, permite aumentar la dilución de la muestra disminuyendo la interferencia de los blancos.

A la hora de plantearse el estudio del sistema  $\beta$ -adrenérgico adenilato ciclasa, se puede escoger una o varias de las posibilidades existentes:

1. Sobre un órgano aislado: es el método de estudio inicial ideal (Williams y cols, 1978).
2. Sobre células intactas.
3. Sobre fracciones subcelulares, en particular la membrana citoplasmática, donde se localiza el receptor  $\beta$ -adrenérgico (Davoren y Sutherland, 1963). Este es el método que hemos utilizado para nuestro estudio, ya que tiene varias ventajas sobre los dos métodos anteriores.
  - a. Estabilidad del receptor  $\beta$ .
  - b. Reducción de sistemas citoplasmáticos reguladores de los niveles de AMPc.
  - c. La densidad de receptores tiene una dependencia metabólica y si la célula intacta está “desnutrida” se verá disminuida la densidad de receptores, mientras que en las membranas fraccionadas esta propiedad no se altera.
  - d. El metabolismo de los fosfolípidos de membrana se ve acelerado por la estimulación del receptor  $\beta$ -adrenérgico en células reselladas, mientras que en fracciones subcelulares no se produce ningún efecto. Este aumento de la metilación de los fosfolípidos facilita el acoplamiento del receptor  $\beta$ -adrenérgico con la adenilato ciclasa (Hirata y cols, 1979).
  - e. El acoplamiento  $\beta$ -adrenoceptor/adenilato ciclasa en la célula intacta está lejos de ser un hecho estático (Porzig, 1982) y está sujeto a mecanismos reguladores intracelulares (proteínquinasas, alteraciones electrolíticas, etc).
  - f. La mayor ventaja del uso de las fracciones subcelulares (membranas fraccionadas) es que los problemas de la captación selectiva o el acceso desigual de fármacos al receptor se ven considerablemente reducidos (Minneman y cols, 1981; Kitagawa y cols, 1995; Dlusskaia y cols, 1996; Abraham y cols, 2001 y 2003).

## **8. EL RECEPTOR $\beta$ -ADRENÉRGICO EN EL HEMATÍE:**

Los hematíes son células sanguíneas, con forma de discos bicóncavos con un diámetro medio de unas 7.8 micras. El espesor del hematíe es menor en su parte central que en la periferia. Tiene una altura de 2 a 2.2 micras en la parte periférica y de 1 micra en la parte central. La relación volumen/superficie eritrocitaria es de gran importancia, ya que determina el grado de elasticidad del hematíe.

### **8.1. PRODUCCIÓN, CIRCULACIÓN Y DESTRUCCIÓN DE HEMATÍES:**

En las primeras semanas de vida embrionaria, los hematíes primitivos y nucleados se producen en el saco vitelino. Durante el segundo trimestre de gestación, el hígado es el principal órgano de producción de los hematíes, aunque también se produce un número razonable de ellos en el bazo y en los ganglios linfáticos. Después, durante el último mes de gestación y tras el nacimiento, los hematíes se producen de forma exclusiva en la médula ósea. El principal factor que estimula la producción de hematíes es una hormona circulante llamada eritropoyetina (EPO). Esta EPO se forma en los riñones e hígado y tiene la función de estimular la producción de proeritroblastos a partir de las células madre hematopoyéticas en la médula ósea. Además, una vez que se han formado los proeritroblastos, la EPO hace que las células pasen también con mayor rapidez de lo normal a través de los diferentes estadios eritroblásticos, acelerando la producción de nuevas células. Durante la maduración del precursor eritroide a eritroblasto y reticulocito, van perdiéndose elementos citoplasmáticos y nucleares a medida que el reticulocito evoluciona hasta convertirse en hematíe. El reticulocito pasa a la sangre, donde se convierte en hematíe en 1-2 días. La concentración de reticulocitos en sangre es  $< 1\%$ . El hematíe en sangre tiene una vida de 120 días. El eritrocito senil se fragmenta en zonas estrechas de la circulación como el bazo, y los restos son destruidos por el sistema mononuclear fagocítico (Guyton, 1992).

### **8.2. ESTRUCTURA DE LA MEMBRANA DEL HEMATÍE:**

La membrana del eritrocito tiene un espesor entre 50 y 120 Å. Su superficie es electronegativa. Está constituida en un 50% por proteínas, un 40% por lípidos y un 10% por hidratos de carbono. En la membrana se encuentran poros de 4 Å que permiten el paso de todas aquellas moléculas cuyo peso molecular sea inferior a 100 Daltons.

La membrana está formada por una doble capa de fosfolípidos y colesterol, con una disposición tal que las porciones hidrofóbicas de las moléculas se orientan hacia el interior mientras que el lado polar se encuentra ya sea en la superficie externa de la célula o en la superficie interna citoplasmática. La superficie externa tiene poca cantidad de lecitina y esfingomielina, mientras que la superficie interna tiene relativamente más cantidad de fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina. Los lípidos de la superficie externa se intercambian libremente con los del plasma (Marchesi, 1986).

El componente más prominente del citoesqueleto de la membrana del hematíe, al menos en cuanto a peso molecular, es un polipéptido fibroso llamado espectrina. Los

tetrámeros de espectrina se fijan a la membrana por una proteína llamada ankirina. La ankirina a su vez está conectada a una proteína transmembrana llamada “banda 3” o proteína de intercambiador aniónico. La función de la banda 4.2 (paladina) puede ser la de estabilizar la unión entre la ankirina y la banda 3. La espectrina también está unida a una proteína transmembrana llamada glicoforina C por una proteína llamada banda 4.1. La banda 4.1 estabiliza la asociación de espectrina con actina al igual que la aducina.

Todos estos puntos específicos son receptores de señales del ambiente externo, y por ello es razonable asumir que el esqueleto de la membrana desempeña un papel en la transmisión de dichas señales a través de la doble capa lipídica hacia el interior de la célula (Marchesi, 1986).

En la figura 7 se puede apreciar la compleja disposición de la membrana del hematíe:

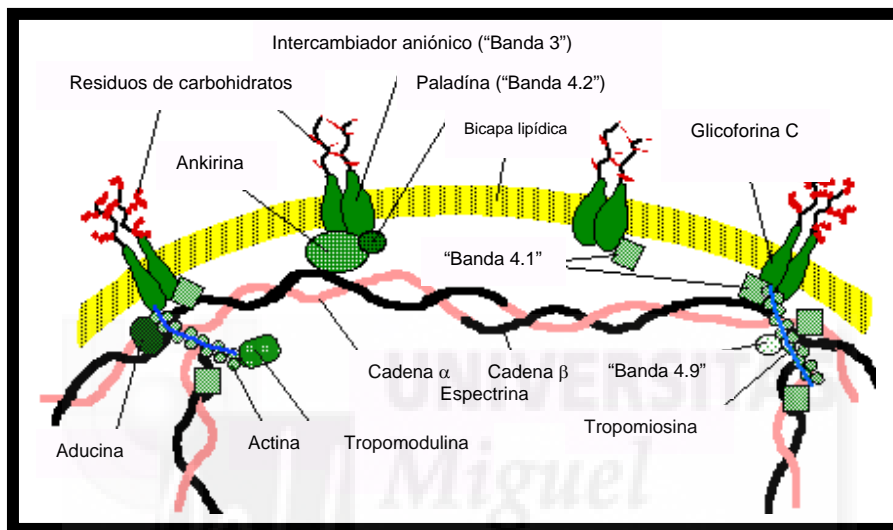


Figura 7. Estructura de la membrana del hematíe.

### 8.3. EL HEMATÍE COMO MODELO DE ESTUDIO DEL RECEPTOR $\beta$ -ADRENÉRGICO:

La mayor parte de lo que se conoce respecto al receptor  $\beta$ -adrenérgico, se ha estudiado en eritrocitos de aves, batracios y en algunos mamíferos. Aunque aún no sepamos con precisión cuál es su finalidad, en la membrana del hematíe, fundamentalmente de aves o anfibios, existe un número importante de receptores  $\beta$ -adrenérgicos (50-500 fmoles/mg proteína de membrana en eritrocitos de pavo) (Lad, Nielsen y Rodbell, 1980), acoplados a la enzima adenilato ciclasa (AC), y en este sistema es donde se ha desentrañado todo el complejo mecanismo de acoplamiento receptor/enzima de estos receptores, y estos datos se han extrapolado a otros sistemas de receptores acoplados a proteínas G.

### **8.3.1. El hematíe de pavo como modelo de estudio del receptor $\beta$ -adrenérgico.**

El fenómeno del estímulo de la adenilato ciclasa inducido por catecolaminas ha sido demostrado claramente en eritrocitos de una gran variedad de especies animales (Davoren y Sutherland, 1963; Oye y Sutherland, 1966; Rosen 1969; Sheppard y Burghardt, 1969-70). La enzima adenilato ciclasa estimulada de este modo se ha encontrado fundamentalmente en eritrocitos de pavo y rana (Sutherland y cols, 1962). En 1977 se descubrió que las membranas de eritrocitos de pavo poseían un receptor  $\beta$ -adrenérgico y otro para adenosina (Sevilla y cols, 1977). En 1980, se descubrió que la movilidad lateral de los receptores  $\beta$  estaba implicada en la activación de la AC (Atlas y cols, 1980).

En ese año, Lad y cols, estudiaron en membranas de eritrocitos de pavo la regulación del receptor  $\beta$ -adrenérgico, las acciones de las catecolaminas y de la toxina del cólera sobre la adenilato ciclasa demostrando la existencia de una relación entre la activación del receptor y la actividad de la AC.

En 1985, Nambi y cols, emplearon eritrocitos de pavo para conocer el papel del AMPc y otros sistemas de proteína quinasas en la desensibilización del receptor  $\beta$ -adrenérgico. El año siguiente, se caracterizó bioquímicamente el receptor  $\beta$ -adrenérgico fosforilado en eritrocitos de pavo (Stadel y cols, 1986).

En contraste con los receptores  $\beta$ -adrenérgicos de mamíferos, se ha observado que los eritrocitos de pavo pueden desarrollar 2 respuestas distintas efectoras; activación de la AC y de la fosfolipasa C (PLC) específica de polifosfoinositol (James y cols, 1994; Vaziri y cols, 1992). Además, el receptor de pavo ha sido clasificado como un adrenoceptor  $\beta_1$  en base a la igual potencia de noradrenalina y adrenalina (Bylund y cols, 1994). En 1996, Galas y cols, mostraron evidencias de que el AMPc puede producir desensibilización de la proteína G vía fosfolipasa C en membranas de eritrocitos de pavo.

### **8.3.2. El receptor $\beta$ en hematíes de batracios:**

Los eritrocitos de rana también tienen receptores  $\beta$ -adrenérgicos que pueden estar presentes en 2 estados (De Lean y cols, 1980). En 1982, Lefkowitz y cols purificaron receptores  $\beta_2$  adrenérgicos de las membranas de eritrocitos de rana demostrando que se trataba de una glucoproteína con un peso molecular de 58.000 Daltons. Posteriormente otros estudios demostraron en eritrocitos de rana que el estímulo  $\beta$ -adrenérgico producido por las catecolaminas se suprimía en presencia de propranolol ( $10^{-5}$  M) (Herman y Brown, 1983).

### **8.3.3. Estudio de la variabilidad de respuesta de la adenilato ciclasa en reticulocitos y hematíes de ratas:**

En reticulocitos de rata (eritrocitos prematuros con núcleo), en los primeros días de vida del animal, la estimulación mediada por isoproterenol y fluoruro sódico (estimulante directo de la AC) generaba una intensa respuesta, pero a medida que los reticulocitos iban madurando conforme la rata crecía, la respuesta iba decayendo hasta valores mínimos (Gauger y cols, 1975). Estos estudios plantean la posibilidad de que los receptores  $\beta$ -adrenérgicos presentes en los hematíes maduros de rata pueden no ser funcionales, a diferencia de lo que ocurre en los reticulocitos de rata o en hematíes de

aves o anfibios. Según estos resultados, sólo los eritrocitos de rata prematuros (reticulocitos) están equipados con un sistema efector de receptor  $\beta$ -adrenérgico acoplado a la AC (Quiring, 1975). Este hallazgo fue reforzado por los experimentos de fijación específica con ( $^3\text{H}$ )(-) dihidroalprenolol realizados por Kaiser y cols, 1978.

Estudios posteriores demostraron que el agonista del receptor  $\beta$ -adrenérgico L-isoproterenol, estimula la síntesis de la enzima fosfatidil-N-monometiletanolamina y fosfatidil-colina en reticulocitos de rata. La estimulación es estereoespecífica, dosis dependiente, e inhibida por antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos (propranolol) (Hirata y cols, 1979).

#### **8.3.4. Estudios de hematíes en humanos:**

Gracias a los trabajos de Lefkowitz (1978) se han logrado identificar receptores  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos mediante métodos de fijación específica de radioligandos, y comparar los resultados de estos estudios con estudios de activación de la adenilato ciclasa en respuesta a la activación del receptor. Las membranas de eritrocitos humanos han sido utilizadas para el estudio de técnicas de fijación específica de radioligando ( $^{125}\text{I}$ -yodopindolol). La inhibición de la fijación del radioligando fue realizada usando atenolol y metoprolol como antagonistas del receptor  $\beta_1$  y usando ICI 118551 y IPS 339 como antagonistas del receptor  $\beta_2$  adrenérgico. Los resultados de estos estudios muestran que ambos receptores están presentes en las membranas de los eritrocitos pero la proporción de receptores  $\beta_2$  es 2 veces mayor que la de  $\beta_1$  (Bree y cols, 1984).

Rodbell y cols (1980) demostraron que el hematíe humano contiene la subunidad G de la adenilato ciclasa.

Estudios posteriores de Tuvia y cols (1999) en membranas celulares en los eritrocitos humanos, mostraron que los agonistas  $\beta$  pueden regular las fluctuaciones mecánicas de estas membranas.

En el estudio publicado por nuestro grupo con membranas de eritrocitos humanos se observó que el subtipo  $\beta_2$  era el receptor funcional  $\beta$ -adrenérgico, que su respuesta puede ser modulada en función de las concentraciones de calcio, que el efecto de la A era mayor que para NA y que el aumento en la actividad producido por isoproterenol era revertido por propranolol pero no por atenolol (Horga y cols, 2000).

Estudios recientes realizados en hematíes humanos maduros muestran que el receptor  $\beta_2$  adrenérgico puede estar implicado en el desarrollo de diferentes patologías como la malaria y la anemia de células falciformes (Harrison y cols, 2003; Hines y cols, 2003).

## **9. DIFERENCIAS EN LA ACTIVIDAD DEL SISTEMA AC-RECEPTOR $\beta$ ENTRE LOS ESTUDIOS IN VIVO E IN VITRO:**

Existen numerosas diferencias cuando se estudia el sistema AC-receptor  $\beta$ -adrenérgico en células intactas y en membranas fraccionadas tal y como se desprende de los datos expuestos en la tabla 2 (Porzig y cols, 1982).



Parámetro de medida	Células intactas	Membranas fraccionadas	Sistema celular
Desensibilización después de estimulación crónica $\beta$ -adrenérgica	Descenso del 80-90% en la formación de AMPc dependiente de isoprenalina	Descenso del 30-50%	Astrocitoma Humano (Johnson y cols, 1978)
Kd/Ka para agonistas	$\ll 1$	$\sim 1$	Glioma de rata, linfoma S49 (Insel y cols, 1978)
Afinidad por agonistas $\beta$	Descenso por algunos antagonistas	No afectado por antagonistas	Células de rata cardiaca (Porzig, Becker y Reuter, sin publicar)
Dependencia metabólica de la densidad del receptor	Descenso en el número de receptores en células	Sin efecto	Reticulocitos de rata
Metabolismo de fosfolípidos de membrana	Estimulación $\beta$ -adrenérgica en "ghosts" celulares liberados	Sin efecto	Reticulocitos de rata
Efecto de agentes que alteran los microtúbulos	Incremento en la afinidad del agonista, inhibición de la inducción de fosfodiesterasa	$\sim$	Leucocitos polimorfonucleares (Dulis y cols, 1980) Glioma C6 (Schwartz y cols, 1980)

**Tabla 2.** Diferencias en el sistema AC-receptor  $\beta$  entre células intactas y membranas fraccionadas.

## 10. EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DEL SNA:

El SNA ha sido considerado clásicamente como un sistema de difícil estudio clínico. A ello contribuía, sin duda, el que las pruebas diseñadas para su estudio eran complejas, lentas, farragosas y probablemente poco sensibles. Pero esta situación ciertamente ha cambiado en los últimos años en los que una serie de autores han sistematizado una batería de test de función autonómica basados en el estudio del SNA cardiovascular de cara a su uso clínico diario (Ewing y cols, 1982; Hilsted, 1983).

### 10.1. REFLEJOS CARDIOVASCULARES EN LA VALORACIÓN NO INVASIVA DEL SISTEMA NERVIOSO AUTÓNOMO:

Las razones para la elección de estas pruebas son: que el equipo necesario y su ejecución son sencillos, sobre todo de cara a su uso clínico; y sobre todo, destaca la ausencia de maniobras invasivas, lo que facilita en gran medida la colaboración de los pacientes a la hora de someterse a la exploración y reduce el estrés propio de cualquier maniobra exploratoria más invasiva. No obstante, estas técnicas presentan dos inconvenientes fundamentales. Por un lado, sólo se estudia una porción pequeña de un

sistema más complejo. Por otro, la información que se obtiene es muy general, sin que en ningún caso podamos conocer el lugar exacto de la lesión en el caso de que existan alteraciones (Moltó y Martín, 1990).

La batería de tests más ampliamente utilizada consiste en 5 pruebas, tres que fundamentalmente evalúan la actividad parasimpática, basadas en el estudio de la frecuencia cardiaca y sus variaciones ante una serie de estímulos: la maniobra de Valsalva, la arritmia sinusal respiratoria y el índice 30:15, y dos fundamentalmente simpáticas, basadas en el estudio de los cambios de la presión arterial ante dos tipos de estímulos: respuesta de la presión arterial a la bidepedestación y al ejercicio isométrico. El máximo rendimiento de la exploración autonómica se obtiene con el estudio de las cinco pruebas de forma conjunta más que con el estudio fraccionado de cada una de ellas (Moltó y Martín, 1990).

Las patologías en las que se han usado con mayor frecuencia estas técnicas han sido las neuropatías periféricas, con especial referencia a la neuropatía diabética (Ewing y cols, 1987), la neuropatía alcohólica (Duncan y cols, 1980) o la urémica (Martín y cols, 1990). También se ha usado en el estudio de la migraña (Cortelli y cols, 1987), también lo han sido, buscando una explicación patogénica de esta patología.

Existen métodos electrocardiográficos que se emplean para explorar el tono vasomotor simpático pero son complicados de aplicar puesto que cuantifican los componentes de baja y alta frecuencia de variables cardiovasculares utilizando algoritmos autoregresivos (Pagani y cols, 1992).

En la tabla 3 se resume cada una de las técnicas mencionadas.

TEST	FUNCIÓN QUE EVALÚA	TÉCNICA
<b>Valsalva</b>	Parasimpática	Espiración forzada > 7 segundos contra resistencia tras inspiración forzada. Espiración forzada para mantener una presión de 40 mmHg contra un manómetro 15 segundos. Esfuerzo → bradicardia- <u>Taquicardia</u> + vasoconstricción periférica Relajación → Taquicardia - <u>Bradicardia</u>
<b>Arritmia respiratoria sinusal</b>	Parasimpática	Pretende exagerar acontecimiento fisiológico. Respiración a 6 ciclos/minuto (5'' inspiración y 5'' de espiración). Inspiración produce taquicardia. Espiración produce bradicardia.
<b>Índice 30:15</b>	Parasimpático y algo de simpático	Clinoposición → Ortoposición: taquicardia hasta el latido 15 y bradicardia hasta el latido 30. ⇒ Análisis intervalo RR a los 30 latidos/RR a los 15 latidos.
<b>Variaciones posturales de la presión arterial</b>	Simpática	Clinoposición → presión arterial basal. Ortoposición → presión arterial a los 2'.
<b>Variación de la presión arterial y ejercicio isométrico (test de handgrip)</b>	Simpático y algo parasimpático	Ejercicio isométrico extenuante: presión normal sostenida con dinamómetro a un 30% de la máxima voluntaria ⇒ ↑ Presión arterial a los 3'-5'.

**Tabla 3.** Resumen de los diferentes test para la evaluación de la funcionalidad del sistema nervioso.

## **10.2. NIVELES DE CATECOLAMINAS CIRCULANTES:**

La evaluación clínica de la actividad simpáticosuprarrenal se realiza midiendo las catecolaminas en el plasma y las catecolaminas y sus metabolitos en la orina, así como el tráfico nervioso simpático por medio de microneurografía. La microneurografía, basada en microelectrodos implantados en los nervios que se dirigen a los músculos esqueléticos, representa sobre todo una prueba experimental.

Las catecolaminas se pueden medir en el plasma humano por técnicas radioenzimáticas con isótopos o mediante cromatografía líquida de alta resolución unida a detección electroquímica. La cifra de catecolaminas en plasma proporciona un índice de la actividad del sistema nervioso simpático y de la médula suprarrenal. Sin embargo, la utilidad de la determinación de las catecolaminas en plasma está comprometida por la acción de factores que alteran la relación existente entre la concentración de esas catecolaminas plasmáticas y el estado funcional del sistema simpático-adrenal, y también por importantes diferencias regionales de los impulsos simpáticos. Las técnicas que utilizan infusiones de trazadores de NA tritiada, y que permiten corregir los cambios del aclaramiento de la NA cuando se aplican a través de ciertas regiones anatómicas, permiten evaluar los impulsos simpáticos regionales con cierta exactitud y han servido para definir mejor la actividad diferenciada del sistema nervioso simpático en el campo de la investigación (Henriksen y cols, 1998).

Las concentraciones basales de noradrenalina en el plasma varían entre 0.09 y 1.8 nmol/l (150 a 350 pg/ml); y los valores basales de adrenalina se aproximan a 135 a 270 pmol/L (25 a 50 pg/ml). La semivida de desaparición de la circulación de la NA es, aproximadamente, de 2 minutos. Hay muchos factores que influyen en la concentración plasmática de NA, como la postura, el estrés; por consiguiente, hay que controlar las condiciones en que se obtiene la sangre para el análisis. Por acuerdo unánime, se consideran concentraciones basales de la NA en plasma las que se obtienen utilizando un catéter intravenoso después de permanecer el paciente en decúbito supino y en un ambiente relajado durante 30 minutos (Landsberg y Young, 2001).

Puesto que diversos autores han encontrado niveles alterados de catecolaminas en sangre en diferentes enfermedades, se ha propuesto que la determinación de los niveles de NA y A podría ser una medida indirecta de la funcionalidad del SNA.

Diversos grupos han encontrado valores elevados de noradrenalina plasmática en pacientes con hipertensión esencial (Engelman y cols, 1970; Louis y cols, 1973). Sin embargo el grupo de Christensen en 1980 observó valores normales en pacientes hipertensos mientras que existía una relación entre la NA plasmática y la edad. También observaron que en la hipertensión neurogénica existe una relación lineal significativa entre la NA plasmática y la presión sanguínea en estos pacientes. Christensen (1980A) encontró que la NA plasmática era más elevada en pacientes con úlcera duodenal que en controles. En estos pacientes se observó un umbral más bajo para la liberación de gastrina inducida por adrenalina.

En la tabla 4 resumen se muestra una relación de las enfermedades en las que el nivel de catecolaminas está alterado (Christensen, 1980A).

<b>Catecolaminas y enfermedades (Christensen, 1980A)</b>	
Aumento de la actividad nerviosa simpática	Diabetes mellitus (cetoacidosis, insulina) Mixedema Úlcera duodenal Enfermedad pulmonar obstructiva crónica Uremia Abstinencia de alcohol y morfina Infarto miocárdico agudo Insuficiencia cardíaca Hipotensión ortostática (tipo Bjure-Laurell) Hipertensión neurogénica Feocromocitoma Neuroblastoma
Descenso de la actividad nerviosa simpática	Diabetes mellitus (neuropatía autonómica) Tirotoxicosis Hipoglucemia cetónica Hipotensión ortostática Tumores malignos Enfermedad de Parkinson Depresión
Enfermedades tratadas con agonistas o antagonistas adrenérgicos. La actividad simpática puede estar o no alterada.	Esquizofrenia Hipertensión arterial Angina de pecho Asma bronquial

**Tabla 4.** Patologías en las que los niveles de catecolaminas están alterados.

A pesar de que las catecolaminas están implicadas en un sinnúmero de enfermedades, su medida no es un buen indicador de la actividad o funcionalidad del sistema nervioso simpático ya que los valores de catecolaminas se alteran con facilidad (Lake, 1976). Así por ejemplo, se puede producir un incremento en las catecolaminas con una simple inclinación del cuerpo, por estar de pie, por sentarse, por la ansiedad, miedo y dolor que algunos sujetos asocian con la venopunción, por hacer ejercicio, etc.

### **10.3. DOPAMINA BETA-HIDROXILASA (DBH).**

#### **10.3.1. Introducción.**

En el periodo de 1967 a 1969, diversos estudios en órganos aislados demostraron que proteínas específicas eran liberadas junto con las catecolaminas tras la estimulación de la médula adrenal y las neuronas simpáticas (Geffen, 1971). Estas proteínas fueron llamadas cromograninas porque fueron identificadas como constituyentes solubles de las vesículas sinápticas adrenérgicas o gránulos cromafines implicados en la síntesis, almacenamiento y secreción de catecolaminas. Estas vesículas cromafines deben su nombre a la capacidad que poseen de teñirse de pardo con sales de cromo o ácido crómico. Una de las proteínas liberada es la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (DBH) que cataliza la conversión de 3,4-dihidroxifeniletanolamina (dopamina) a noradrenalina (Kaufman, 1965). La DBH es un componente menor de las proteínas solubles de las vesículas cromafines; representa aproximadamente el 5% de las proteínas totales (Hörtnagl y cols, 1974). La enzima puede encontrarse en forma soluble o ligada a la membrana. Ambas formas parecen idénticas, por lo que respecta a su composición de aminoácidos,

migración electroforética y propiedades inmunológicas (Hörtnagl y cols, 1972; Foldes y cols, 1972; Kuzuya y Nagatsu, 1972). En la mayoría de los tejidos, la mayor parte de la enzima está “ligada a la membrana”.

Se ha utilizado la medida de la actividad de la DBH como indicador crónico de la actividad del sistema nervioso simpático. La sugerencia de que la DBH sérica pudiese servir como una medida de la función simpáticoadrenal se basó en la suposición de que la enzima, que está presente en la sangre (Goldstein, 1971; Weinshilboum, 1971A y B) se origina de las terminaciones simpáticas y/o de la médula adrenal (Viveros, 1968; De Potter, 1969 y Weinshilboum, 1971A y B) y por tanto refleja la liberación por exocitosis de catecolaminas y además, una vez liberada no sufre los procesos de recaptación pre y postsinápticos de las catecolaminas (Geffen, 1974). Se sabe que la vida media de la DBH en ratas es de varios días, y este hecho también apoya la sugerencia de que la DBH sérica pueda ser un buen indicador de la activación crónica del sistema adrenérgico, más que de la activación aguda de este sistema (Schanberg, 1976).

El significado clínico de los niveles plasmáticos de actividad de DBH ha estado sujeto a controversia durante tiempo. La variación individual en los niveles de actividad de la DBH está genéticamente determinada (Oxenstierna y cols, 1986). Sin embargo, manipulaciones extremas de la función simpática, como el ejercicio extenuante y la estimulación por frío-presión tienen efectos mínimos en los niveles plasmáticos de DBH, a pesar de producir grandes incrementos en las catecolaminas circulantes (Winer y Carter, 1977; Peronnet y cols, 1985). Sin embargo, no puede excluirse el papel de la DBH plasmática como un indicador de las modificaciones a largo plazo en la actividad o en la reserva funcional del sistema nervioso simpático.

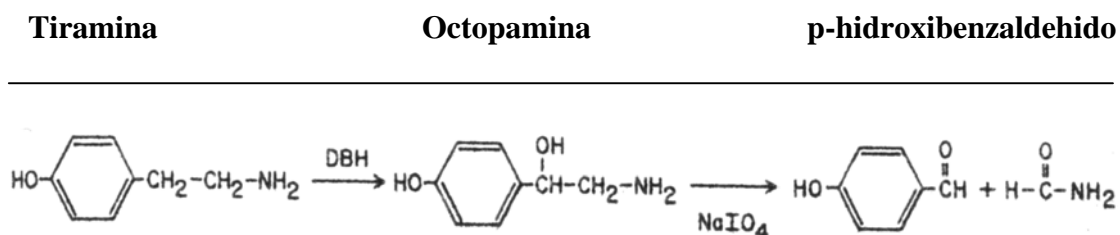
Las propiedades bioquímicas de la enzima han sido determinadas en enzimas aisladas de médula adrenal bovina (Levin y cols, 1960; Levin y Kaufman, 1961; Friedman y Kaufman, 1965; Goldstein y cols, 1965 y 1968) y feocromocitomas y en homogeneizados de neuronas y tejido adrenal de varias especies (Weinshilboum, 1978). La DBH es una glicoproteína tetrámera con 1 ó 2 sitios activos, cada uno conteniendo una molécula de cobre sometida a oxidaciones y reducciones cíclicas (Geffen, 1974). Friedman y Kaufman (1965) demostraron que la actividad de la DBH dependía del cobre, el cual se encontraba también en la enzima purificada. El peso molecular es aproximadamente 300.000 Daltons y se requiere oxígeno molecular y un agente reductor como el ácido ascórbico para que la reacción enzimática tenga lugar (Weinshilboum, 1978).

Nagatsu y cols en 1967 demostraron que varios compuestos sulfidrílicos tales como cisteína, glutatión, coenzima A y mercaptoetanol inhibían la enzima, pero la N-etilmaleimida (que reacciona con los grupos sulfidrílicos) invertía completamente dicha inhibición. Duch y cols (1968) encontraron que la adición de  $\text{Cu}^{2+}$  a varias fracciones subcelulares de la médula suprarrenal incrementaba la actividad de DBH, y también invertía la inhibición enzimática producida por cisteína. La actividad enzimática está incrementada en presencia de catalasa y ácido fumárico. Los inhibidores de la enzima pueden ser inactivados con N-etilmaleimida o por sulfato de cobre.

La DBH alcanza la máxima actividad a pH ácido: a pH 5 (Nagatsu y cols, 1972), es 3 veces más activa que a pH 6.2 (Weinshilboum y Axelrod, 1971A) y un 20% más activa que a pH 5.5 (Goldstein y cols, 1971).



sódico después de la purificación de octopamina por resinas Dowex de intercambio iónico. El p-hidroxibenzaldehído se determina fácilmente por espectrofotometría a 330 nm.



Entre las ventajas de este método cabe señalar que no se necesita purificar PNMT, no se requieren isótopos radiactivos, sólo requiere de 2 a 3 horas, se requiere poco volumen para la determinación (2-25  $\mu\text{l}$ ) y es útil en estudios clínicos incluidos los pediátricos (Nagatsu y Udenfriend, 1972). Sin embargo, hay que tener la precaución si se trabaja con plasma de no utilizar como agente quelante ácido etilendiamintetraacético (EDTA) puesto que inactiva a la enzima. Por otro lado, sería el método de elección para un laboratorio dedicado solo a la medida de la DBH sérica en humanos. Dada la gran estabilidad de la enzima, las muestras tanto de suero como de plasma pueden almacenarse a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  durante al menos 3 meses sin ningún deterioro de la actividad enzimática.

### 10.3.3. Valores de actividad de la DBH sérica.

Las comparaciones directas de los resultados de estudios independientes son difíciles debido a la variación en los métodos, sustratos y la forma de expresar los resultados. Generalmente, los experimentos pueden ser expresados como actividad enzimática a  $37^\circ\text{C}$  en  $\mu\text{mol}$  de octopamina formados/min de incubación/L de suero (UI), nmol/hr/ml, nmol/20 min/ml. Se conoce que las actividades enzimáticas medias en animales adultos son de 10 a 100 veces menores que las encontradas en sangre de adultos humanos. Según Nagatsu y Udenfriend (1972) los valores medios en adultos sanos son de  $41.9 \pm 26.4$  UI (hombres) y  $43.8 \pm 28.5$  UI (mujeres).

### 10.3.4. Fuentes y destino de la DBH sérica.

La DBH está localizada en las vesículas sinápticas adrenérgicas (Oka y cols, 1967; Kemper y cols, 1987). Las contribuciones de la médula adrenal y de las terminaciones simpáticas a la DBH circulante tan sólo se han estudiado en ratas (Geffen, 1974). Sin embargo, las características bioquímicas e inmunológicas de la DBH sérica son similares a las de la enzima en la médula adrenal. A pesar de esto, la similitud bioquímica de la DBH sérica en tejidos sólidos no prueba que la fuente de la enzima circulante sea la neurona adrenérgica o la médula adrenal (Weinshilboum, 1978). Se ha asumido, tras estudios in vitro de estimulación de médula adrenal, que sólo la DBH "soluble" y no la unida a la membrana es la que se libera por exocitosis. Hay muy poca información disponible respecto a la fuente, vida media y destino de la DBH sérica. Mediante el uso de anticuerpos contra DBH en animales se ha estimado que la vida media en ratas adultas Sprague-Dawley es aproximadamente 4 días. Sin embargo, Rush en 1972 estableció una vida media de 3 h en ovejas utilizando DBH ovina

purificada marcada con  $^{125}\text{I}$ . Posteriormente en 1977, Geyer y cols, postularon que esta vida media tan corta podría corresponder a la fase de redistribución de la enzima inyectada. Los datos de DBH sérica humana, en cuanto a origen y vida media no se han establecido con precisión, aunque se acepta que la vida media de la DBH es mucho mayor que para catecolaminas.

### **10.3.5. Edad y sexo en humanos.**

Los niveles de DBH sérica son muy bajos al nacer pero se incrementan durante el crecimiento (del primer al tercer año de vida) y el desarrollo (Weinshilboum, 1978; Geffen, 1974). Por otro lado, no se han establecido hasta la fecha diferencias significativas en cuanto al sexo (Weinshilboum, 1971A).

### **10.3.6. Efectos de la herencia sobre la DBH.**

Diferentes estudios de determinación de la actividad de la DBH sérica en diferentes sujetos con enfermedades genéticas (enfermedades disautonómicas) sugirieron que la herencia puede jugar un papel en la actividad de esta enzima. En la actualidad se conoce que un locus único de un alelo de baja actividad,  $\text{DBH}^L$ , es el responsable de al menos la mitad de las variaciones en la actividad enzimática de la población total (Weinshilboum, 1978). La actividad de la DBH plasmática varía generalmente entre individuos, y un subgrupo de la población tiene niveles bajos de actividad (Weinshilboum, 1978; Zabetian, 2001). Este polimorfismo ha sido estimado como responsable de entre 50 y un 75% de las variaciones de la actividad de la DBH sérica en humanos. En la actualidad se conoce que el gen de la DBH en humanos tiene aproximadamente 23 Kb, que está compuesto de 12 exones y existe como un único gen en el genoma y está localizado en el cromosoma 9q34 (Kobayashi y cols, 1989; Craig y cols, 1988). Dentro de los polimorfismos del gen de la DBH se ha encontrado un polimorfismo de un único nucleótido (SNIP) en la posición 444 del cDNA en el exon 2 (Kobayashi, 1989) que está asociado con diferencias en la DBH plasmática (Cubells y cols, 1998).

### **10.3.7. Ritmo circadiano.**

En estudios con ratas se ha observado que el ritmo de secreción es de 24 h aunque puede variar entre cepas. Así por ejemplo, en ratas macho Holtzmann de 50 días, la actividad sérica de DBH es casi 2 veces más grande a las 4 de la madrugada que en cualquier otro momento del día. Sin embargo, no aparece pico de actividad enzimática en la fase oscura en ratas Berkeley S1 de 50 o 112 días (Banerji, 1975). con un descenso de un 10% en la actividad entre la medianoche y las 4 de la madrugada.

### **10.3.8. Fármacos y efectos hormonales.**

En estudios con animales se ha observado que la glándula adrenal y la hipófisis posterior podrían jugar un papel importante en la actividad sérica de la DBH puesto que después de la eliminación de la pituitaria la actividad sérica se incrementa (Freedman y cols, 1973). En humanos, se han encontrado resultados llamativos en la actividad sérica en pacientes con daño en la glándula tiroidea o después de un tratamiento con hormona



tiroidea o con fármacos que alteran la función tiroidea. Los estudios revelan que los pacientes con hipertiroidismo poseen niveles de DBH sérica inferiores en un 50 % si se compara con controles sanos (Noth y cols, 1974).

### **10.3.9. Efectos del estrés.**

Inicialmente se pensó que se producirían cambios rápidos de gran magnitud en la actividad de la DBH en respuesta al estrés agudo. Sin embargo, no se encontró ningún cambio en la DBH en ninguno de los experimentos que se diseñaron para evaluar esta hipótesis (Weinshilboum, 1978). Curiosamente existen 2 estudios en perros donde se evalúa el efecto de una hemorragia aguda sobre la DBH. En uno de ellos, se observó que la adrenalina y noradrenalina plasmática se incrementaron de forma significativa después de la hemorragia y sin embargo, el incremento en la DBH no fue significativo y en el otro, se observa que a pesar de que los niveles de catecolaminas aumentan 10 veces tras la hemorragia, la DBH sólo se dobla (Cubeddu, 1977).

En un estudio realizado por nuestro grupo (Arnaiz y cols, 1978), se observó que cuando se sometía agudamente a diferentes especies animales a una atmósfera estresante de CO<sub>2</sub>, los valores de DBH sérica, eran indicadores de la actividad simpática.

### **10.3.10. DBH sérica en diferentes enfermedades.**

En la década de los 70, el conocimiento de esta enzima cobró gran interés puesto que se especuló que sus niveles en el SNC podría reflejar cambios neuronales relacionados con la patogénesis de enfermedades como la esquizofrenia (Stein, 1971) y otras enfermedades psiquiátricas. Parece ser que en este tipo de enfermedades, los niveles de DBH están disminuidos (Goldstein y cols, 1971). Según Wei y cols (1997) el polimorfismo de guanina y timina (GT) repetido en el locus de la DBH humana podría ser un importante marcador de la predisposición de algunos individuos a sufrir enfermedades mentales.

También se ha estudiado con profundidad esta enzima en pacientes hipertensos. No se ha encontrado una correlación de la DBH con la presión sanguínea o los valores de catecolaminas basales y tampoco se han demostrado diferencias en los valores de DBH entre los pacientes con hipertensión esencial y los normotensos (Weinshilboum, 1978). Sin embargo, en pacientes con hipertensión asociada a daño del parenquimal renal se produce un descenso en la actividad de la DBH (Stone, 1974). Por otro lado, en pacientes con fallo cardiaco obstructivo se ha descrito un descenso en la actividad de la DBH sérica (Horowitz, 1978).

Se han mostrado resultados contradictorios después de estudios con pacientes sometidos a tratamientos con  $\beta$ -bloqueantes (propranolol). Por un lado, se describió que no había cambios tras 3 semanas de tratamiento y por otro, que había un pequeño incremento en la actividad de la DBH (Weinshilboum, 1978). Ambos estudios fueron realizados en pacientes hipertensos.

#### **10.4. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS RECEPTORES $\beta$ EN PACIENTES:**

La respuesta adrenérgica puede estar alterada en una gran variedad de desordenes clínicos. Estas alteraciones pueden resultar de cambios en la función del sistema venoso, de la concentración de catecolaminas o de cambios en los receptores adrenérgicos (Motulsky y cols, 1982). Así por ejemplo, Szentivanyi en 1968 fue el primero en proponer que algunas enfermedades atópicas (particularmente el asma) podían ser causadas por un desequilibrio en el receptor adrenérgico, con incremento de los receptores  $\alpha$  y descenso de los receptores  $\beta$ . También se ha observado un descenso en la respuesta a los agentes  $\beta$ -adrenérgicos en pacientes con eczema atópico. Una explicación para la función alterada del receptor en enfermedades atópicas es que los anticuerpos están dirigidos contra los receptores  $\beta_2$  adrenérgicos en algunos pacientes con enfermedades atópicas (Venter y cols, 1980); los pacientes con fibrosis quística tienen disminuida la habilidad para responder a la estimulación  $\beta$ -adrenérgica (Davis y cols, 1978); en la insuficiencia cardíaca crónica, el número de receptores  $\beta$  está disminuido, presumiblemente por regulación a la baja (down-regulation) producido por el aumento de la noradrenalina endógena (Brodde, 1993; Vatner y cols, 1999; Post y cols, 1999; Dzimiri, 1999). También se ha observado en la insuficiencia cardíaca un aumento de las proteínas Gi miocárdicas (Neumann y cols, 1989) y que el hipoparatiroidismo tipo I es causado por la pérdida genética de la subunidad  $\alpha$  de Gs (Farfel y cols, 1999).

Por otro lado, los corazones de diabéticos muestran descenso en la respuesta a la estimulación por agonistas  $\beta$ -adrenérgicos. Este descenso en la actividad puede ser debido a cambios en la expresión/señalización de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Dinçer y cols, 2001), ya que se ha demostrado que la expresión de los receptores  $\beta_1$  disminuye mientras que la de los  $\beta_3$  aumenta en corazones de ratas diabéticas (Dinçer y cols, 2003).

En patologías hepáticas, y en la cirrosis en particular, donde el SN vegetativo juega un papel importante, el papel de los receptores  $\beta$  adrenérgicos no está bien definido y la investigación reciente necesita saber del estado de estos receptores. De manera que, expondré de forma más detallada aquellos aspectos relacionados con la cirrosis y el papel del sistema adrenérgico y su control en el desarrollo y tratamiento de la hipertensión portal en pacientes cirróticos.

### **11. CIRROSIS HEPÁTICA:**

La cirrosis constituye la sexta causa de muerte en adultos y octava en el ranking de coste económico (Monthly, 1995) y se acompaña de un espectro de manifestaciones clínicas características. Los hallazgos patológicos reflejan un daño crónico e irreversible del parénquima hepático y consisten en fibrosis extensa acompañada de la formación de nódulos de regeneración. Estos rasgos son consecuencia de la necrosis de hepatocitos, del colapso de la red de soporte de reticulina con posterior depósito de tejido conjuntivo, de la distorsión del lecho vascular y de la regeneración nodular del parénquima hepático restante. El proceso lesivo puede considerarse como la vía final común de muchos tipos de lesión crónica del hígado (Chung y Podolsky, 2001).

Las complicaciones más significativas incluyen ascitis, peritonitis bacteriana espontánea, síndrome hepatorenal, encefalopatía hepática y coagulopatía. La mayor de estas complicaciones es el desarrollo de hipertensión portal (HTP) (Sharara, 2001) que prácticamente desarrollan todos los pacientes con cirrosis, independientemente de su etiología.

## **12. HIPERTENSIÓN PORTAL (HTP):**

### **12.1. INTRODUCCIÓN:**

Gilbert y Villaret fueron los primeros en acuñar el término de hipertensión portal en 1906 reconociendo la asociación de ascitis y cirrosis (Gilbert y Villaret, 1906). Estudios hemodinámicos en los años 30 y 40, continuados hasta la actualidad, llevaron a un mejor conocimiento de la fisiopatología de la HTP (Li y Henderson, 2001).

Hoy en día se sabe que es un síndrome clínico común asociado con daño hepático crónico (Cahill y cols, 2001) y se caracteriza por un incremento en la presión sanguínea en el sistema venoso portal (Wolf, 1999) por encima de un valor crítico de 12 mmHg (Cahill, 1999; Li y Henderson, 2001). Tomando como referencia cero la presión atrial derecha, la presión venosa portal normal es aproximadamente 4-8 mmHg puesto que la resistencia vascular en los sinusoides hepáticos es mínima.

### **12.2. FISIOPATOLOGÍA:**

Inicialmente, se incrementa la presión portal en los cirróticos tras un incremento en la resistencia vascular y un flujo portal elevado (Benoit y cols, 1985, Lebec y Moreau, 1999) aunque según Bosch y cols, (2000), el factor primario es el incremento de la resistencia vascular en el sistema portal más que el incremento en el flujo sanguíneo. El incremento en la resistencia intrahepática es consecuencia del efecto compresivo sobre los sinusoides hepáticos de los nódulos de fibrosis y regeneración propios del hígado cirrótico y de la existencia en dichos sinusoides de elementos celulares capaces de contraerse estrechándolos (Bathal y cols, 1985).

Dado que el sistema venoso portal carece de válvulas, la resistencia ejercida en cualquier nivel del mismo, entre las cavidades cardíacas derechas y los vasos esplácnicos, induce la transmisión retrógrada de la presión elevada, que favorece el desarrollo de colaterales sistémicas portales para soslayar el incremento de la resistencia. Cuando estos fenómenos tienen lugar, paralelamente se produce un incremento del volumen plasmático y un proceso de vasodilatación del territorio esplácnico incrementándose el flujo a dicho nivel agravando todavía más la HTP (Benoit y cols, 1986; Sikula y cols, 1985; Vallance y cols, 1991; Groszmann, 1994; Stanley y Hayes, 1997; Gupta y cols, 1997; Gines, 1998). Entre los mediadores de la vasodilatación esplácnica se ha postulado el glucagón (Sell y cols, 1991; Teramoto y cols, 1994; Aquilar y cols, 1994), los ácidos biliares (Wu y cols, 1987), factores vasoactivos paracrinos producidos por el endotelio vascular como el ácido nítrico y prostaciclina (Bruix y cols, 1985; Guarner y cols, 1992; Teramoto y cols, 1994; Sitzman y cols, 1994; Ohta y cols, 1995)

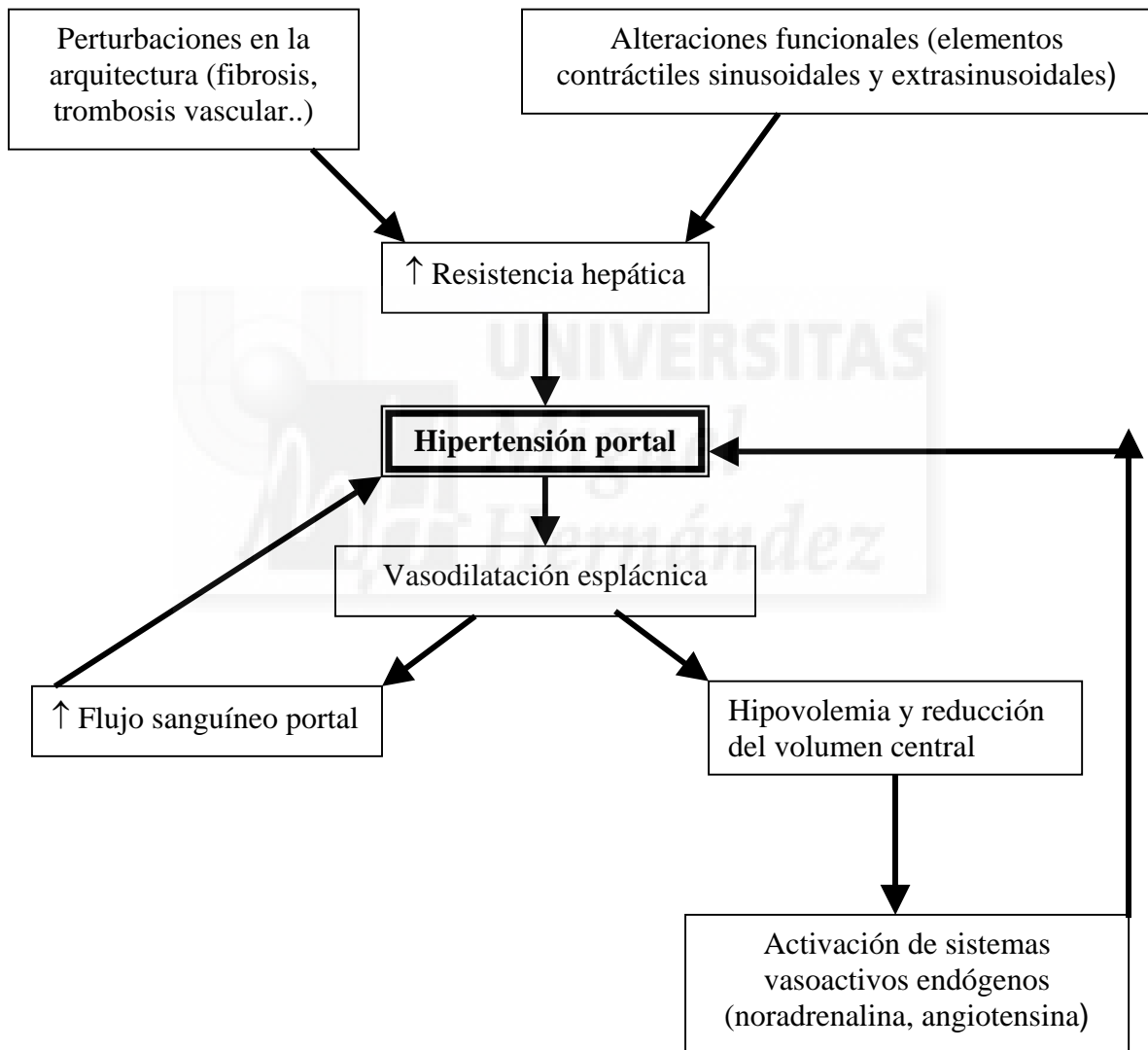
Diversos autores han propuesto la existencia de una vasodilatación general y en territorios específicos como el esplácnico como el principal factor que explicaría las bajas presiones arteriales y los incrementos del flujo sanguíneo cutáneo encontrado en pacientes con cirrosis descompensada y el elevado gasto cardíaco (Murray y cols, 1958; Kontos y cols, 1964; Ring-Larsen y cols, 1982; Bernardi y cols, 1983).

Diferentes estudios experimentales sugieren un posible papel de las prostaglandinas (Hamilton y cols, 1982; Guarner y cols, 1992), del incremento de la

actividad de la óxido nítrico sintasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Wiest y cols, 1999), de cambios en la respuesta a catecolamina y en la actividad del SNS (Lunzer y cols, 1973; Ramond y cols, 1986; Henriksen y cols, 1994), de la endotelina (Moore y cols, 1992; MØller, 1996; Reichen, 1999; Gerbes y cols, 1998), de la angiotensina II (Bosch y García-Pagán, 2000) y del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Ferrari, 1999).

**12.2.1. Mecanismos implicados en la fisiopatología de la hipertensión portal:** (Bosch y García-Pagán, 2000).

La figura 8 recoge los mecanismos implicados en la fisiopatología de la HTP descritos por Bosch y García-Pagán en el 2000.



**Figura 8.** Mecanismos implicados en la fisiopatología de la HTP.

### **12.3. BASES RACIONALES PARA LA TERAPIA FARMACOLÓGICA DE LA HTP:**

El gradiente de presión portal a lo largo del sistema venoso portal es el resultado de la relación entre el flujo sanguíneo portal y la resistencia vascular que se opone a ese flujo. Esta relación está definida por la Ley de Ohm en la siguiente ecuación:

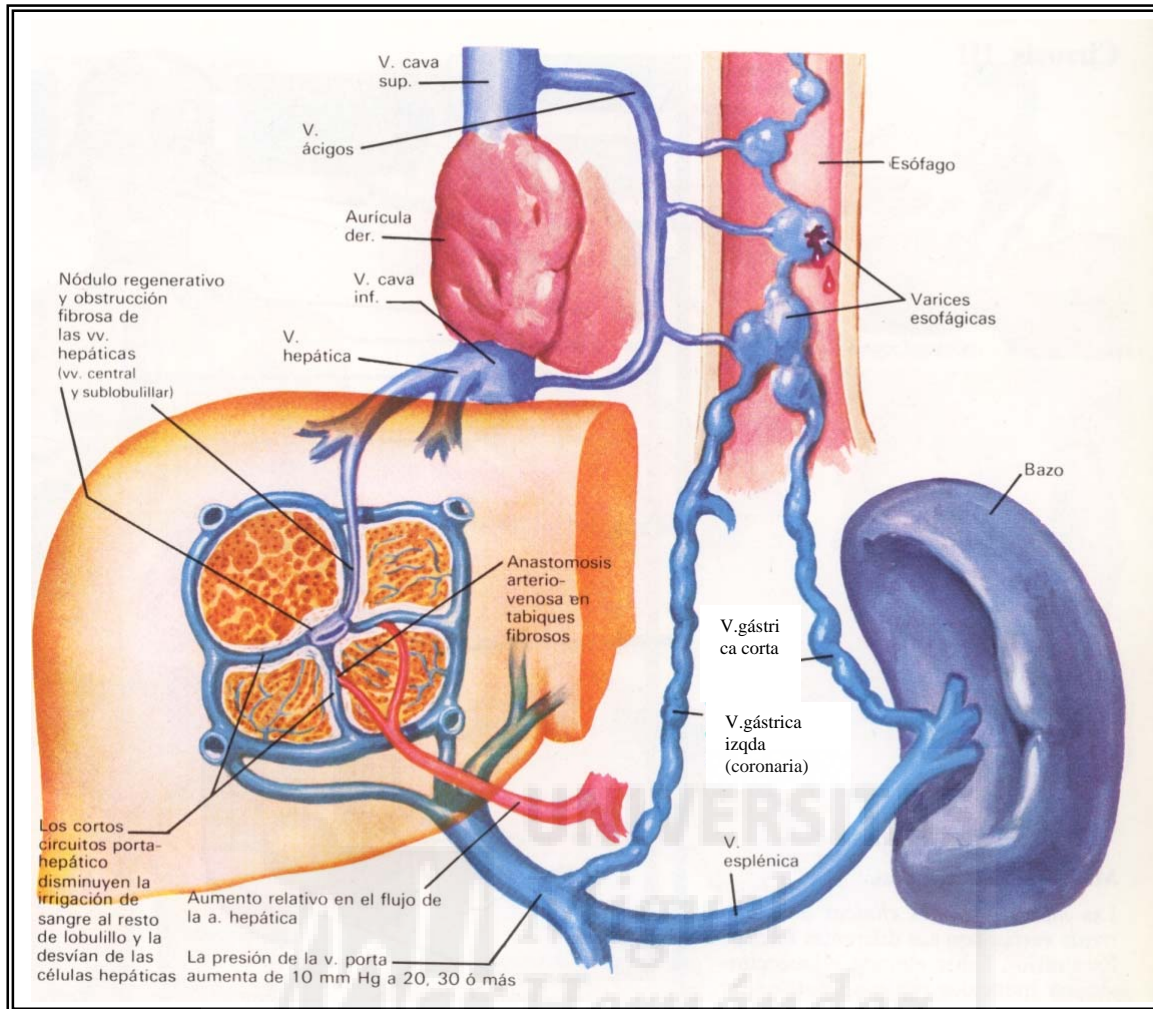
$GPVH = Q \times Rv$  donde GPVH es el gradiente de presión portal (diferencia entre la presión portal y la presión en la vena hepática/ vena cava inferior), Q es el flujo sanguíneo dentro del sistema venoso portal (que en la HTP incluye colaterales sistémicas portales) y Rv es la resistencia vascular del sistema venoso portal.

La presión portal puede reducirse con fármacos que o bien disminuyen la resistencia vascular portohepática, el flujo sanguíneo portal, la volemia o una combinación de estos parámetros (Bosch y cols, 1999; García-Pagán y cols, 1999).

## **13. VARICES ESOFÁGICAS:**

### **13.1. FORMACIÓN:**

La hipertensión portal progresiva tiende a la apertura de venas colaterales portosistémicas (Wolf, 1999). La más importante drena hacia el sistema acigos via venas esofágicas desde la vena gástrica izquierda (vena coronaria) y la vena esplácnica (vía de las venas gástricas cortas) dando lugar al desarrollo de varices gastroesofágicas (Geraghty y cols, 1989). La ausencia de válvulas en el sistema porta facilita el flujo retrógrado (hepatófugo) de la sangre desde el sistema venoso porta de presión elevada a la circulación venosa sistémica, cuya presión es más baja (figura 9). Los principales lugares en que se establece flujo colateral son las venas situadas alrededor del recto (hemorroides), y la unión cardioesofágica (varices esofagogástricas) (Chung y Podolsky, 2001)



**Figura 9.** Representación esquemática de la formación de varices esofágicas (tomado de Netter, 1981).

Para que se desarrollen varices esofágicas es necesario un gradiente de presión mínimo entre la vena porta y la vena suprahepática de 12 mmHg (Viallet y cols, 1975 ; García-Tsao y cols, 1985; Groszmann y cols, 1990; Bosch y García-Pagán, 2000; Vlachogiannakos, 2000).

Hasta 1/3 de los pacientes cirróticos compensados desarrollará varices comparado con el 60-80% de los pacientes descompensados (Silverstein, 1981; Graham, 1981; Morgan, 1988; Feu y cols, 1995; D'Amico y cols, 1995 y 1997; Vlachogiannakos, 2000).

### **13.2. FRECUENCIA DE PRESENTACIÓN (Y/O FORMACIÓN):**

Las varices esofágicas están presentes en el 60% de los pacientes con daño hepático crónico (García-Tsao, 2000). Sin embargo, su presencia depende de la severidad del daño hepático; de manera que, las varices se forman en el 40 % de los pacientes con Child A, 65% de los pacientes con Child B y un 85 % de los pacientes con Child C (Pagliaro y cols, 1994).

La incidencia de nuevas varices es del 8% al año según Pagliaro y cols, 1992 y 1994 y Christensen y cols (1980), mientras que Gentilini y cols (1997) mostraron una

incidencia de 35% a los 3 años y 57% a los 5 años en un grupo de cirrosis post-viral. Una mayor incidencia (50% a los 2 años) fue descrita por Calés y cols (1990) en un estudio donde se incluyó un alto porcentaje de pacientes con cirrosis post-alcohólica.

### **13.3. EPIDEMIOLOGÍA DEL SANGRADO POR VARICES ESOFÁGICAS:**

El sangrado por varices gastroesofágicas es la principal causa de morbilidad y mortalidad en pacientes con cirrosis e hipertensión portal (Graham y cols, 1981; Schlichting y cols, 1983; Burroughs, 1991 y 1992; Nevens y cols, 1996; Sharara, 2001).

Este sangrado ocurre cuando la tensión ejercida sobre la pared delgada de las varices sobrepasa un valor crítico (García-Tsao y cols, 1985; Polio y cols, 1986; Rigau y cols, 1989). De hecho, se ha demostrado que una reducción en el gradiente de presión portal por debajo de 12 mmHg protege a los pacientes frente al sangrado y está relacionado con la supervivencia (Groszmann y cols, 1990; Casado y cols, 1998).

Un tercio de los pacientes con varices esofágicas sangrará los 2 primeros años (Gores y cols, 1989; Groszmann y cols, 1990). El sangrado por varices se detiene espontáneamente en el 60-70%. La mortalidad del sangrado inicial es del 30-70% (Graham y cols, 1981).

Los pacientes que sobreviven al episodio inicial tienen un riesgo de resangrado del 80% a los 2 años (Kennedy y cols, 2002) y del 70% al año (D'Amico y cols, 1995). De hecho, el resangrado ocurre en el 30-40% en 2-3 días y el 60% a la semana (Silverstein y cols, 1981; Graham y cols, 1981).

### **13.4. FACTORES DE RIESGO IMPLICADOS EN EL EPISODIO INICIAL DE SANGRADO POR VARICES:**

(García-Pagán y cols, 1999; Bosch y García-Pagán, 2000; Sharara, 2003).

Se han identificado los siguientes factores de riesgo de sangrado por varices esofágicas en pacientes cirróticos con HTP.

1. Diámetro de las varices: el riesgo en varices pequeñas es de 15% y en varices grandes es del 20 al 30% en 1 año.
2. Marcas rojas en las varices durante la endoscopia.
3. Gradiente de presión venoso portal mayor de 12 mmHg
4. Mala función hepática (grado de Child-Pugh elevado) y daño continuado en el tejido hepático (ej: abuso de alcohol).
5. Recuento de plaquetas menor a  $134.000/\text{mm}^3$ .
6. Actividad de protrombina menor del 80% .
7. Presencia de varices gástricas .

## **14. PROFILAXIS DEL SANGRADO POR VARICES ESOFÁGICAS:**

### **14.1. PROFILAXIS 1<sup>ARIA</sup> DEL SANGRADO POR VARICES ESOFÁGICAS:**

El tratamiento preventivo del sangrado por varices esofágicas (profilaxis primaria), está dirigido a aquellos pacientes que nunca han sangrado pero que poseen varices y su riesgo de hemorragia en los primeros 2 años es del 20-35% (Poynard y cols, 1991; D'Amico y cols, 1999). Los fármacos  $\beta$ -bloqueantes no selectivos (propranolol, nadolol y timolol) son la terapia de elección para la profilaxis primaria de sangrado por varices esofágicas y en la prevención secundaria de nuevos episodios (Lebrec y cols, 1988; Pagliaro y cols, 1992; Binmoeller y Borsatto, 2000; Kennedy y cols, 2002; García-Pagán y cols, 2003; Sharara y cols, 2003). Los  $\beta$ -bloqueantes han mostrado ser efectivos independientemente de la causa y de la severidad de la cirrosis, la presencia de ascitis y tamaño de las varices (Poynard y cols, 1991).

Los modelos experimentales de HTP han mostrado que el tratamiento temprano con propranolol (antes de que se formen las colaterales) disminuye el desarrollo de colaterales (Colombato y cols, 1991; Sarin y cols, 1991; Lin y cols, 1991). Además, los pacientes cirróticos sin varices parecen responder a los  $\beta$ -bloqueantes con una reducción en la presión portal mayor que en pacientes con varices, como se demostró en un estudio con timolol (Escorsell y cols, 1997). Particularmente, el propranolol es el fármaco que guarda la mejor relación coste efectividad en la profilaxis frente al sangrado de varices en todos los grupos de riesgo de pacientes cirróticos con varices esofágicas (Teran y cols, 1997).

### **14.2. PROFILAXIS 2<sup>ARIA</sup> DEL SANGRADO POR VARICES ESOFÁGICAS:**

Está dirigida a aquellos pacientes cirróticos y con hipertensión portal que han sufrido algún episodio de sangrado por varices esofágicas y con un riesgo importante de resangrado que afecta a 2/3 de los pacientes en las 6 primeras semanas después del sangrado inicial (Graham y cols, 1981; Smith y cols, 1982). Para la prevención del sangrado recurrente por varices esofágicas, el tratamiento de elección son los  $\beta$ -bloqueantes no selectivos (propranolol) (Bernard y cols, 1997A y B; García-Tsao, 2000; Gournay y cols, 2000; Sharara, 2001). En 1980, Lebrec y cols, demostraron que el propranolol reducía la presión portal en pacientes con cirrosis e hipertensión portal y mostró la eficacia para prevenir el resangrado gastrointestinal. El metanálisis realizado por Bernard y cols, en 1997 (Bernard y cols, 1997B); mostró que, a pesar de que los  $\beta$ -bloqueantes eran efectivos tanto para la profilaxis 1<sup>aria</sup> como 2<sup>aria</sup> incrementando la tasa de supervivencia a largo plazo, especialmente en los pacientes más graves.



## 15. TRATAMIENTO DE LA HTP CON $\beta$ -BLOQUEANTES NO SELECTIVOS:

La capacidad de los  $\beta$ -bloqueantes para disminuir el flujo sanguíneo esplácnico se conoce desde los años 60 (Price, 1967) pero no fue hasta 1980 cuando Lebrech y cols, mostraron que el propranolol por vía oral reducía la hipertensión portal (HTP) en pacientes con cirrosis y en 1981 cuando afirmó que reducía el sangrado gastrointestinal en pacientes cirróticos (Lebrech y cols, 1980 y 1981). Pascal y cols también establecieron en 1987 el papel de los  $\beta$ -bloqueantes no selectivos para la profilaxis 1<sup>aria</sup>.

Los fármacos  $\beta$ -bloqueantes ejercen su acción de manera combinada. El bloqueo de los receptores  $\beta_1$  a nivel cardiaco provoca una reducción del gasto cardiaco con la consiguiente disminución de la presión arterial y activación simpática refleja, que produce vasoconstricción esplácnica debido al estímulo de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos por la noradrenalina. El bloqueo de los receptores  $\beta_2$  origina una vasoconstricción esplácnica en los vasos del territorio mesentérico y periférico por la eliminación de la vasodilatación mediada por los receptores  $\beta_2$  en este territorio (Hillon y cols, 1982; Lebrech, 1982; Bosch y cols, 1984; Feu y cols, 1991; D'Amico y cols, 1999; Sharara y cols, 2001; Merli y cols, 2003). De manera que la acción de ambos efectos provoca disminución del flujo sanguíneo, de la presión portal, de la presión de las varices y del flujo sanguíneo acigos (que es un índice de flujo sanguíneo colateral gastroesofágico) (Bosch y cols, 1985; García-Pagán y cols, 1990; Feu y cols, 1991 y 1993) además de la reducción de la presión venosa hepática enclavada e incremento de la presión venosa hepática libre originando por tanto una reducción en el gradiente de presión venoso hepático (Tadashi y cols, 1998).

En la figura 10 se representan las acciones mediadas por la activación de los receptores adrenérgicos y en la figura 11 se observa cómo el propranolol bloquea los receptores  $\beta_2$  adrenérgicos, inhibiendo la vasodilatación, de manera que no aumenta el flujo sanguíneo portal, disminuyendo el riesgo de sangrado por varices esofágicas. Por otro lado, el propranolol bloquea los receptores  $\beta_1$  adrenérgicos originando una disminución del gasto cardiaco y de la presión arterial. Este bloqueo de los receptores  $\beta_1$  provoca una activación refleja nerviosa con la consiguiente liberación de adrenalina y noradrenalina. Dichas sustancias, actúan sobre receptores adrenérgicos  $\alpha$ ,  $\beta_1$  y  $\beta_2$ . Pero, al estar los receptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$  bloqueados por propranolol, el efecto de la activación simpática refleja se manifestará sobre todo como estímulo  $\alpha$ , provocando aumento de la vasoconstricción y disminución del flujo sanguíneo portal.

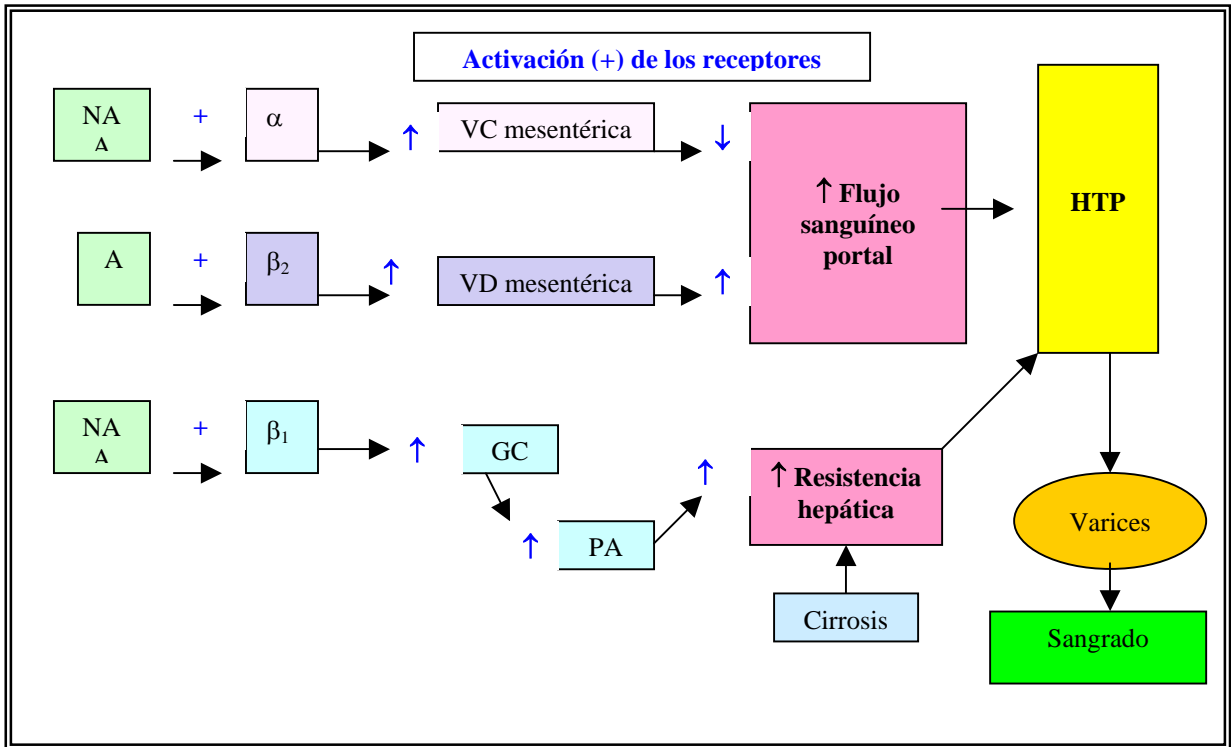


Figura 10. Representación de las acciones mediadas por la activación de los receptores adrenérgicos.

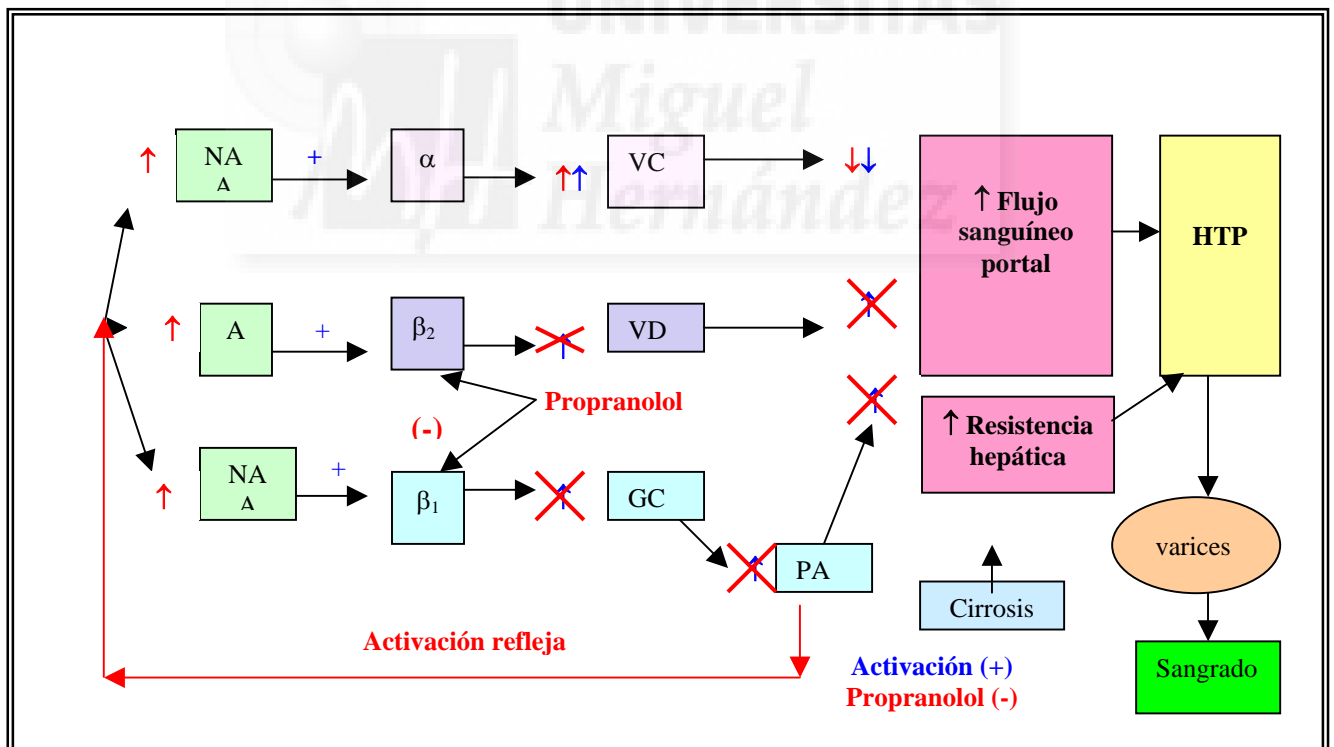


Figura 11. Acción de los fármacos  $\beta$ -bloqueantes no selectivos. NA: noradrenalina; A: adrenalina; VC: vasoconstricción; VD: vasodilatación; GC: gasto cardíaco; PA: presión arterial; HTP: hipertensión portal;  $\alpha$ : receptores  $\alpha$  adrenérgicos;  $\beta_2$ : receptores  $\beta_2$  adrenérgicos;  $\beta_1$ : receptores  $\beta_1$  adrenérgicos; +: activación;  $\uparrow$ : aumento;  $\downarrow$ : disminución; (-): inhibición.

En 1982, Hillon y cols, observaron que el bloqueo de los receptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$  adrenérgicos con propranolol producía una mayor caída en la presión portal que el bloqueo selectivo de los receptores  $\beta_1$  con atenolol. La diferencia entre ambos efectos se atribuyó al bloqueo adicional de los adrenoceptores  $\beta_2$  vasodilatadores dentro de la circulación arterial hepática y esplácnica (Richardson y Withrington, 1981). Este hecho ha sido comprobado tanto en animales (Bilski y cols, 1980) como en voluntarios humanos sanos (Fitzgerald y cols, 1982).

### **15.1. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO:**

En 1967, Price y cols, hipotetizaron un estado de heterogeneidad de los  $\beta_2$  adrenoceptores en las áreas esplánicas y extraesplánicas de algunos pacientes menos susceptibles al bloqueo de los  $\beta_2$  adrenoceptores por el propranolol, mediante estudios de las variaciones en la velocidad de flujo e incrementos en el índice de pulsatilidad en la arteria mesentérica superior y en la femoral.

Viallet y cols, en 1975, encontraron que un *gradiente portohepático* menor de 12 mmHg era indicador de la disminución del riesgo de sangrado en las varices. Una reducción en el gradiente hasta 12 mmHg o un descenso del 20% respecto al gradiente basal tras la administración de un bolus iv (0.15 mg/kg peso) o la administración oral de propranolol, protege ante el primer episodio de sangrado (Groszmann y cols, 1990; Feu y cols, 1995; García-Pagán y cols, 1999; Merkel y cols, 2000A y B; Escorsell y cols, 2000; Sharara, 2001; Bureau y cols, 2002).

En 1984, Bercoff y cols, trataron de evaluar la respuesta al bloqueo  $\beta$ -adrenérgico con propranolol mediante el *test del isoproterenol* en pacientes con cirrosis. Dicho test consiste en la administración de 5 ml de bolus con dosis crecientes (0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2 y 2.5  $\mu$ g) de isoproterenol en una vena del antebrazo a intervalos de 20 minutos. Al mismo tiempo se realizaba control electrocardiográfico continuo antes y después de cada administración. La sensibilidad  $\beta$ -adrenérgica se expresa como la dosis de isoproterenol que incrementa la frecuencia cardiaca en 25 latidos/minuto (IC<sub>25</sub>) (Fritsche y cols, 2000).

Siringo y cols, 1994, utilizan la *ultrasonografía Doppler* para el acceso no invasivo al sistema portal puesto que permite la estimación del flujo sanguíneo venoso y arterial. También sugirieron que algunos parámetros Doppler tienen un valor pronóstico y pueden ser útiles en la evaluación del riesgo de sangrado.

Feu y cols, en 1995, sugirieron la medida del *GPVH* como una herramienta útil en la monitorización hemodinámica de los efectos farmacológicos. En la práctica clínica, el GPVH, que es la presión de perfusión del hígado, se estima como la diferencia de presión entre la vena hepática enclavada y libre (García-Pagán y cols, 1999).

En 1995, Luca y cols, propusieron la medida no invasiva por *eco-Doppler* de los cambios en el flujo sanguíneo femoral después de la administración aguda de propranolol para evaluar la respuesta al propranolol en pacientes con cirrosis. Esta técnica identifica a muchos pacientes con una respuesta pobre al propranolol. Sin embargo, sólo la mitad de los pacientes con una reducción marcada en el flujo sanguíneo femoral tiene una reducción clínica significativa (50% del valor predictivo positivo). Por tanto, este test sólo tiene valor predictivo negativo (Luca y cols, 1995).

Albillos y cols, 1997, sugieren la medida del *Doppler-doble* (cambios en el flujo sanguíneo portal o velocidad de flujo después del bloqueo  $\beta$ ), como indicador predictivo

para discriminar a los buenos y malos respondedores después de la administración aguda (Albillos y cols, 1997), pero no a largo plazo (Merkel y cols, 1998) de los  $\beta$ -bloqueantes no selectivos. Entre los inconvenientes de estas medidas hay que destacar que tienen mucha variabilidad para estimar la respuesta (Sabba y cols, 1990).

Según Tadashi y cols, 1998, la *velocidad de flujo de la arteria mesentérica superior* y el índice pulsátil de dicha arteria, pero no la velocidad de flujo y el índice pulsátil de la arteria femoral son parámetros útiles no invasivos en la predicción de la presión portal en respuesta a la administración iv propranolol (0.10 mg/Kg peso). Se ha observado que la administración de propranolol produce una reducción marcada en la velocidad de flujo de la arteria mesentérica superior y esto está asociado con un incremento en el índice de pulsatilidad de la arteria mesentérica. Estos cambios son mayores en los buenos respondedores que en los pobres. En contraste, la reducción en la frecuencia cardíaca y gasto cardíaco son similares tanto en los buenos como pobres respondedores. Por tanto, el efecto del propranolol sobre el receptor  $\beta_1$  adrenérgico parece uniforme en los pacientes con cirrosis, pero el grado de bloqueo  $\beta_2$  adrenérgico logrado en la circulación esplácnica está disminuido en los pacientes con pobre respuesta al GPVH (Tadashi y cols, 1998).

Nuevos trabajos (Feu y cols, 1991; Escorsell y cols, 1998B y 2000) sugirieron la *medida no invasiva de la presión de las varices*, utilizando un indicador endoscópico sensible a la presión, como un indicador del sangrado de las varices. Según este estudio, una caída en la presión de las varices  $\geq 20\%$  sobre la basal, está asociada con un riesgo muy bajo del sangrado de las varices en el seguimiento. Sin embargo, esta medida tiene limitaciones puesto que sólo se puede aplicar a varices grandes. Entre las ventajas está que se puede aplicar a cualquier enfermedad que provoque hipertensión arterial y varices esofágicas (Rigau y cols, 1989), incluyendo HTP prehepática, mientras que el GPVH solo está indicado para la HTP sinusoidal.

En la actualidad, la medida más común utilizada para conocer si los pacientes con hipertensión portal van a responder al tratamiento con propranolol es la determinación del GPVH que se define como el gradiente entre la presión venosa hepática enclavada u ocluida y la presión venosa hepática libre (gradiente normal  $< 5$  mmHg) (Sharara, 2001). En la práctica clínica, a un paciente se le considera respondedor cuando después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral se produce una reducción  $\geq 20\%$  respecto al GPVH basal medido antes de iniciar el tratamiento o se alcanzan niveles  $\leq 12$  mmHg en el GPVH. Se sabe que una reducción en el gradiente hasta 12 mmHg o un descenso del 20% respecto al gradiente basal, protege ante el primer episodio de sangrado (Viallet, 1975; García-Tsao, 1985; Groszmann y cols, 1990; Feu y cols, 1995; García-Pagán y cols, 1999; Escorsell y cols, 2000; Sharara, 2001; Bureau y cols, 2002). Sin embargo esto sólo se consigue en el 30-50% de los pacientes que reciben  $\beta$ -bloqueantes no selectivos como propranolol o nadolol (Bosch y cols, 1984; García-Tsao y cols, 1986; Groszmann y cols, 1990; García-Pagán y cols, 1990 y 1992; Feu y cols, 1995; Sharara y cols, 2001). Es decir, entre un 50-70% de los pacientes cirróticos con varices esofágicas e HTP no responden al tratamiento con fármacos  $\beta$ -bloqueantes no selectivos.

Con objeto de reducir el tiempo necesario para saber si un paciente es respondedor o no al tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes, se han realizado diversos estudios que tratan de evaluar la capacidad de predecir la respuesta a los  $\beta$ -bloqueantes antes incluso de iniciar el tratamiento (Albillos y cols, 1997; García-Tsao y cols, 1986; Groszmann y cols, 1990; Escorsell y cols, 2000). Uno de estos estudios se ha realizado en la Unidad de Digestivo del Hospital General Universitario de Alicante durante el periodo 2001-2003 y en él se determina el GPVH basal, el GPVH tras 3 meses de

tratamiento con propranolol oral al igual que Feu y cols, (1995) y agudamente tras la administración de un bolus iv de propranolol (0.15 mg/kg peso) con el propósito de evaluar si la respuesta al propranolol de manera aguda es similar a la obtenida después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral logrando así la rápida identificación de los pacientes no respondedores. En el marco de ese estudio se obtuvieron las muestras sanguíneas de los pacientes cirróticos con HTP para llevar a cabo este proyecto.

Los pacientes que tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral responden al tratamiento, continúan con propranolol puesto que se ha demostrado que los  $\beta$ -bloqueantes no selectivos reducen el riesgo de resangrado y mortalidad. Sin embargo, a los pacientes que no responden a los  $\beta$ -bloqueantes, se cambia su tratamiento a alguna de las alternativas disponibles.

No se conocen las causas o mecanismos por los que los pacientes cirróticos no responden al tratamiento aunque se han postulado factores relacionados con el paciente (grado de daño hepático, tamaño de las varices, presencia de marcas rojas en las mismas), factores farmacocinéticos (diferencias en la absorción, distribución o un elevado efecto de primer paso) y farmacodinámicos como disminución en el número de receptores (García-Pagán y cols, 1992), fenómenos de down-regulation (Gerbes y cols, 1986) y polimorfismos genéticos (Dishy y cols, 2001). Dado que ninguno de estos factores parece explicar con claridad las causas por las que los pacientes no responden al tratamiento con propranolol, nuestro equipo se planteó el estudio de este fenómeno evaluando la funcionalidad de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos.

## **15.2. IMPORTANCIA DE LA IDENTIFICACIÓN DE PACIENTES NO RESPONDEDORES AL TRATAMIENTO CON PROPRANOLOL:**

Desde un punto de vista clínico, es crucial conocer si los pacientes tratados con propranolol van a responder al tratamiento, puesto que, al ser administrado como tratamiento preventivo del sangrado por varices esofágicas, no podemos esperar al primer episodio de sangrado para dilucidar su efectividad. Además, hay que tener en cuenta los efectos adversos de estos fármacos; así, D'Amico y cols, 1999, afirmaron que un 15-20% de los pacientes poseen contraindicaciones tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica, psicosis, bloqueo aurículo-ventricular, daños en la válvula aórtica y diabetes insulino dependiente en pacientes con historia anterior de hipoglucemia (García-Pagán y cols, 1999). También puede ocurrir que en algunos pacientes se produzca un adecuado bloqueo  $\beta$ -adrenérgico pero al menos un 30% de los pacientes no consiguen una reducción en la presión portal hasta el nivel requerido para evitar el sangrado (GPVH < 12 mmHg)(García-Tsao, 1986; García-Pagán, 1990; Bosch y cols, 1993). También se ha observado en algunos casos una reducción variable de la presión portal de los pacientes respondedores al tratamiento (Groszmann, 1990; Feu y cols, 1995). Por tanto, es importante identificar a los pacientes no respondedores al tratamiento con el fin de evitar el sangrado por varices esofágicas y los posibles efectos adversos derivados del tratamiento con estos fármacos.

### **15.3. ALTERNATIVAS AL TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO CON PROPRANOLOL.**

Puesto que no todos los pacientes responden al tratamiento con propranolol (Merkel y cols, 2000A; Groszmann y cols, 1990), se han sugerido diferentes tratamientos tanto para la profilaxis 1<sup>aria</sup> como 2<sup>aria</sup> del sangrado por varices esofágicas en los pacientes no respondedores. Así por ejemplo, se ha ensayado con carvedilol que es un  $\beta$ -bloqueante no selectivo con actividad  $\alpha_1$  intrínseca y se ha visto que la administración aguda de carvedilol induce un marcado descenso en el gradiente de presión portal (García-Pagán y cols, 1999) aunque todavía son necesarios nuevos estudios a largo plazo antes de recomendar su empleo.

También se ha ensayado con prazosin, un antagonista adrenérgico  $\alpha_1$  que reduce la presión portal en pacientes con cirrosis (Albillos, 1994) y puede tener un efecto sinérgico cuando se asocia con propranolol, pero incrementa la actividad plasmática de renina y favorece la retención de agua y sodio (Albillos, 1995). En 1998, Albillos y cols, observaron que la combinación de propranolol con prazosina producía un efecto reductor de la presión portal mayor que la combinación de propranolol y mononitrato de isosorbide (ISMN).

También se ha ensayado con espironolactona, puesto que disminuye el gradiente de presión venoso hepático (GPVH) en pacientes con cirrosis. Según los trabajos de García-Pagán y cols, (1994), Nevens y cols, (1996) y Merckel y cols, (2003), la administración de espironolactona crónica disminuye de forma efectiva la presión de las varices y por tanto, según estos autores, la combinación de propranolol y espironolactona merece mayor estudio como terapia profiláctica de la hemorragia por varices (Nevens y cols, 1996).

Otra alternativa al empleo de  $\beta$ -bloqueantes no selectivos la constituye el tratamiento endoscópico. La escleroterapia reduce el riesgo de sangrado recurrente desde un 65% a un 30-35% en 1 año, pero sin embargo, no mejora la supervivencia (Laine y cols, 1993; Lo y cols, 1995), aunque un metanálisis mostró que la escleroterapia y los  $\beta$ -bloqueantes no selectivos son equivalentes con respecto al riesgo de sangrado recurrente y tasa de supervivencia (Bernard y cols, 1997B). La ligadura en bandas de las varices esofágicas ha emergido como el método endoscópico de elección según Villanueva y cols, 2001. Según sus estudios, la ligadura en bandas es superior al placebo y parece ser tan efectivo como el propranolol en la prevención del sangrado por varices. También se ha comparado la escleroterapia sola con la escleroterapia +  $\beta$ -bloqueantes, y se observó que el tratamiento combinado es significativamente mejor que la escleroterapia o los  $\beta$ -bloqueantes solos en la prevención del resangrado (D'Amico y cols, 1995).

Otra opción es la aplicación de un shunt transyugular intrahepático (TIPS). Esta alternativa es más efectiva que la terapia endoscópica para la prevención del sangrado recurrente según Sanyal y cols, 1997; Jalan y cols, 1997 y Rossle y cols, 1997; Escorsell y cols, 1998A, compararon los  $\beta$ -bloqueantes + ISMN con TIPS y observaron que el resangrado fue mayor con la terapia farmacológica, pero, sin embargo, no existen diferencias en la mortalidad por sangrado incrementando el riesgo de mortalidad por cualquier causa.

Sin duda, la alternativa farmacológica que más se ha estudiado ha sido el empleo de nitratos vasodilatadores. Diferentes estudios han mostrado que la reducción en el GPVH puede ser incrementada por la combinación de  $\beta$ -bloqueantes con nitratos que pueden disminuir la resistencia elevada al flujo de la cirrosis hepática y la circulación

portocolateral (Navasa y cols, 1989; García-Pagán y cols, 1991; Villanueva y cols, 1996, D'Amico y cols, 1999). Ahora bien, si los vasodilatadores deben ser usados como monoterapia o en combinación con los  $\beta$ -bloqueantes para la profilaxis 1<sup>aria</sup> del sangrado por varices esofágicas es controvertido (Sharara, 2003): algunos autores (Polio y cols, 1986; Rigau y cols, 1989; Escorsell y cols, 1996) mantienen que el ISMN disminuye significativamente la presión de las varices en pacientes con cirrosis y que puede ser el fármaco indicado en pacientes con contraindicaciones o efectos adversos a  $\beta$ -bloqueantes (Angélico y cols, 1993; Bosch y García-Pagán, 2000). Sin embargo, un estudio reciente de García-Pagán y cols, 2003, no muestra diferencias en la efectividad de la asociación frente a los  $\beta$ -bloqueantes administrados en monoterapia. Estas diferencias entre estudios pueden ser debidas al tipo de fármaco usado (propranolol o nadolol), dosis de fármaco o tiempo de seguimiento; pero sin embargo, el factor determinante entre estudios es el tipo de pacientes que se incluyen en el estudio (varices de tamaño medio o grande frente a varices de cualquier tamaño). El problema del empleo de nitratos es que los estudios a largo plazo sugieren que la mortalidad es mayor en pacientes tratados con ISMN en monoterapia (Angélico, 1997) puesto que al ser un potente agente vasodilatador empeora el estado vasodilatador de los pacientes cirróticos (Salmeron, 1993; Angélico, 1997; Groszmann, 1998; Gournay y cols, 2000) y altera la función renal o retención de sodio en pacientes con o sin ascitis (Vorobioff y cols, 1993). Sin embargo, estudios recientes muestran que el uso a largo plazo de propranolol + ISMN no deteriora la función renal ni empeora el control de ascitis ni incrementa la mortalidad, indicando que esta combinación terapéutica es segura pudiendo ser una buena alternativa para la prevención del resangrado (García-Pagán y cols, 2003).

Ninguna de las alternativas descritas ha demostrado en monoterapia una eficacia y una eficiencia superior a la de propranolol por lo que éste último continúa siendo el tratamiento de primera línea excepto en aquellos pacientes en los que su administración esté contraindicada. En cualquier caso, las alternativas aquí descritas han demostrado su utilidad como tratamiento asociado a  $\beta$ -bloqueantes no selectivos para tratar a los no respondedores.

## **16. FUNCIONALIDAD DEL SNA EN HTP:**

### **16.1. RESULTADOS DE LOS TEST EN PACIENTES CIRRÓTICOS:**

Algunos autores han evaluado la función autonómica en estos pacientes mediante test estándares cardiovasculares (Hendrickse y cols, 1992). Los resultados de estos test han mostrado que el 60% de los pacientes cirróticos posee anomalías de la función refleja cardiovascular (Dillon y cols, 1994; Coelho y cols, 2001). Es decir, independientemente de la etiología, hay una alta prevalencia de la disfunción autonómica en pacientes cirróticos y está relacionada con la severidad hepática; el mecanismo no se conoce (MacGilchrist y cols, 1990; Hendrickse y cols, 1992; Dillon y cols, 1994; Kempler y cols, 1994; Zojajy y cols, 1994; Oliver y cols, 1997; Trevisani y cols, 1999). Ante este hecho, algunos autores han propuesto que la anomalía en los reflejos autonómicos cardiacos es un predictor independiente de la mortalidad en pacientes con daño hepático crónico (Puthumana y cols, 2001). También se ha observado un intervalo QT cardiaco prolongado en pacientes con daño hepático y es independiente de la función cardiaca autonómica pero está relacionado con la severidad del daño hepático (Bernardi y cols, 1998; Puthumana y cols, 2001).

## **16.2. NIVELES DE CATECOLAMINAS EN CIRRÓTICOS.**

Está bien establecido que la actividad del SNS (entendido como aumento de las catecolaminas circulantes) está incrementada en la cirrosis (Shaldon y cols, 1961; Ring-Larsen y cols, 1982; Bichet y cols, 1982B; Arroyo y cols, 1983; García-Pagán y cols, 1999). Este incremento en los niveles de catecolaminas circulantes es uno de los factores más importantes asociados a la hipertensión portal (Arroyo y cols, 1983). El significado de este incremento es incierto (Braillon y cols, 1992), aunque algunos autores han establecido que las catecolaminas plasmáticas están elevadas como un mecanismo reflejo de hiperactividad simpática para compensar la vasodilatación (Kontos, 1964) y la presión sanguínea sistémica baja (Murray y cols, 1958; Epstein, 1996). Otros autores creen que el incremento en la secreción de catecolaminas no es consecuencia de una eliminación hepática disminuida (Henriksen y cols, 1987).

Además, se ha encontrado una estrecha relación positiva entre el nivel de NA y A circulante y la progresión de la enfermedad (Burghardt y cols, 1982; Arroyo y cols, 1983; Henriksen, 1981 y 1984A y B; Tage-Jensen y cols, 1988; Thornton y cols, 1988; Braillon y cols, 1992; Bendtsen y cols, 1990 y 1991) y entre el aumento de NA y la disminución de la supervivencia (Henriksen y cols, 1998). También se ha observado una relación directa entre la NA plasmática y la renina plasmática, aldosterona y vasopresina (Bichet y cols, 1982A; Arroyo y cols, 1983). Todos estos hechos sugieren que los sistemas vasoconstrictores se encuentran activados y/o elevados y que por tanto, están implicados en los cambios hemodinámicos en estos pacientes.

## **16.3. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LA DOPAMINA BETA HIDROXILASA EN CIRRÓTICOS.**

Poco se sabe de lo que acontece respecto a los cambios en la actividad de la DBH en pacientes con daño hepático. Rabinowitz y cols, 1979, estudiaron la actividad de la DBH en 102 pacientes con diferentes grados de daño hepático, encontrando que la actividad de la DBH no está elevada de forma significativa en dichos pacientes comparado con los controles. De todas formas en este trabajo se observó una relación entre la cifra de bilirrubina total y la actividad de la DBH, ya que cifras de bilirrubina total  $\geq 5$  mg/100 ml, se asociaban a valores reducidos de DBH ( $9.1 \pm 8.0$  UI). Posteriormente, cuando se trata de buscar una correlación con los valores de bilirrubina directa, la posible relación desaparece.



## **17. RELACIÓN ENTRE LOS RECEPTORES $\beta$ -ADRENÉRGICOS Y LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE VARICES ESOFÁGICAS:**

Los mecanismos y razones por las que muchos pacientes no responden al propranolol y a otros  $\beta$ -bloqueantes no selectivos como profilaxis del sangrado por varices esofágicas no se conoce, aunque se han postulado diferentes causas. Según Caujolle y cols, 1988, las diferencias en la respuesta al propranolol no se relacionan con la severidad del daño hepático ni con la concentración de propranolol. Se han propuesto alteraciones farmacocinéticas de estos fármacos en estos pacientes (Arthur y cols, 1985; Schepke y cols, 1999) aunque no está bien definido el alcance de éstas. Por otro lado, se han postulado alteraciones farmacodinámicas como disminución y/o atenuación en la respuesta. También existen evidencias que apoyan diferencias en el número de receptores en pacientes cirróticos con ascitis severa y en ratas cirróticas (Gerbes y cols, 1986; Lee y cols, 1990). Gerbes y cols, observaron que en el grupo de pacientes cirróticos, el número de sitios de unión por célula es significativamente más bajo en pacientes con ascitis severa que en los pacientes con ascitis moderada o sin ascitis. Los autores propusieron una regulación a la baja de los  $\beta$ -adrenoceptores como el factor implicado en la respuesta hemodinámica de los fármacos  $\beta$ -bloqueantes. Un trabajo posterior de García-Pagán y cols, 1992, propusieron que podía estar implicada la regulación a la baja (down-regulation) de los  $\beta_2$ -adrenoceptores, promovida por el incremento de la actividad simpática encontrada en este tipo de pacientes. Pero, estos autores demostraron que la falta de respuesta en estos pacientes no estaba relacionada con la densidad de los  $\beta_2$ -adrenoceptores ni con su afinidad por distintos ligandos.

No se conoce si la variabilidad en la respuesta al propranolol puede ser consecuencia de cambios funcionales de los receptores  $\beta_2$  adrenérgicos y/o de los sistemas de transducción a los que se acoplan estos receptores, independientemente del número de receptores. En este sentido, Bomzon y cols, 1987, propusieron un defecto en la función adrenérgica a nivel post-receptor como una posible explicación para la respuesta vascular alterada a vasoconstrictores y la escasa respuesta a  $\beta$ -bloqueantes en una proporción significativa de pacientes con cirrosis avanzada.

Ya en los años 80, Brodde y cols, 1981 y 1987, y más recientemente Dlusskaia y cols, 1996, propusieron que las células sanguíneas eran un modelo válido para el estudio de receptores  $\beta_2$  adrenérgicos en humanos puesto que contienen una población homogénea de receptores  $\beta_2$  adrenérgicos acoplados al sistema AC-AMPC. Por este motivo, y ante la dificultad de acceder a los vasos esplácnicos para estudiar directamente la funcionalidad de los receptores  $\beta_2$  adrenérgicos, nos planteamos el empleo de hematíes (Motulsky y cols, 1982) como sensores potenciales de lo que acontece con los  $\beta_2$  adrenoceptores en los territorios vasculares de estos pacientes.



## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

---

## **1. HIPÓTESIS:**

La actividad funcional de los adrenoceptores  $\beta_2$  y la AC en hematíes de pacientes cirróticos con HTP se correlaciona con cambios en la situación clínica y en la respuesta hemodinámica a la administración iv u oral de propranolol.

## **2. OBJETIVOS:**

### ➤ **Objetivo principal:**

El objetivo principal de este estudio es evaluar la capacidad funcional de los receptores  $\beta_2$  adrenérgicos y del sistema proteína G-adenilato ciclasa acoplados a los mismos en membranas plasmáticas de hematíes de controles sanos y de pacientes con varices esofágicas e hipertensión portal, en tratamiento preventivo primario o secundario.

### ➤ **Objetivos secundarios:**

Secundariamente se pretende analizar los siguientes aspectos:

1. Los parámetros clínicos y/o demográficos que pueden asociarse en las poblaciones de pacientes cirróticos con HTP tratados en profilaxis primaria o secundaria con cambios en la funcionalidad de los receptores  $\beta_2$  adrenérgicos y la AC de los hematíes.
2. La relación existente entre la funcionalidad de los receptores  $\beta_2$  y la AC de los hematíes de los pacientes con cirrosis y los cambios hemodinámicos que se producen después de la administración de un bolus iv de propranolol y/o tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral.
3. Determinar en suero la actividad enzimática de la dopamina beta-hidroxilasa (DBH), como indicador de la actividad del sistema nervioso simpático en estos pacientes.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

## **1. DISEÑO DEL ESTUDIO:**

### **1.1. PACIENTES:**

Se incluyeron 48 pacientes diagnosticados de cirrosis, hipertensión portal, y varices esofágicas atendidos en la Unidad Hepática del Hospital General Universitario de Alicante (HGUA). Se determinó el GPVH a todos los pacientes. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito. Este trabajo fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del centro (Anexo). El diagnóstico de cirrosis hepática se basó en biopsia hepática y/o en pruebas clínicas y bioquímicas compatibles con la cirrosis hepática y de imagen realizadas en la Unidad Hepática del HGUA (cuadro clínico, analítico y pruebas de imagen).

La muestra de 48 pacientes comprende 11 pacientes estudiados para establecer un tratamiento de profilaxis primaria y 37 pacientes para establecer un tratamiento de profilaxis secundaria. Pertenecen al grupo de profilaxis primaria aquellos pacientes con hipertensión portal y varices, diagnosticadas por endoscopia, sin episodios previos de sangrado. Los pacientes de profilaxis secundaria habían presentado hemorragia digestiva alta debido al sangrado de varices esofágicas.

En total, 48 pacientes se sometieron al estudio hemodinámico (EH) agudo en el momento del sangrado previo al inicio del tratamiento (estudio basal). 19 pacientes regresaron a los 3 meses para un EH crónico. Gran parte de los pacientes participantes en el estudio procedían de hospitales comarcales.

### **1.2. ESQUEMA TEMPORAL DEL ESTUDIO (FIGURA 12):**

La determinación del GPVH se ha realizado en 3 ocasiones para cada paciente:

- a. Medida basal: inmediatamente antes de la administración de un bolus iv de propranolol coincidente con el estudio hemodinámico previo al inicio del tratamiento con propranolol (Estudio basal).
- b. Tras la administración iv de propranolol, empleada para el estudio hemodinámico del paciente de acuerdo con el protocolo de este estudio.
- c. Tercera, coincidiendo con la repetición del estudio hemodinámico, tras 3-5 meses de tratamiento continuado con propranolol oral.

#### **1.2.1. Estudio basal:**

##### **1.2.1.1. Método:**

La determinación del GPVH se realizó mediante un cateterismo transyugular de las venas suprahepáticas midiendo la presión libre y la enclavada en las venas suprahepáticas siguiendo la metodología habitual en la práctica asistencial (Chung y Podolsky, 2001). Las medidas se hicieron en la Unidad de Radiología Vascular del HGUA.

### **1.2.1.2. Pacientes de profilaxis primaria:**

El GPVH fue medido en régimen ambulatorio.

### **1.2.1.3. Pacientes de profilaxis secundaria:**

El GPVH se determinó 5-7 días después del episodio hemorrágico, una vez que el paciente estaba hemodinámicamente estable y controlado.

## **1.2.2. Segunda determinación del GPVH tras la administración intravenosa de propranolol:**

### **1.2.2.1. Durante la prueba hemodinámica:**

Tras la determinación basal del GPVH se administró a los pacientes un bolus iv de propranolol (0.15 mg/kg). Treinta minutos después del bolus y sin desplazar el catéter de su ubicación, se registró nuevamente el valor del GPVH (Escorsell y cols, 2000). Se consideró respondedor aquel paciente que tras el bolus iv de propranolol alcanza un GPVH < 12 mmHg o logra una reducción > 20% del valor del GPVH medido en el estudio basal (Groszmann y cols, 1990; Feu y cols, 1995; García-Pagán y cols, 1999; Merkel y cols, 2000A; Escorsell y cols, 2000; Sharara, 2001; Bureau y cols, 2002).

### **1.2.3. Tercer periodo:**

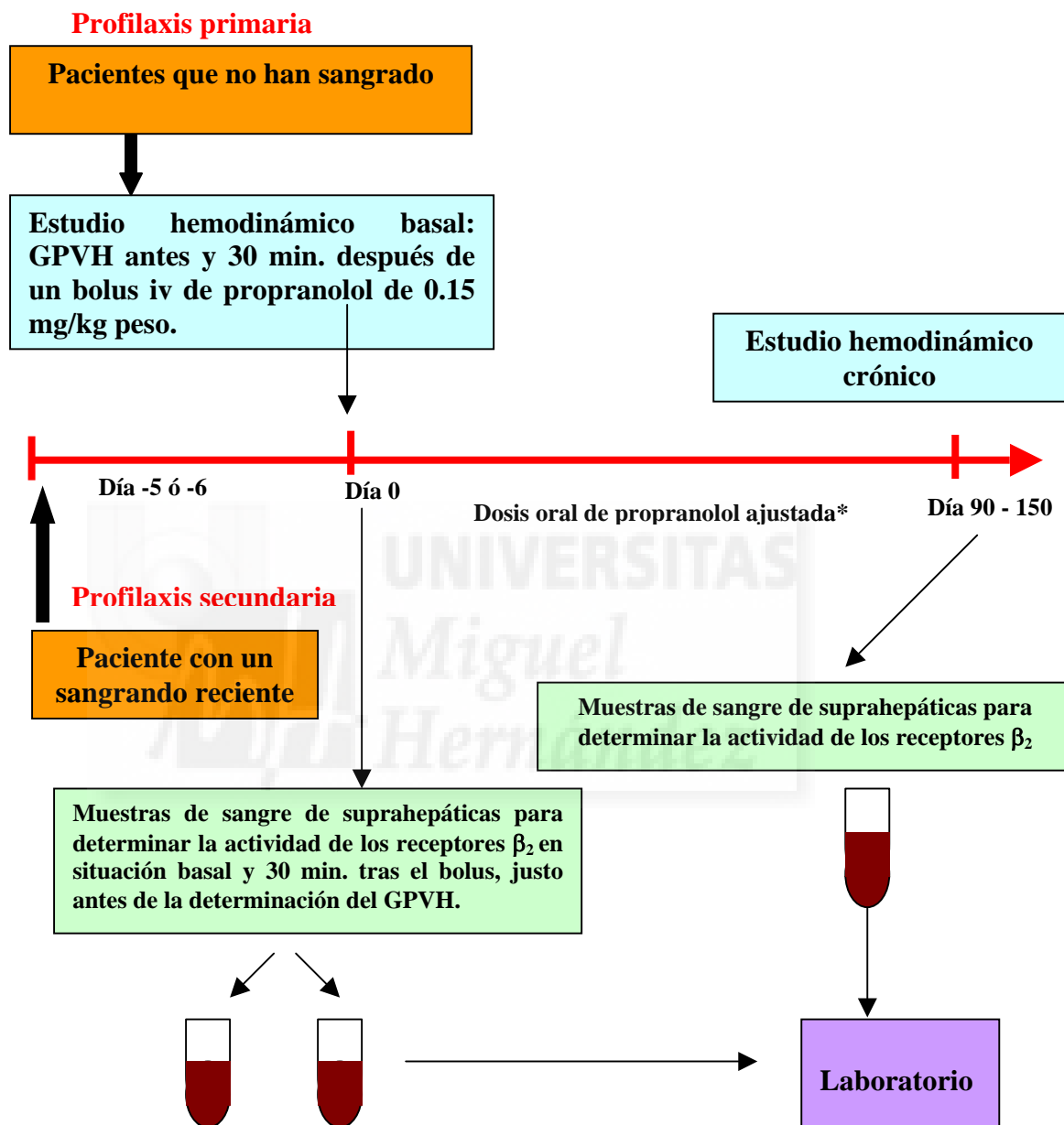
Tras la segunda medida del GPVH y tras conocer si el paciente era o no respondedor, se instauró a todos los pacientes (respondedores o no) un tratamiento con propranolol por vía oral (dosis media: 25mg/12 h). La dosis se estableció como la máxima dosis tolerada que lograba una reducción en la frecuencia cardiaca (FC) hasta un mínimo de 55 latidos/minuto o logra una disminución de la FC del 25% respecto a la FC basal. La dosis media suele estar en torno a 25 mg de propranolol/12 h. Este tratamiento se mantuvo durante 3 meses. Transcurrido este periodo de tiempo se propuso a los pacientes que regresasen a la Unidad de Radiología para una nueva medida del GPVH.

### **1.2.4. Extracción de las muestras de sangre:**

Coincidiendo con cada una de las medidas del GPVH, se extrajo una muestra de 5 ml de sangre de las venas suprahepáticas, que se utilizó para cuantificar la actividad beta-adrenérgica de los hematíes. La extracción inicial se realiza justo antes de la determinación basal del GPVH y la segunda muestra 30 min. tras el bolus, antes del segundo registro del GPVH. En el tercer periodo se extrajo otra muestra de sangre justo antes de la medida del GPVH. En cada ocasión, el volumen de sangre extraído fue de 4-5 ml recogido en tubos con EDTA. Como controles se utilizaron muestras de sangre extraída de venas periféricas procedentes de 37 voluntarios sanos.

### 1.2.5. Suspensión de $\beta$ -bloqueantes en los pacientes que recibían tratamiento previo:

Todos los pacientes que ya estaban tomando  $\beta$ -bloqueantes antes del EH interrumpieron el tratamiento al menos 72 h antes de la medida del GPVH.



**Figura 12.** Diseño del estudio. \*Método de ajuste de la dosis de propranolol: al paciente, una vez que se le ha determinado el gradiente de presión venoso hepático (GPVH) tras el bolus de propranolol, se le insta una pauta de tratamiento personalizada en la que la frecuencia cardíaca (FC) sea de 55 latidos/minutos o que produzca una disminución de la FC del 25% respecto a la FC basal. Normalmente suele ser de unos 25-50 mg de propranolol/12 h.

## **2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ADENILATO CICLASA ACOPLADA AL RECEPTOR $\beta_2$ .**

### **2.1. OBTENCIÓN DE LAS MEMBRANAS CELULARES DE ERITROCITOS Y LINFOCITOS.**

#### **2.1.1. Fundamentos:**

Se realiza siguiendo una técnica desarrollada previamente por nuestro grupo (Horga y cols, 2000). El manejo de las muestras está basado en las técnicas de obtención de membranas de eritrocitos de rata descritos por Gauger y cols, (1975), e Hirata y cols, (1979), en los cuales se usa de forma escalonada la aplicación de 2 choques hipoosmóticos consecutivos.

#### **2.1.2. Preparación de reactivos:**

Tris fosfato 5 mM, pH 8 con  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  1 mM: se toman 0.788 g de Trizma Hidrocloruro (Sigma: T-3253), 0.203 g de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  (Sigma: M-0250) y se disuelven en 1L de  $\text{H}_2\text{O}$ . Ajustar el pH con NaOH 1M. Se prepara el día del estudio y permanece almacenado a 4°C durante 15 días.

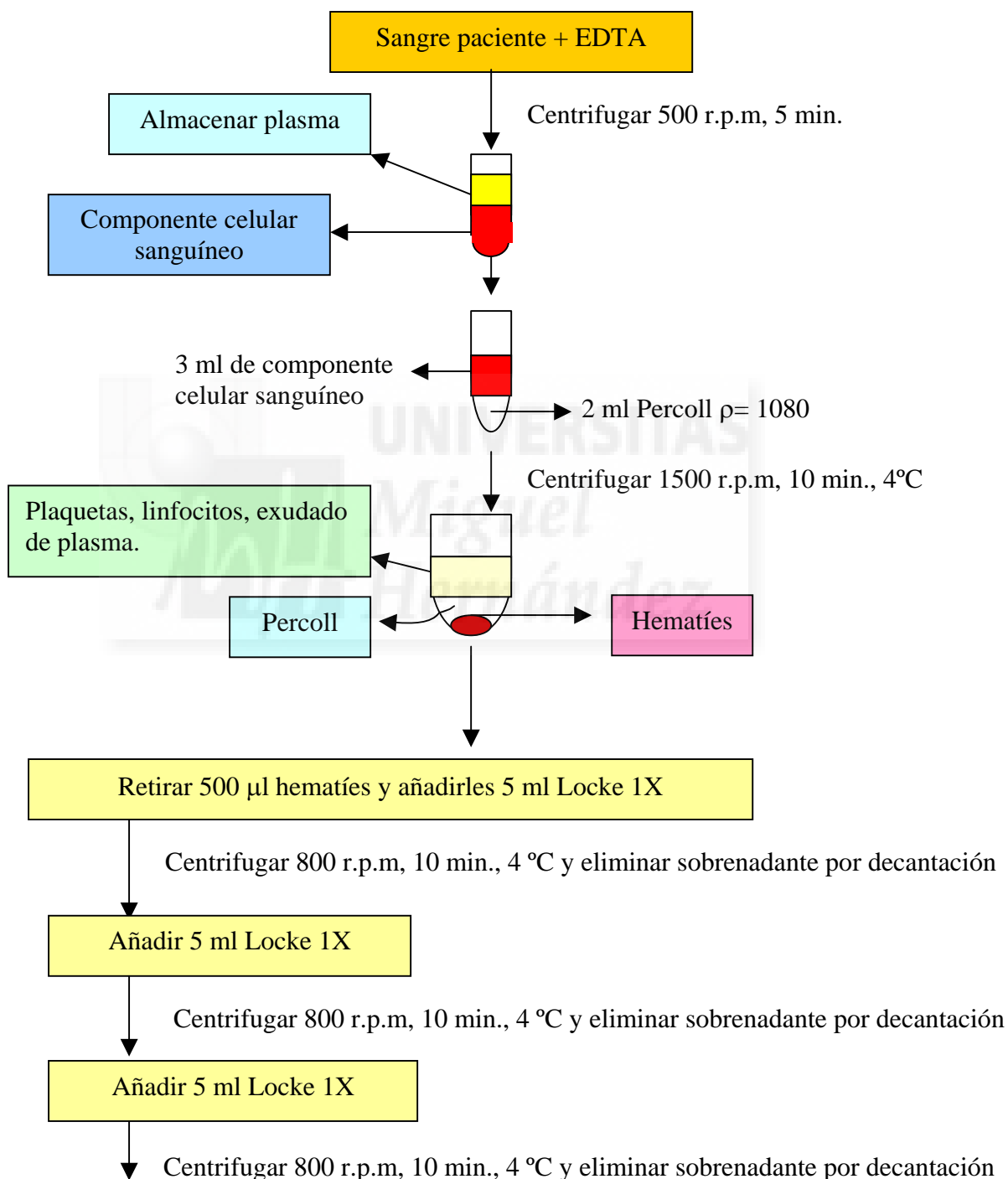
Tris fosfato 0.5 mM, pH 8 con  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  1 mM: se toman 0.0788 g de Trizma Hidrocloruro (Sigma: T-3253), 0.203 g de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  (Sigma: M-0250) y se disuelve en 1L de  $\text{H}_2\text{O}$ . Ajustar el pH con NaOH 1M. Se prepara el día del estudio y permanece almacenado a 4 °C durante 15 días.

#### **2.1.3. Descripción:**

1. La sangre obtenida por venopunción de vías periféricas en el caso de los controles o directamente de venas suprahepáticas en los pacientes durante la medida del GPVH se recoge en tubos con EDTA.
2. Las muestras se centrifugan a 500 r.p.m, durante 5 min. a temperatura ambiente.
3. Se retira el plasma que se almacena congelado a  $-20$  °C.
4. Se someten las células a un gradiente de Ficoll o Percoll (ver apartados 2.2 y 2.3).
5. Se retira el sobrenadante.
6. Se toma las células que quedan en el fondo del tubo (1 ml) y se someten a un lavado con solución salina 0.9%. Para ello, se invierte con suavidad el tubo que contiene dichas células para que se impregnen con 1 ml de la solución salina, y se centrifuga a 1000 r.p.m, 10 min. a temperatura ambiente. Este proceso de lavado se repite 3 veces. Este paso es sólo para el procedimiento con Ficoll.
7. Se toman 600  $\mu\text{l}$  del precipitado final y se sitúan en tubos de centrifuga de Nalgene (Sigma: T-1918).
8. Se añade a cada tubo, 24 ml de Tris-Fosfato 5 mM pH 8 con  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  1mM y se espera 10 min. a 4 °C con objeto de producir citólisis.
9. Cada tubo se centrifuga durante 30 min. a 10000 r.p.m, a 4 °C en una centrifuga Beckman J2-MC.

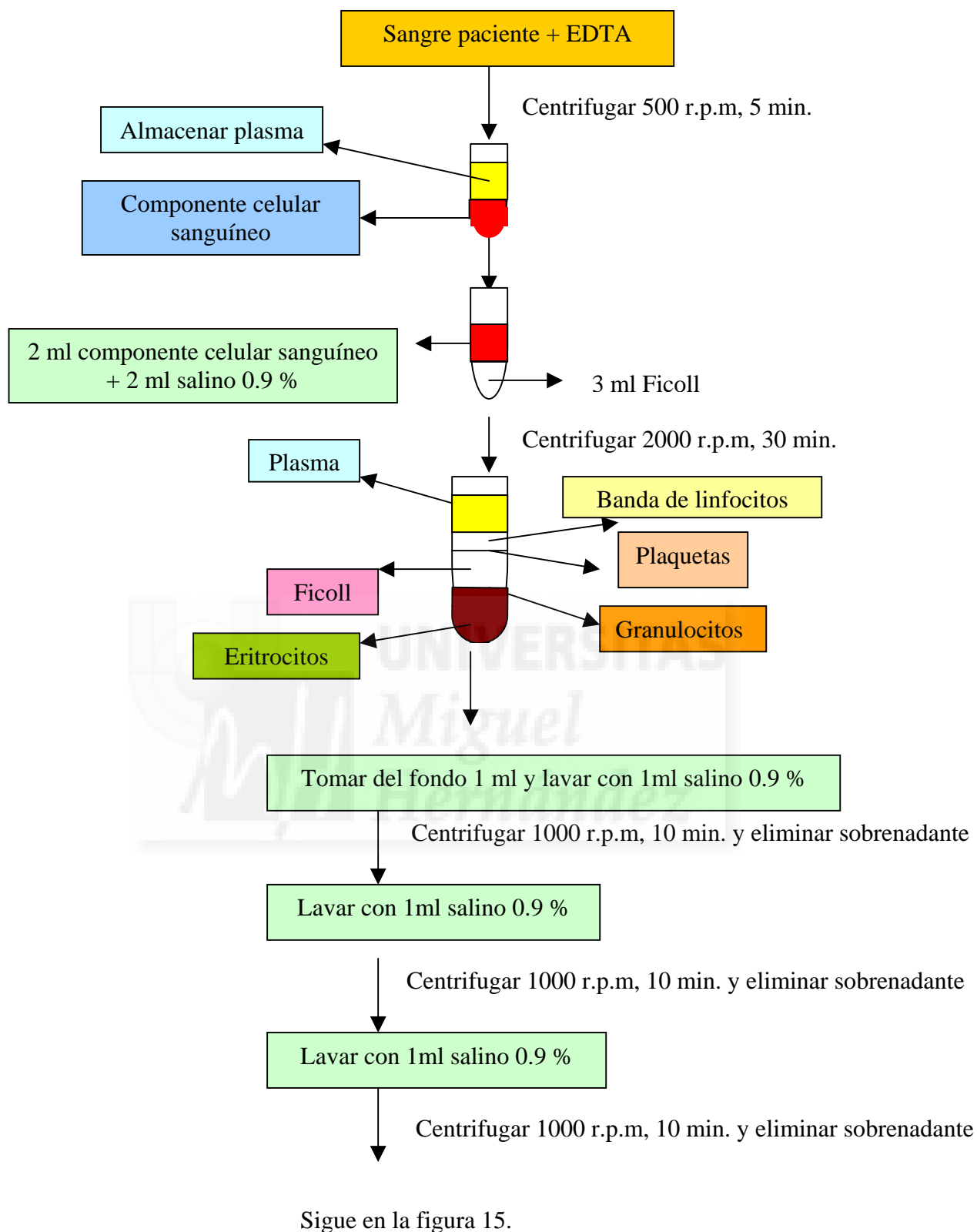


10. Se resuspende el precipitado formado en 6 ml de Tris Fosfato 0.5 mM pH 8 con  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  1mM, manteniéndolo durante 1 h a 4 °C.
11. Se centrifuga durante 30 min. a 10000 r.p.m, 4 °C en una centrífuga Beckman J2-MC.
12. Finalmente, se congela el pellet obtenido, correspondiente a las membranas celulares, a - 80 °C, una vez retirado el sobrenadante. Las membranas pueden permanecer varios meses congeladas hasta su estudio.

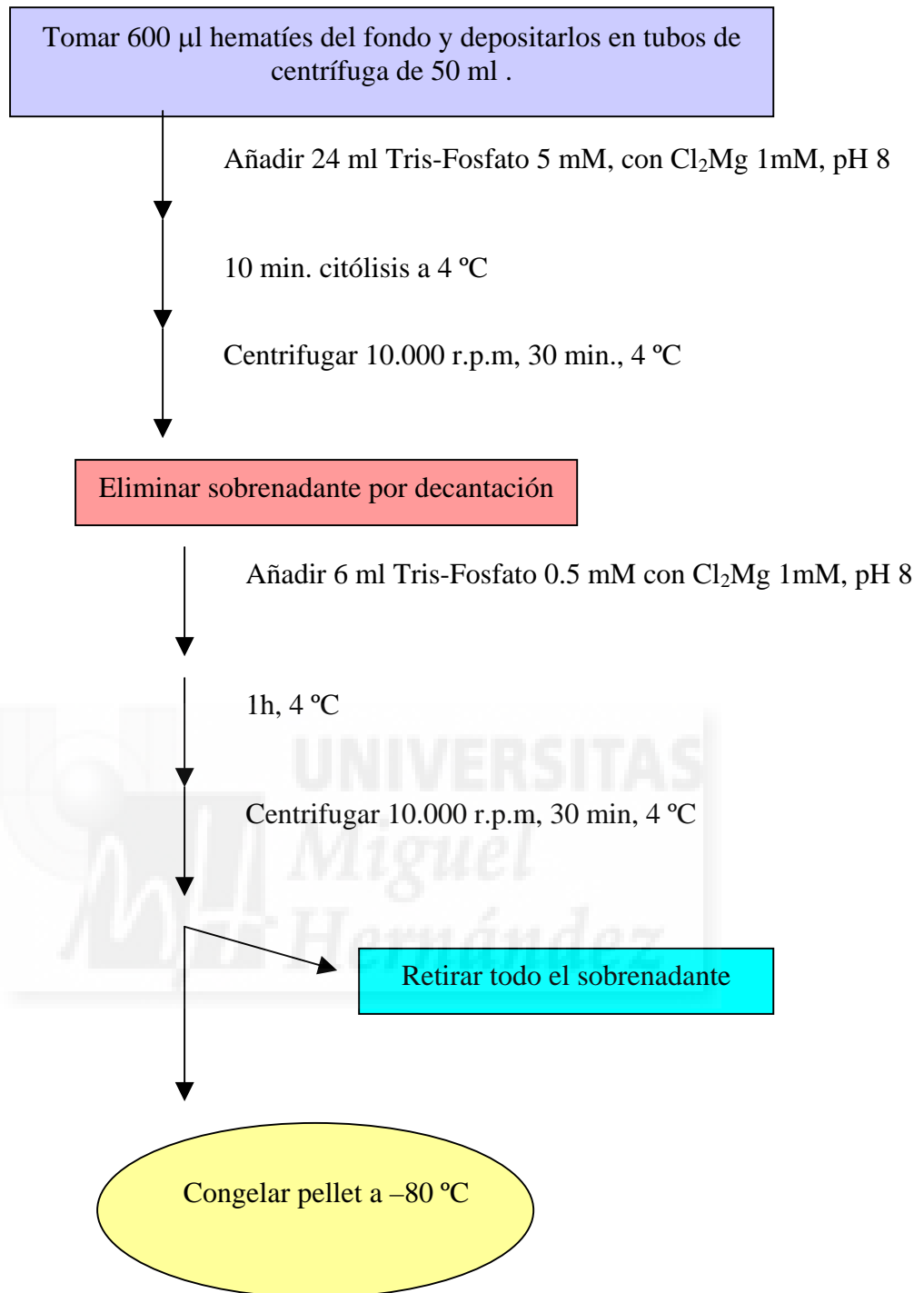


Sigue en la figura 15

**Figura 13.** Método de Hirata y separación con Percoll para la obtención de membranas de hematíes.



**Figura 14.** Método de Hirata y separación con Ficoll para la obtención de membranas de hematíes.



**Figura 15.** Continuación del método de Hirata para la obtención de membranas de hematíes.

## 2.2. SELECCIÓN CELULAR CON PERCOLL:

### 2.2.1. Fundamentos:

La formación de gradientes de densidad por centrifugación es un método muy utilizado y comprobado desde hace muchos años para la separación y purificación de células, virus y fracciones subcelulares, ya que hay una buena correlación entre morfología, funcionalidad y densidad y/o tamaño de los materiales biológicos empleados. De esta forma, y siguiendo la ley de Stokes, centrifugando la muestra a estudiar, las partículas alcanzarán una posición estable que será aquella en donde las densidades de la muestra y las del medio se igualen.

Para realizar los gradientes de densidad hemos utilizado Percoll (Sigma: P1644), que es una solución compuesta por microesferas de sílice coloidal de 15 a 30 nm de diámetro con una cubierta de polivinilpirrolidona (PVP) y que posee las características siguientes:

#### CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DEL PERCOLL®

Densidad	1.130 ± 0.005 g/ml
Conductividad	<1.0 mS/cm
Osmolaridad	<25 mOsm/kg H <sub>2</sub> O
Viscosidad	10 ± 5 cP a 20 °C
pH	8.9 ± 0.3 a 20 °C
Índice de refracción	1.3540 ± 0.0005

Debido a su osmolaridad tan baja, es posible formar gradientes de densidad que son virtualmente isoosmóticos. Su baja viscosidad permite la rápida formación de bandas isopícnicas ó la rápida separación zonal de células y partículas.

### 2.2.2. Preparación de reactivos:

Para preformar el gradiente, al Percoll no diluido se le añade solución tamponada de Locke 10X en una relación Percoll/Locke volumen/volumen de 9:1; de tal forma que se establece una osmolaridad de un valor de 300 mOsm/kg de H<sub>2</sub>O. Esto constituye lo que denominamos la Solución Isoosmótica de Percoll® (SIP).

#### Composición de la solución de Locke concentrada 10X

NaCl	1540 mM	45 g
KCl	56 mM	2.08 g
NaHCO <sub>3</sub>	36 mM	1.51 g
Glucosa	56 mM	5.04 g
Hepes	50 mM	5.95 g
H <sub>2</sub> O	c.s.p	500 ml (ajustar a pH 7.4 con NaOH 1 M)

La nueva solución adquiere por tanto una nueva densidad, que podemos calcular a partir de la siguiente fórmula:

$$\rho_i = \frac{V_o \rho_o + V_x \rho_x}{V_x + V_o}$$

Donde:  $V_x$  = volumen del medio diluyente (1 ml)  
 $V_o$  = volumen del Percoll® (9 ml)  
 $\rho_o$  = densidad del Percoll® (1.130 g/ml)  
 $\rho_x$  = densidad del Locke 10X (1.058 g/ml)  
 $\rho_i$  = densidad del SIP (1.1228 g/ml)

$$\rho_i = \frac{9 \cdot 1.130 + 1 \cdot 1.058}{1 + 9} = 1.1228 \text{ g/ml}$$

A partir de aquí, realizamos diluciones del SIP mediante la adición de **Locke 1X** (solución que se obtiene al diluir 10 veces con H<sub>2</sub>O la solución Locke 10X), obteniendo cambios en la densidad, sin modificación importante de la osmolaridad. La densidad que utilizamos en nuestros ensayos es la de 1.080, donde se separan claramente los eritrocitos del resto de los componentes de la sangre (Gisbert, 1987 y De Agustín, 1989).

Utilizando la siguiente fórmula (tomada de Percoll®, Methodology and Applications, 1981), podemos calcular los volúmenes requeridos para obtener las soluciones con las densidades deseadas:

$$V_y = \frac{V_i (\rho_i - \rho)}{\rho - \rho_y}$$

Donde:  $V_y$  = Volumen del medio de dilución (Locke 1X) ml  
 $V_i$  = Volumen del SIP ml  
 $\rho_i$  = densidad de la solución del SIP g/ml  
 $\rho_y$  = densidad del medio de dilución g/ml  
 $\rho$  = densidad de la solución formada g/ml

### **Dilución del SIP para la obtención de la banda de densidad**

<u>Vol. SIP</u>	<u>Vol. Locke 1X</u>	<u><math>\rho_i</math></u>	<u><math>\rho_y</math></u>	<u>Vol. final</u>	<u>Densidad final</u>
1 ml	0.56 ml	1.1228 g/ml	1.0058 g/ml	1.56 ml	1.080 g/ml

De esta manera y para las condiciones de trabajo estándar, tendremos 3 bandas de soluciones con densidades diferentes: la banda de 1.080 que separa los eritrocitos del resto de componentes de la sangre que forman una banda, de menor densidad.

### **2.2.3. Descripción del método (figura 13):**

1. Se centrifuga la sangre a 500 r.p.m durante 5 min. para separar el plasma y eliminar plaquetas.
2. Cuidadosamente se depositan 2 ml de Percoll (banda con una densidad de 1080) y 3 ml del componente celular, obtenido tras la centrifugación de la sangre, en un tubo de ensayo de cristal ancho. Se comienza con la solución de mayor densidad, la de 1.080, sobre la que se deposita la sangre. Para este procedimiento se utiliza una micropipeta con orificio de salida ancho, teniendo especial cuidado en dejar resbalar el líquido sobre la pared del tubo, que debe estar inclinado respecto a la horizontal en un ángulo de 20 a 30°. Este paso es especialmente importante puesto que de ello depende la correcta formación de las distintas interfases bien diferenciadas. Con este método es posible formar gradientes con bandas de densidad que sólo difieran en 0.002 g/ml (Ulmer, 1979).
3. Centrifugar los tubos a 1500 r.p.m, 10 min, 4 °C (Gutiérrez y cols, 1979).
4. Los eritrocitos depositados en el fondo del tubo se recogen con una pipeta Pasteur mediante una leve succión de los mismos, y se depositan en otro tubo.
5. Se realizan tres lavados añadiendo 5-10 volúmenes de Locke 1X por volumen de suspensión celular, recuperando las células después de cada lavado mediante centrifugación a 800 r.p.m durante 10 min. y a 4 °C. Estos lavados son para separar el Percoll contaminante de los eritrocitos.  
El proceso de retirada del Percoll de las células, así como el resto de los procedimientos que se realizan hasta el final, son llevados a cabo a 4 °C con el fin de preservar la estructura física del receptor beta-adrenérgico, tal y como recomiendan Hirata y cols, (1979).

## **2.3. SELECCIÓN CELULAR CON FICOLL.**

### **2.3.1. Fundamento:**

Este procedimiento de aislamiento está basado en la migración diferencial durante la centrifugación resultando en la formación de capas que contienen diferentes tipos celulares.

### **2.3.2. Reactivos:**

Se ha usado el kit comercial Ficoll-Paque® Plus (Amersham Pharmacia Biotech) para el aislamiento de los linfocitos.

### **2.3.3. Descripción del método:**

1. Se centrifuga la muestra de sangre a 500 r.p.m durante 5 min. y se retira el plasma sobrenadante.
2. Se colocan 3 ml de la solución de Ficoll-Paque en un tubo de vidrio y sobre ésta se deja caer por la pared suavemente la muestra de células sanguíneas diluida (2 ml de precipitado celular sanguíneo + 2 ml de solución salina 0.9 %).
3. El tubo se centrifuga a 2000 r.p.m durante 30 min. a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, la banda inferior contiene eritrocitos. La capa

inmediatamente superior a la de los eritrocitos contiene granulocitos, los cuales poseen una densidad suficiente para migrar a través de la capa de Ficoll-Paque. Debido a su baja densidad, los linfocitos se sitúan en la interfase entre el plasma y el Ficoll-Paque con otras partículas sedimentadas suavemente (plaquetas y monocitos).

## **2.4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS: MÉTODO DE BRADFORD.**

### **2.4.1. Fundamentos:**

La técnica descrita por Bradford M. en 1976 es un método rápido y sensible para la cuantificación de microgramos de proteínas utilizando los principios de unión de proteínas-colorante. Es un método que implica la unión del Azul Brillante Coomassie G-250 a las proteínas. La unión del colorante a la proteína provoca un desplazamiento de la absorbancia máxima del colorante de 465 a 595 nm, y es el incremento en la absorbancia a 595 nm lo que se monitoriza mediante un espectrofotómetro Philips PU 8620 UV/VIS/NIR. Es un ensayo muy reproducible y rápido con el proceso de unión del colorante completado en aproximadamente 2 minutos y con una buena estabilidad del color durante 1 hora. Hay muy poca interferencia o es nula con cationes como sodio y potasio. Los únicos componentes que provocan una interferencia importante en el color son algunos detergentes como dodecil sulfato sódico, Tritón X-100 y detergentes comerciales para el cuidado de manos.

Este ensayo se suele emplear para determinar concentraciones de proteínas en el rango de 150-1500 µg/ml.

### **2.4.2. Reactivos:**

Los reactivos que se utilizan son:

1. Azul Brillante Coomassie G-250 (Sigma B0770).
2. Etanol 95 % (Baker 8007).
3. Ácido ortofosfórico 85 % (Sigma P6560).

Las soluciones que hay que preparar son:

1. Solución A.
  - a. 100 mg de Azul Brillante Coomassie G-250 en 50 ml de etanol 95 %.
  - b. Se prepara cada vez que se vaya a preparar el reactivo stock Azul de Coomassie.
2. Solución B (reactivo stock Azul de Coomassie).
  - a. 100 ml de ácido fosfórico 85 %.
  - b. 50 ml de solución A.
  - c. 850 ml de agua destilada.
  - d. Se mantiene en agitación a temperatura ambiente toda la noche. Al día siguiente se filtra y se almacena a 4 °C. Protegido de la luz es estable durante 1 mes.

3. Solución estándar de albúmina (1 mg/ml).
  - a. 100 mg de albúmina bovina (Sigma A2153).
  - b. En 100 ml de agua destilada. La albúmina es generalmente usada como un estándar de proteínas, aunque pueden usarse otras proteínas con diferentes composiciones de aminoácidos tales como lisozimas. Se almacena alicuotada a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 1 mes.

#### 2.4.3. Procedimiento del ensayo:

1. Preparar los estándares de proteínas por duplicado y a temperatura ambiente para lo que se pipetea las soluciones stock de albúmina en tubos 12 x 75 mm (5-40  $\mu\text{l}$  proporcionan lecturas de absorbancias en el rango lineal del ensayo). Añadir agua destilada hasta 100  $\mu\text{l}$ .
2. Pipetear 5  $\mu\text{l}$  de la muestra problema en los tubos de 12 x 75 mm y completar hasta 100  $\mu\text{l}$  con agua.
3. Añadir 5 ml del reactivo stock Azul Coomassie (solución B) a cada tubo.
4. Agitar en vórtex durante 5 segundos.
5. Después de 2 min. y antes de 1 h, leer la absorbancia a 595 nm. A partir de la relación absorbancia- $\mu\text{g/ml}$  de proteínas de la recta estándar, se calcula la cantidad de proteínas de la muestra. La recta estándar se hace cada día de ensayo.

#### 2.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ADENILATO CICLASA (AC):

La actividad beta-adrenérgica se evalúa determinando la formación de Adenosín Monofosfato Cíclico (AMPC) en una suspensión de membranas de eritrocitos humanos antes y después del estímulo beta-adrenérgico con isoproterenol de acuerdo con Horga y cols (2000). Para ello, incubamos las membranas celulares de eritrocitos en un medio que contiene básicamente:

- Tampón Tris-HCl (Sigma: T-3253) 175 mM con  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  1mM (Sigma: M-0250), pH 7.4.
- Isobutilmetilxantina 1 mM (MIX o IBMX, Sigma: I-5879).
- Iones divalentes  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  (en forma de cloruros, Sigma: M-3634).
- Adenosín Trifosfato (ATP, Sigma: A-2383).
- Guanosín Trifosfato (GTP, Sigma: G-8877).
- Membranas celulares.
- En ciertos casos, fármacos agonistas ( $\pm$  isoproterenol, Sigma: I-5627) y antagonistas (propranolol Sigma: P-0884)  $\beta$ -adrenérgicos (Gisbert, 1987).

El AMPC formado se cuantifica utilizando un ensayo de competición por la fijación a una proteína específica mediante un Kit de radioinmunoanálisis (RIA) (Amershan Pharmacia código TRK 432) (Steiner, 1972 y Peng, 1977).



### 2.5.1. Preparación de reactivos:

1. Tris HCl 175 mM con Cl<sub>2</sub>Mg 1mM, pH 7.4: se pesa 1.379 g de Tris HCl y 0.0100 g de Cl<sub>2</sub>Mg. Disolver en unos 45 ml de H<sub>2</sub>O y ajustar el pH a 7.4 con NaOH 1M. Completar hasta 50 ml con H<sub>2</sub>O. Preparar cada día de ensayo.
2. IBMX 1 mM: se pesan 0.0380 g y se disuelven en 20 ml de H<sub>2</sub>O. Se pasa a un baño a 80 °C para facilitar la disolución. Las alícuotas se almacenan durante 1 mes a -20 °C.
3. Cl<sub>2</sub>Mg 9mM: se pesan 0.640 g y se disuelven en 10 ml de H<sub>2</sub>O. Las alícuotas se almacenan durante 1 mes a -20 °C.
4. Cl<sub>2</sub>Mn 9mM: se pesan 0.623 g y se disuelven en 10 ml de H<sub>2</sub>O. Las alícuotas se almacenan durante 1 mes a -20 °C.
5. Isoproterenol 10<sup>-3</sup> M: se pesan 0.0430 g y se disuelven en 10 ml de H<sub>2</sub>O que está en hielo. Se agita y se diluye 10 veces para obtener ± Isoproterenol 10<sup>-4</sup> M. Preparar cada día de ensayo.
6. Propranolol 10<sup>-5</sup> M: se pesan 0.0250 g y se diluyen en 500 ml de H<sub>2</sub>O. Preparar cada día de ensayo.
7. GTP 0.1 mM: se pesan 0.0045 g y se diluyen en 5 ml de H<sub>2</sub>O que está en hielo. Preparar cada día de ensayo.
8. ATP 2 mM: se pesan 0.0480 g y se diluyen en 2.5 ml de H<sub>2</sub>O que está en hielo. Preparar cada día de ensayo.

### 2.5.2. Preparación de las muestras (Figura 16):

1. Descongelar a temperatura ambiente las membranas celulares que estaban a -80 °C.
2. Resuspender en 50 µl de tampón Tris-HCl 175 mM con Cl<sub>2</sub>Mg 1mM, pH 7.4, a 4 °C.
3. Determinar la cantidad de proteínas de que disponemos mediante el método de Bradford en una alícuota de 5 µl.
4. Se depositan entre 100 y 250 µg de proteínas en cada uno de los tubos de ensayo problema.

PREINCUBACIÓN	COMPUESTOS (Concentración final)	VOLUMEN (µL)
37 °C, 20 min, agitación, protegido de la luz	Tris-HCl 175 mM con Cl <sub>2</sub> Mg 1mM, pH 7.4	140
	Cl <sub>2</sub> Mg 9 mM, Cl <sub>2</sub> Mn 9 mM	10/10
	Isobutilmetilxantina (IBMX 1 mM)	40
	Antagonistas (Propranolol 0.01 mM)	20
	Membranas (100-250 µg)	Variable
INCUBACIÓN	COMPUESTOS	VOLUMEN (µL)
37 °C, 10 min, agitación, protegido de la luz desde la adición de ATP	Agonistas (isoproterenol 0.1 mM)	20
	GTP (0.1 mM)	20
	ATP (2 mM)	20
	Agua	Hasta completar 350 (µL)

**Tabla 5.** Preparación de las condiciones de estudio de la adenilato ciclasa.

5. Preincubación con todos los elementos que aparecen en la tabla 5, apartado preincubación, durante 20 min. a 37 °C y protegido de la luz.
6. Sin sacar los tubos del baño, se añade el fármaco a ensayar (el agonista adrenérgico isoproterenol 0.1 mM), GTP 0.1 mM, el agua destilada y desionizada para igualar volúmenes, y por último el ATP 2mM, con el que da comienzo la reacción.
7. Incubar durante 10 min a 37 °C, en agitación y protegido de la luz.
8. Pasar los tubos a otro baño que está a 100 °C durante 3 min. Este procedimiento descrito por Albano y cols en 1973, detiene la reacción enzimática rápidamente por un proceso de desnaturalización de las proteínas que intervienen en la reacción. El AMPc formado no sufrirá ninguna alteración puesto que los enlaces fosfodiéster formados son termoestables.
9. Se congelan las muestras a -270 °C con N<sub>2</sub> líquido, manteniéndolas en este estado al menos 10 min. Con este proceso conseguimos que la membrana se retraiga y posteriormente al descongelarse se formen poros por donde pueda escapar el AMPc al medio.
10. Dejar descongelar las muestras a temperatura ambiente para facilitar la salida del AMPc desde el interior de las vesículas de membranas.
11. Centrifugar a 3500 r.p.m durante 10 min y a 4 °C, con el fin de retirar el material insoluble.
12. Tomar 50 µl del sobrenadante (que es donde se encuentra el AMPc), y se procesa mediante radioinmunoanálisis (RIA) para determinar la cantidad de AMPc.



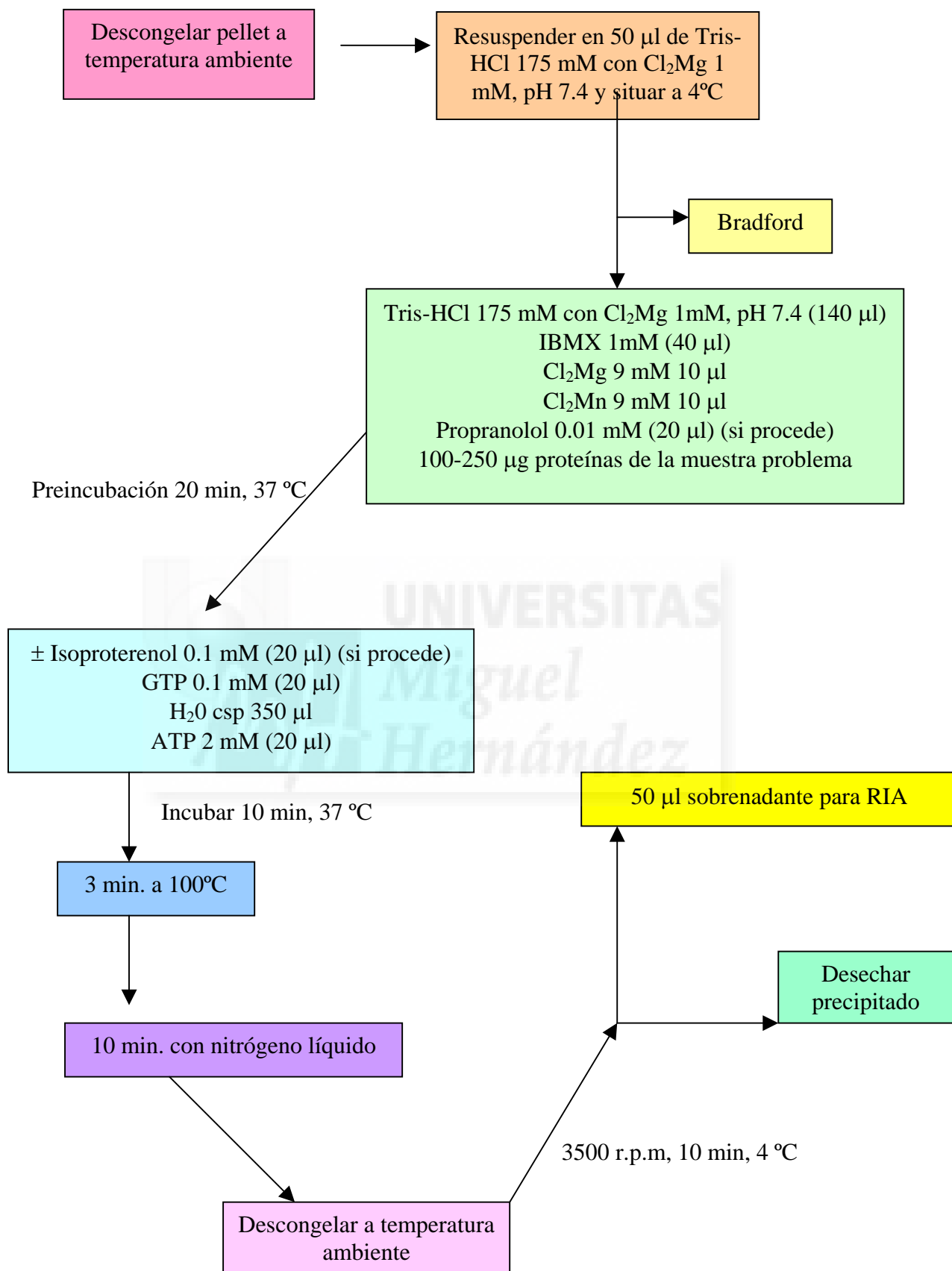


Figura 16. Preparación de las muestras para la obtención de AMPc.

### 2.5.3. Determinación del AMPc producido mediante RIA.

#### 2.5.3.1. Fundamento:

Este método se basa en la competición que se produce entre el AMPc de la muestra formado de novo a partir del ATP (AMPc frío no marcado), y una cantidad conocida de AMPc marcado con Tritio ( $^3\text{H}$ -AMPc) por unirse a una proteína sintética de fijación que posee una alta afinidad y especificidad por el AMPc. El AMPc, tanto marcado como no, que no se haya unido a la proteína de fijación, se elimina tras la incubación mediante la adición de carbón activo y posterior centrifugación. A continuación se determina la cantidad de  $^3\text{H}$ -AMPc unido a la proteína específica en un volumen fijo de sobrenadante, midiendo la actividad radiactiva de  $^3\text{H}$  (Beta) con un contador de centelleo líquido (Wallac 1100).

La concentración de AMPc sin marcar en la muestra problema (tubos de incubación de las membranas) se calcula mediante extrapolación del valor obtenido a una recta estándar elaborada cada día con concentraciones crecientes de AMPc frío y concentraciones constantes de  $^3\text{H}$ -AMPc, procesadas del mismo modo que las muestras problema.

La recta estándar nos permite por una parte calibrar y comprobar la actividad real en cada experimento individual, y por otra saber las cuentas por minuto (c.p.m) generadas en cada una de las muestras a estudiar. Estas c.p.m se correlacionan con una cantidad exacta de AMPc producido.

#### 2.5.3.2. Descripción del método (figura 17):

La recta estándar se forma con los siguientes puntos por duplicado:

1. Blanco, que sólo lleva Tris-EDTA y  $^3\text{H}$ -AMPc, sin proteína de fijación.
2. Controles de concentración cero (Co). Como estos tubos no contienen AMPc sin marcar, todo el  $^3\text{H}$ -AMPc se unirá a la proteína de fijación y por tanto el carbón activo no retirará  $^3\text{H}$ -AMPc, de manera que obtendremos el máximo valor de radiactividad final medida.

Los tubos de la recta estándar llevarán  $^3\text{H}$ -AMPc, proteína de fijación y AMPc estándar sin marcar, éste último en cantidades finales de 1, 2, 4, 8, 16 picomoles. Para preparar el tubo del que tomando 50  $\mu\text{l}$  se obtiene una cantidad final de 16 picomoles, se prepara una solución (320 picomoles/ml) disolviendo la cantidad liofilizada proporcionada por Amersham en 5 ml de agua destilada. Para preparar el tubo del que tomando 50  $\mu\text{l}$  se obtiene una cantidad final de 8 picomoles, se prepara una solución (160 picomoles/ml) mezclando 500  $\mu\text{l}$  de buffer Tris-EDTA y 500  $\mu\text{l}$  de la solución de 320 picomoles/ml. Para preparar el tubo del que tomando 50  $\mu\text{l}$  se obtiene una cantidad final de 4 picomoles, se prepara una solución (80 picomoles/ml) mezclando 500  $\mu\text{l}$  de buffer Tris-EDTA y 500  $\mu\text{l}$  de la solución de 160 picomoles/ml. Para preparar el tubo del que tomando 50  $\mu\text{l}$  se obtiene una cantidad final de 2 picomoles, se prepara una solución (40 picomoles/ml) mezclando 500  $\mu\text{l}$  de buffer Tris-EDTA y 500  $\mu\text{l}$  de la solución de 80 picomoles/ml. Para preparar el tubo del que tomando 50  $\mu\text{l}$  se obtiene una cantidad final de 1 picomoles, se prepara una solución (20 picomoles/ml) mezclando 500  $\mu\text{l}$  de buffer Tris-EDTA y 500  $\mu\text{l}$  de la solución de 40 picomoles/ml.

3. La reacción da comienzo cuando añadimos la proteína específica de fijación y agitamos en el vortex durante 5 segundos.
4. Dejar los tubos durante 2 horas en hielo para que tenga lugar la fijación competitiva.
5. Añadir 100  $\mu$ l de carbón activo a cada uno de los tubos con el fin de adsorber el AMPc que no se haya unido a la proteína, ya sea marcado o no.
6. Agitar brevemente en el vórtex y esperar 1 min.
7. Centrifugar a 10.000 r.p.m durante 2 min a 4 °C en una microfuga Biofuge 15 de Heraeus. Este paso lo efectuamos en series de 6 tubos, puesto que después de 6 minutos de haber añadido el carbón activado se comienza a desprender del mismo el material adsorbido, alterando la valoración del resultado. Por tanto, desde que añadimos el carbón activo hasta que se retira el sobrenadante no deben pasar más de 6 min.
8. Se retiran 150  $\mu$ l de cada tubo con mucho cuidado para no tomar parte de carbón activo y se sitúa en viales con 5 ml de líquido de centelleo (Beckman).
9. El contaje se lleva a cabo en un contador de centelleo Wallac 1100 para radiación beta, durante 1 minuto. El contador registra las emisiones radiactivas en forma de “cuentas” que corresponden a las señales de desintegración del tritio.
10. El resultado se expresa en cuentas por minuto (c.p.m), de tal forma que aplicando la relación establecida al construir la recta estándar, se establece que: una mayor cantidad de c.p.m, significa la presencia en la muestra de más  $^3\text{H}$ -AMPc unido a la proteína de fijación y por tanto de menos AMPc frío fijado, lo que implica menos AMPc frío libre en la muestra y viceversa, una menor cifra de c.p.m nos indica una mayor cantidad de AMPc libre producido durante la incubación en presencia de ATP.

Cantidad final	Tubo	Tris/EDTA	Estándar	Muestras	<sup>3</sup> H- AMPc	Proteína
<b>Blanco</b>	1	150 µl			50 µl	
<b>Blanco</b>	2	150 µl			50 µl	
<b>0 pmol</b>	3	50 µl			50 µl	100 µl
<b>0 pmol</b>	4	50 µl			50 µl	100 µl
<b>1 pmol</b>	5		50 µl de solución 20 pmol/ml		50 µl	100 µl
<b>1 pmol</b>	6		50 µl de solución 20 pmol/ml		50 µl	100 µl
<b>2 pmol</b>	7		50 µl de solución 40 pmol/ml		50 µl	100 µl
<b>2 pmol</b>	8		50 µl de solución 40 pmol/ml		50 µl	100 µl
<b>4 pmol</b>	9		50 µl de solución 80 pmol/ml		50 µl	100 µl
<b>4 pmol</b>	10		50 µl de solución 80 pmol/ml		50 µl	100 µl
<b>8 pmol</b>	11		50 µl de solución 160 pmol/ml		50 µl	100 µl
<b>8 pmol</b>	12		50 µl de solución 160 pmol/ml		50 µl	100 µl
<b>16 pmol</b>	13		50 µl de solución 320 pmol/ml		50 µl	100 µl
<b>16 pmol</b>	14		50 µl de solución 320 pmol/ml		50 µl	100 µl
<b>Muestras problema</b>	15			50 µl	50 µl	100 µl
<b>Muestras problema</b>	16			50 µl	50 µl	100 µl

La reacción comienza cuando añadimos la proteína y agitamos 5 segundos en el vórtex

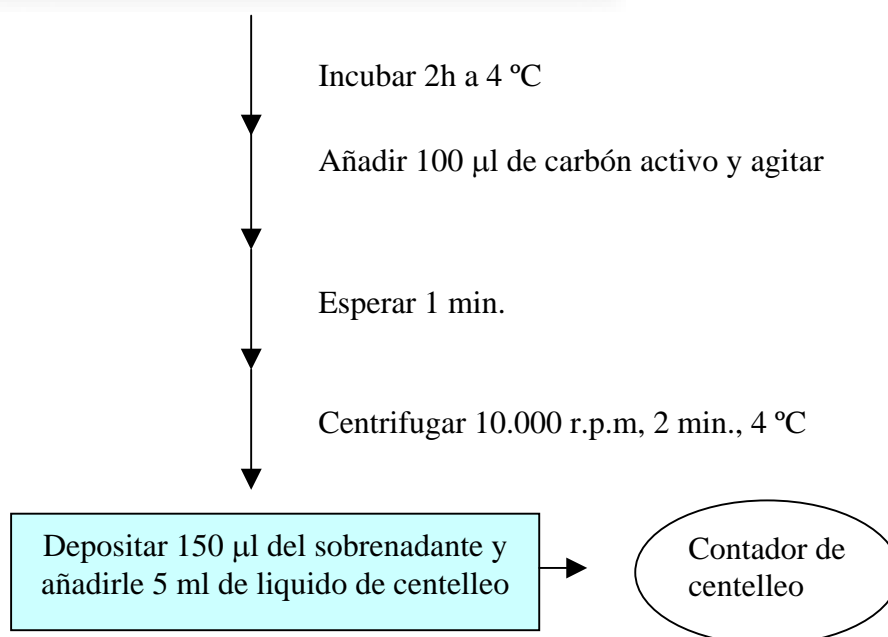
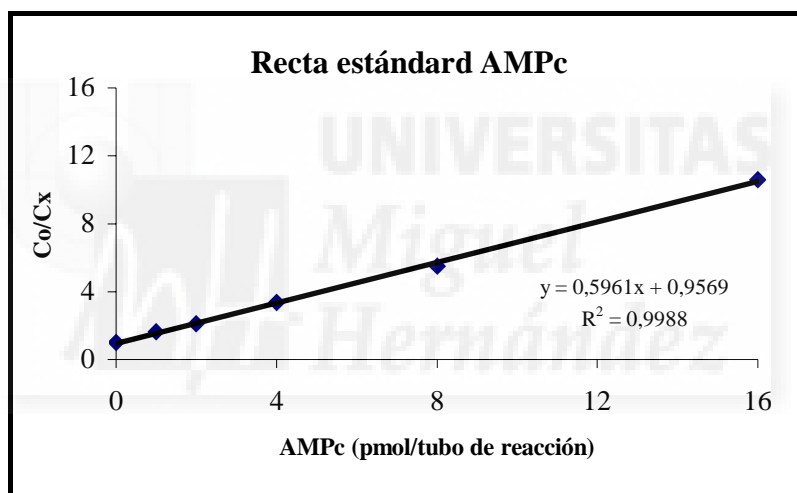


Figura 17. Protocolo para la determinación de AMPc por radioinmunoanálisis (RIA).

### 2.5.3.3. Cálculo del AMPc producido.

Primero realizamos los cálculos correspondientes a la recta estándar:

1. Se determinan las c.p.m del blanco. Es decir, la actividad basal de fondo en nuestro ensayo. Corresponde a la media de las c.p.m de los tubos 1 y 2.
2. Se calcula la actividad máxima (c.p.m) correspondiente al máximo de  $^3\text{H}$ -AMPc unido en ausencia de AMPc ( $C_0$ ) (media aritmética de las c.p.m de los tubos 3 y 4 menos las c.p.m del blanco).
3. Se calcula la media (en c.p.m) de cada par de tubos con los estándares de AMPc conocido y se resta del blanco, y así obtenemos la cantidad neta de  $^3\text{H}$ -AMPc unido en presencia de la cantidad conocida de AMPc ( $C_x$ ).
4. Se calcula el cociente  $C_0/C_x$ , es decir: la relación de las c.p.m obtenidas en presencia de AMPc frío conocido, respecto a las obtenidas en ausencia de AMPc frío estándar (1, 2, 4, 8, 16 pmol).
5. Se construye una representación gráfica que tenga por eje de abcisas a la cantidad en pmoles de AMPc frío puesto en los tubos estándar, y en ordenadas la relación  $C_0/C_x$ .



Recta estándar típica de AMPc, en la que se muestra la relación  $C_0/C_x$  frente a la cantidad de AMPc contenido en cada tubo. La línea recta intercepta las ordenadas en el valor 0.9569. Para un valor determinado de  $C_0/C_x$  ( $y$ ) es fácil determinar el número de pmoles de AMPc frío en el tubo de ensayo ( $x$ ).

Como es una relación lineal, se puede expresar mediante la ecuación de una recta:  $y = a + bx$

Donde:  $y$  = valor de la ordenada  $C_0/C_x$ .

$x$  = valor de la abcisa (pmoles de AMPc frío en el tubo de ensayo).

$a$  = valor de la ordenada en el origen, para  $X = 0$ .

$b$  = pendiente de la recta.

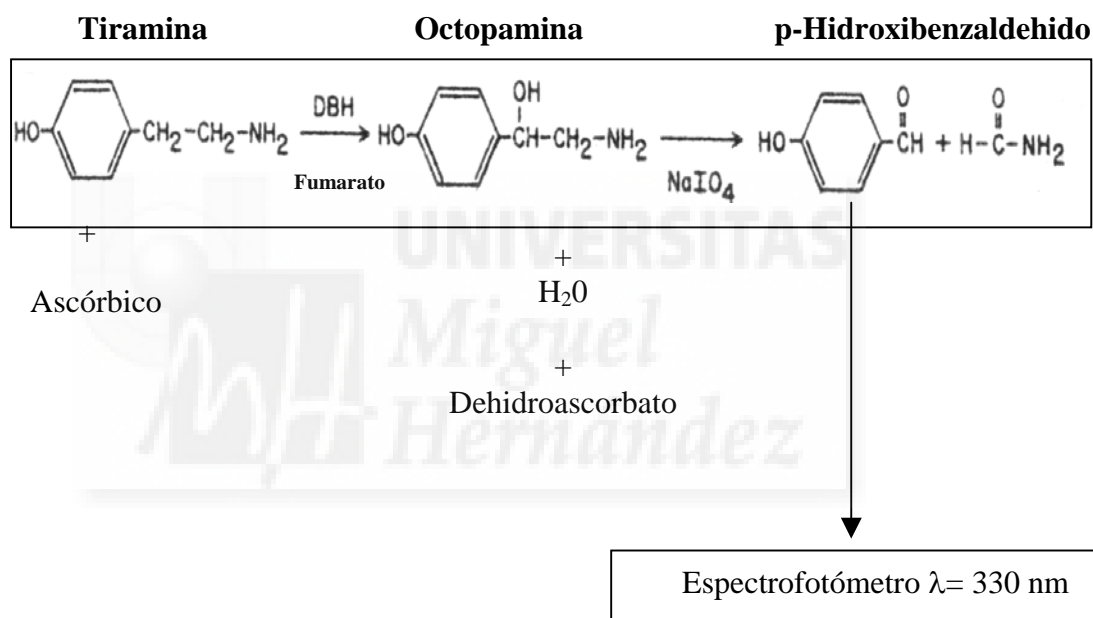
6. Conociendo las c.p.m producidas por nuestras muestras, y siguiendo los pasos descritos para la construcción de la curva estándar, calculamos todas las  $C_0/C_x$  de las muestras (y).
7. Aplicando la relación obtenida en la recta estándar ( $y = a + bx$ ), calculamos fácilmente la cantidad de AMPc frío en el tubo de ensayo (x).
8. Puesto que los picomoles calculados corresponden a 50  $\mu$ l de muestra y el volumen final de incubación es de 350  $\mu$ l (7 veces mayor), los pmoles calculados se multiplican por 7, estimándose de esta forma los pmoles de AMPc reales por tubo existentes al final de la incubación, es decir, producidos durante la incubación.
9. Expresar el resultado final en pmoles AMPc formados/mg proteína /minutos de incubación. La cuantificación de AMPc se midió en cada muestra sanguínea bajo condiciones basales, después de la administración del agonista beta adrenérgico isoproterenol (0.1 mM) y en presencia del antagonista beta adrenérgico propranolol (0.01 mM). Normalizamos la cantidad de AMPc producido en función de la cantidad de membrana existente en cada tubo (mg de proteína) y el tiempo de incubación (10 minutos).
10. Se utilizan además las siguientes variables calculadas a partir de los datos experimentales obtenidos:
  - a. Estímulo relativo del isoproterenol: incremento en la producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M respecto a la producción de AMPc en condiciones basales. Se calcula mediante la expresión: (AMPc tras isoproterenol-AMPc basal)/AMPc basal y se expresa en tanto por 1.
  - b. Estímulo absoluto del isoproterenol: incremento neto en la producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M. Se calcula mediante la expresión: (AMPc tras isoproterenol-AMPc basal) y se expresa en pmol AMPc/mg proteína/10 min.
  - c. Bloqueo relativo del propranolol: descenso en la producción de AMPc tras el bloqueo con propranolol  $10^{-5}$  M respecto al estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M. Se calcula mediante la expresión: (AMPc tras propranolol-AMPc tras isoproterenol)/AMPc tras isoproterenol y se expresa en tanto por 1.
  - d. Bloqueo absoluto del propranolol: descenso en la producción de AMPc tras el bloqueo con propranolol  $10^{-5}$  M después del estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M. Se calcula mediante la expresión: (AMPc tras propranolol  $10^{-5}$  M-AMPc tras isoproterenol  $10^{-4}$  M) y se expresa en pmol AMPc/mg proteína/10 min.



### 3. ENSAYO FOTOMÉTRICO DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA DOPAMINA-BETA-HIDROXILASA (DBH) EN SUERO HUMANO:

#### 3.1. INTRODUCCIÓN.

Se ha seguido el método espectrofotométrico de Nagatsu y Udenfriend (1972) ya que es un procedimiento simple, rápido y sensible para determinar la actividad de la DBH. Este ensayo está basado en la conversión enzimática de tiramina a octopamina (1-(p-hidroxifenil)-2-aminoetanol), la cual es luego oxidada a p-hidroxibenzaldehído que se cuantifica por espectrofotometría a 330 nm. La oxidación se detiene mediante la adición de metabisulfito sódico.



La actividad de la DBH se puede determinar bien en plasma, siempre que se haya recogido utilizando heparina como anticoagulante, o en suero. Con un volumen de 25  $\mu\text{l}$  es suficiente. Esta actividad enzimática es bastante estable y las muestras pueden ser almacenadas en la nevera o congelador durante periodos de tiempo considerables (congeladas a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  durante al menos 3 meses).

#### 3.2. SOLUCIONES DE TRABAJO:

1. Buffer acetato sódico 1 M pH 5 (ajustado con ácido acético glacial). Se almacena refrigerado (Sigma: A6283) (8.2 g/100ml  $\text{H}_2\text{O}$ ). Es necesario para trabajar en condiciones de pH 5 donde se ha visto que la actividad enzimática de DBH es 3 veces más activa que a pH 6.2 (utilizado por Weinshilboun y Axelrod, 1971A) y 20 % más activa que a pH 5.5 (utilizado por Goldstein y cols, 1971).

2. Fumarato sódico 0.2 M; ajustar a pH 5 con ácido acético glacial. Almacenar congelado. (3.2 g/100 ml H<sub>2</sub>O, Sigma: F1506). Actúa como cofactor en la transformación de tiramina a octopamina por DBH.
3. L-ascórbico 0.2 M. Almacenar congelado a -20 °C. (Sigma: A0278, 0.35 g/10 ml H<sub>2</sub>O). Actúa como cofactor en la transformación de tiramina a octopamina por DBH.
4. Pargilina HCl 0.02 M. Almacenar refrigerado. (Sigma: P8013, 0.039 g/10ml H<sub>2</sub>O). Es un inhibidor de la enzima monoamino oxidasa (MAO). Esta enzima convierte las catecolaminas en sus aldehidos correspondientes que, en la periferia, son metabolizados rápidamente por la aldehido deshidrogenasa. Se utiliza para evitar el metabolismo de tiramina por MAO.
5. N-etil-maleimida 0.2 M. Almacenar congelado a -20 °C. (Sigma: E3876, 0.250 g/10 ml H<sub>2</sub>O). Actúa como agente quelante de iones que inhiben la actividad de DBH.
6. Catalasa de hígado bovino (30.000 U/ml H<sub>2</sub>O). Almacenar la suspensión refrigerada antes de la dilución el día del ensayo (Sigma: C100). Protege a la DBH frente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
7. Tiramina HCl 0.2 M. Almacenar congelado o preparar cada semana y mantener refrigerado. (Sigma: T2879, 0.694 g/20 ml H<sub>2</sub>O). Se emplea como sustrato para la DBH.
8. NH<sub>4</sub>OH 4 N. Preparar una vez a la semana y mantener refrigerado. (Sigma: A6899 ; 26 ml/100 ml H<sub>2</sub>O).
9. NaIO<sub>4</sub> 2 % (2 g/100 ml H<sub>2</sub>O). Almacenar refrigerado. (Sigma: S1878). Produce oxidación de la octopamina en p-hidroxibenzaldehido.
10. Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 10 % (10 g/100ml H<sub>2</sub>O). Almacenar refrigerado.(Sigma: S1516). Actúa reduciendo el exceso de NaIO<sub>4</sub>.
11. Ácido perclórico 20 % (PCA): (Scharlau Ac1753). Se utiliza para detener todas las reacciones enzimáticas.
12. Preparación curva de octopamina: se pesan 0.0019 g de octopamina (Sigma: O-0250) y se diluyen en 1 ml de agua dando lugar a una solución 10 milimolar (mM). El resto de puntos de la recta lo integran los siguientes nanomoles finales: 0.092, 0.078, 0.065, 0.052, 0.039, 0.026 y 0 nmoles. En la tabla 6 se exponen las concentraciones de octopamina expresadas en mM a que corresponden estos nanomoles finales.

Concentración octopamina (mM)	nmoles /25 µl
3.68	0.092
3.12	0.078
2.6	0.065
2.08	0.052
1.56	0.039
1.04	0.026
0	0

**Tabla 6.** Relación entre los nmoles de octopamina finales que integran la recta estándar y la concentración a la que corresponden.

13. Mezcla de reacción (ejemplo para 24 muestras):

- 6 ml de acetato sódico pH 5.
- 1.5 ml de fumarato 0.2 M.
- 1.5 ml ascorbato 0.2 M.
- 1.5 ml pargilina 0.02 M.
- 4.5 ml de N-Etil-Maleimida 0.2 M.
- 3 ml de catalasa. (200  $\mu$ l + 4800  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O).
- 6 ml de agua.

Esta mezcla se prepara justo el día del análisis a temperatura ambiente y no se almacena para un posterior uso.

14. Preparación de las resinas de intercambio iónico Dowex 50w 4-400 (200-400 mesh) (Referencia: Aldrich 21, 748-4) y soporte de pipeta pasteur de vidrio con lana de vidrio: se sitúa en un vaso de precipitado una determinada cantidad de resina Dowex (3 ó 4 cucharadas) en función de los requerimientos. Se le añaden unos 5 ml de NaOH 1M, se remueve y se vierte sobre un embudo Buchner que contiene papel de filtro. Se espera a que toda la sosa atraviese la resina y el papel de filtro. Se vierte tanta sosa como sea necesaria sobre la resina hasta alcanzar un pH de 12-13 en el eluyente. Se utilizarán por tanto, tiras reactivas de pH para ir comprobando el mismo. Una vez alcanzado el pH básico, se vierte la cantidad de agua necesaria sobre la resina para que el pH del eluyente alcance un valor de 5-6. Cuando se comprueba que el pH es el adecuado, se añade HCl 1 M en cantidad suficiente para alcanzar un pH de 1. Una vez se tiene la seguridad de que el pH del eluyente es 1, se vuelve a añadir sobre la resina la cantidad de agua necesaria hasta alcanzar un pH de 5-6. Estos cambios de pH son necesarios para la activación de los radicales que componen la resina de intercambio iónico. Después se retira la resina del papel del filtro utilizando una espátula y se diluye a partes iguales con agua y se mantiene refrigerada a 4 °C hasta su uso.

Por otro lado hay que adaptar pipetas Pasteur de vidrio de 150 mm a las que se introduce en la parte inferior 1 cm de lana de vidrio. Una vez tenemos preparadas las pipetas con la lana de vidrio, se le añade 400  $\mu$ l de la mezcla de Dowex y agua y el sistema estará en condiciones para ser utilizado.

Las columnas Dowex-50 pequeñas pueden ser regeneradas después del ensayo lavándolas con 2 ml de agua dos veces, y luego con 2 ml de HCl 5 M y 2ml de agua dos veces de nuevo.

### **3.3. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO ENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA DBH (FIGURA 18):**

1. Se pipetea 800  $\mu$ l de la mezcla de reacción en tubos de plástico de centrífuga.
2. Para la preparación de la muestra problema se añade un volumen apropiado de plasma o suero humano (25  $\mu$ l).
3. Para el blanco se añaden 25  $\mu$ l de una concentración 0 nmol de octopamina, además de la mezcla inicial.

4. Para preparar la recta estándar de octopamina se añaden 25  $\mu\text{l}$  de las concentraciones preparadas para alcanzar las siguientes concentraciones finales: 0.026, 0.039, 0.052, 0.065, 0.078, 0.092 nmoles de octopamina.
5. Añadir 100  $\mu\text{l}$  de tiramina 0.2 M a todos los tubos incluyendo los de las muestras problema, los del blanco y los de la recta de octopamina y se mezcla agitando en el vórtex 1 s.
6. Incubar 60 min. a 37 °C en un baño con agitación.
7. Detener la reacción con 200  $\mu\text{l}$  de PCA 20 % y agitar en vórtex 5 s.
8. Centrifugar durante 20 min. a 3500 r.p.m y a temperatura ambiente para precipitar proteínas (centrífuga Beckman GS-6R).
9. Añadir el sobrenadante a una pipeta Pasteur de vidrio que contiene lana de vidrio y Dowex 50 W (forma protonada, 1 cm) equivalente a 400  $\mu\text{l}$  de pasta de Dowex (50:50 dowex y agua).
10. Lavar la columna pasando 1 ml de agua 2 veces.
11. La octopamina fijada a la resina Dowex se eluye al añadir 1ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  4 N. Este proceso se realiza 2 veces. La octopamina eluida se recoge en tubos de vidrio.
12. A los 2 ml de eluato se le añaden 200  $\mu\text{l}$  de  $\text{NaIO}_4$  2 % para que se produzca oxidación de la octopamina a p-hidroxibenzaldehído y se agita en vórtex.
13. Después de exactamente 6 min., se añaden 200  $\mu\text{l}$  de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  y se agita en vórtex.
14. Leer la absorbancia a 330 nm después de 2 min. y antes de 3h.

Al valor de absorbancia de cada muestra problema o de la recta estándar se le resta el valor de absorbancia del blanco. Este valor de absorbancia neta se interpola en una recta donde en el eje de abcisas se sitúan las diferentes concentraciones de octopamina y en el eje de ordenadas los valores netos de absorbancia de cada una de las concentraciones que integran la recta.

#### 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Los datos cuantitativos se representaron como media  $\pm$  desviación estándar ( $\bar{X} \pm Ds$ ). En las figuras la desviación estándar de los datos se indica por barras. Las diferencias entre grupos se analizaron usando el test no paramétrico de la U-de Mann-Whitney. El test de Wilcoxon se usó para analizar diferencias entre datos pareados. Las variables cualitativas se expresaron como frecuencia o porcentaje y las diferencias entre grupos se evaluaron usando el test de  $\chi^2$  con la corrección de Yates cuando se precisó. Las correlaciones entre variables se evaluaron utilizando el test de correlaciones bivariadas de Pearson. Valores de  $P < 0.05$  indican significación estadística. Las correlaciones que resultaron significativas se evaluaron gráficamente valorándose como irrelevantes si la correlación es a expensas de un número reducido de puntos ( $< 10\%$  de la muestra) y como relevante en caso contrario. El programa estadístico utilizado fue el SPSS 10.0.

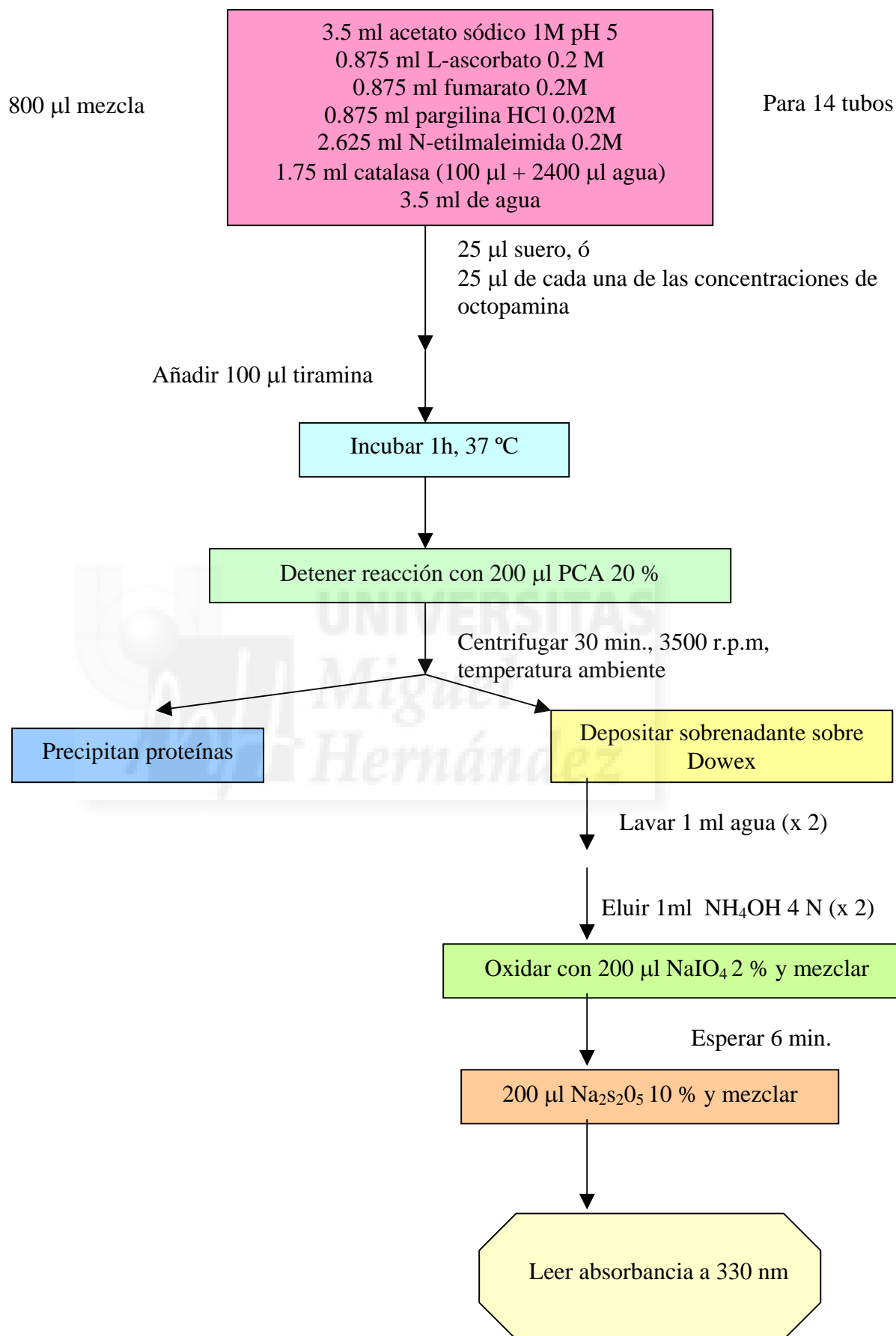


Figura 18. Protocolo para el ensayo de la actividad de la dopamina-beta-hidroxilasa.

**ANEXO :**

**COPIA DE LA APROBACIÓN POR EL COMITÉ  
ÉTICO PARA LA INVESTIGACIÓN CLÍNICA (CEIC).**





Hospital General  
Universitario de Alicante y  
Centro de Especialidades Babel

### INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Reunidos los miembros del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital General Universitario de Alicante, en su sesión del día 11 de Octubre de 2000, y una vez estudiada la documentación presentada por el Dr. José María Palazón Azorín, Médico Adjunto de la Unidad Hepática del Hospital General Universitario de Alicante, tiene bien a informar que el proyecto de investigación titulado: **“Estudio de la actividad de los receptores beta-2 del hematíe tras la administración de los pautas de propranolol, en pacientes con cirrosis hepática e hipertensión portal, y su relación con la respuesta hemodinámica y clínica”**, se ajusta a las normas deontológicas establecidas para tales casos.

Y para que conste lo firma en Alicante con fecha de once de Octubre del dos mil.

Fdo. Enrique Batlle Gualda  
SECRETARIO DEL C.E.I.C



## **RESULTADOS**

---



# 1. VALIDACIÓN DE LAS TÉCNICAS:

## 1.1. MEDIDA DE PROTEÍNAS ( TÉCNICA DE BRADFORD):

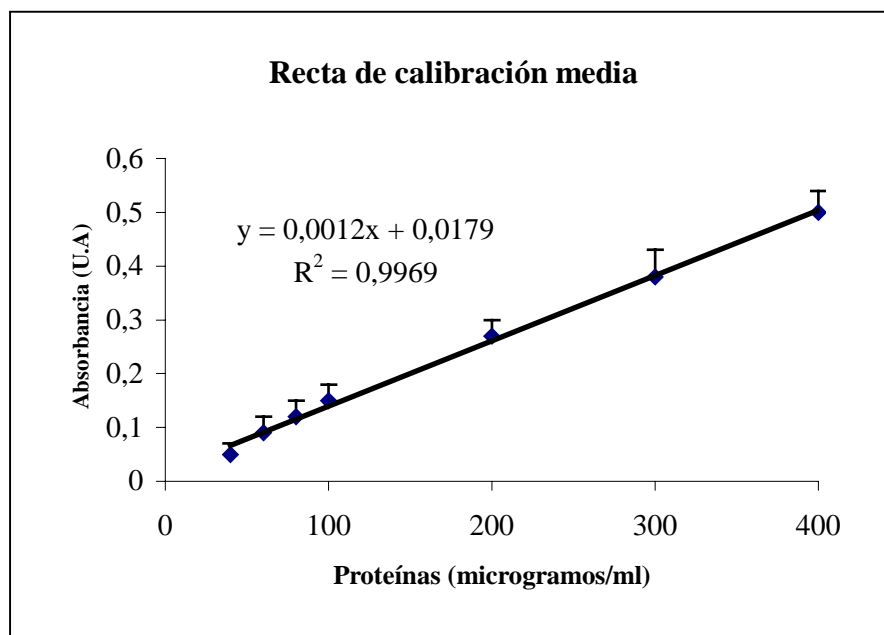
Se han realizado un total de 23 rectas de calibración del método de Bradford para la determinación de proteínas en distintas fechas. Los valores de absorbancia para cada concentración de albúmina medida se recogen en la tabla 7.

Fecha/Abs	Concentración de albúmina							Ecuación	R <sup>2</sup>
	40 µg/ml	60 µg/ml	80 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml	300 µg/ml	400 µg/ml		
01/03/2002				0,15	0,27	0,43	0,49	Y = 0,0012X + 0,0174	0,98
12/03/2002				0,16	0,27	0,34	0,45	Y = 0,0011X + 0,0288	0,98
20/03/2002				0,20	0,26	0,38	0,46	Y = 0,0011X + 0,038	0,96
22/03/2002				0,12	0,26	0,33	0,47	Y = 0,0011X + 0,048	0,99
03/04/2002				0,13	0,24	0,37	0,52	Y = 0,0012X - 0,001	1,00
08/04/2002				0,13	0,28	0,41	0,47	Y = 0,0012X + 0,0136	0,98
10/04/2002				0,15	0,25	0,38	0,50	Y = 0,0012X + 0,0110	1,00
05/06/2002				0,11	0,18	0,32	0,56	Y = 0,0013X - 0,0316	0,95
06/06/2002	0,04	0,07		0,14	0,29	0,41	0,53	Y = 0,0013X - 0,0023	1,00
14/06/2002	0,04	0,07	0,10	0,18	0,29	0,44	0,57	Y = 0,0015X - 0,0080	0,99
25/06/2002	0,04		0,09	0,14	0,27	0,39	0,52	Y = 0,0013X - 0,0044	1,00
28/06/2002	0,04	0,09	0,11	0,15	0,30	0,44	0,56	Y = 0,0014X - 0,0012	1,00
01/07/2002	0,04	0,06	0,09	0,13	0,27	0,40	0,51	Y = 0,0013X + 0,010	1,00
26/07/2002	0,02	0,03	0,06	0,11	0,23	0,37	0,50	Y = 0,0013X - 0,027	1,00
03/10/2002	0,10	0,15	0,20	0,22	0,35	0,48	0,54	Y = 0,0013X + 0,063	0,96
14/11/2002	0,04	0,07	0,11	0,16	0,31	0,37	0,49	Y = 0,0012X + 0,0113	0,98
19/12/2002	0,06	0,11	0,14	0,16	0,28	0,37	0,50	Y = 0,0012X + 0,020	0,99
20/12/2002	0,08	0,13	0,15	0,18	0,28	0,39	0,50	Y = 0,0019X + 0,037	0,99
13/02/2003	0,04	0,08	0,11	0,14	0,22	0,28	0,38	Y = 0,0009X + 0,0149	0,96
08/07/2003	0,08	0,10	0,14	0,17	0,25	0,40	0,48	Y = 0,0012X + 0,026	0,98
09/07/2003	0,08	0,09	0,13	0,16	0,28	0,40	0,51	Y = 0,0012X + 0,0198	0,99
05/11/2003	0,02	0,09	0,10	0,11	0,29	0,31	0,45	Y = 0,0011X + 0,0012	0,96
11/12/2003	0,05	0,09	0,12	0,14	0,28	0,37	0,46	Y = 0,0011X + 0,015	0,98
Media	0,05	0,09	0,12	0,15	0,27	0,38	0,50		0,98
Desv.Estand.	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	0,05	0,04		0,01
CV (%)	47,85	33,94	28,50	18,78	12,37	11,79	8,68		1,47

**Tabla 7.** Valores de absorbancia para cada concentración de albúmina de la recta de calibración del método de Bradford. Cada valor de absorbancia indicado en la tabla es el valor medio resultante de medir cada muestra por duplicado.

### 1.1.1. Recta estándar media:

En la figura 19 se muestra la recta de calibración media con las diferentes concentraciones de albúmina (µg/ml) en el eje de abcisas y las absorbancias (UA) en el eje de ordenadas. Los datos son los valores medios  $\pm$  desviación estándar ( $\bar{X} \pm Ds$ ) (n = 23).



**Figura 19.** Recta de calibración media de la técnica de Bradford.

### 1.1.2 Variabilidad interdía:

Para cada concentración de albúmina de la recta de calibración media se calculó la media ( $\bar{X}$ ), desviación estándar ( $D_s$ ) y coeficiente de variación ( $CV$ ) de los 23 días de medida. Se puede apreciar en la tabla 8 que la variabilidad entre los diferentes días de estudio oscila entre un 9-48%.

Concentración de albúmina ( $\mu\text{g/ml}$ )	$\bar{X}$ Absorbancias	$D_s$	$CV$ (%)	n
40	0,05	0,02	48	15
60	0,09	0,03	34	14
80	0,12	0,03	29	14
100	0,15	0,03	19	23
200	0,27	0,03	12	23
300	0,38	0,05	12	23
400	0,5	0,04	9	23

**Tabla 8.** Variabilidad interdía de la técnica de Bradford.

### 1.1.3. Variabilidad intradía:

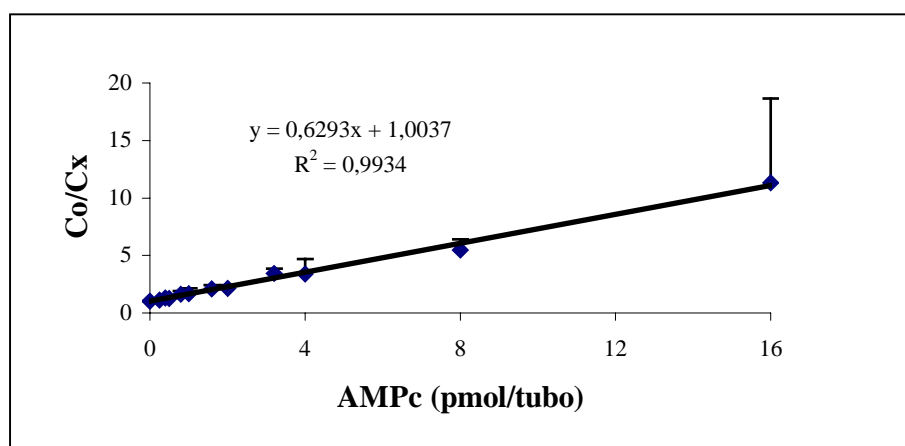
Cada punto de las respectivas rectas se midió por duplicado. A continuación (tabla 9) se detallan cada uno de los CV de estas medidas pudiendo observarse que la variabilidad media en la medida de los duplicados de cada día no supera en ningún caso el 25%.

Fecha	CV 40 µg/ml	CV 60 µg/ml	CV 80 µg/ml	CV 100 µg/ml	CV 200 µg/ml	CV 300 µg/ml	CV 400 µg/ml	$\bar{X} \pm Ds$
20/03/2002				2,18	5,64	0,56	9,14	4,38 ± 3,82
22/03/2002				37,35	2,74	2,97	1,52	11,15 ± 17,48
03/04/2002				28,5	13,7	1,73	2,33	11,57 ± 12,56
08/04/2002				36,3	6,88	7,46	0,15	12,70 ± 16,08
10/04/2002				3,27	10	4,05	4,42	5,44 ± 3,08
05/06/2002				27,2	16,09	14,62	6,22	16,03 ± 8,62
06/06/2002	22,5	9,29		6,87	14,73	9,15	8,82	11,89 ± 5,82
14/06/2002	16,53	18,3	1,37	4,77	11,54	5,89	2,48	8,70 ± 6,80
25/06/2002	1,84		0,8	10,88	4,14	1,63	0,41	3,28 ± 3,94
28/06/2002	25,71	1,55	9,08	2,36	0,71	2,23	3,05	6,38 ± 8,95
01/07/2002	21,91		3,29	8,13	0,79	3,5	8,71	7,72 ± 7,59
26/07/2002	3,63	7,19	39,5	25,48	1,55	3,8	9,98	13,02 ± 14,17
03/10/2002	3,45	26,37	2,14	3,82	2,23	1,63	1,17	5,83 ± 9,11
14/11/2002	26,19	10,88	8,76	17,57	6,41	3,6	7,19	11,51 ± 7,83
19/12/2002		0,66		1,36	2,26	0,38	0,14	0,96 ± 0,86
20/12/2002	6,07	13,65	1,46	1,57	3,5	3,6	1,41	4,47 ± 4,38
13/02/2003	53,78			43,17		1	0,56	24,63 ± 27,88
08/07/2003	9,2	14,43	16,76	0,83	3,07	6,32	4,23	7,83 ± 5,95
09/07/2003	0	3,82	12,06	3,05	9,26	0,18	6,35	4,96 ± 4,53
05/11/2003	5,89	60,14	29,14	3,14	9,14	8,67	5,39	17,36 ± 20,77
11/12/2003	6,29	12,3	49,41	17,55	11,58	1,91	4,94	14,85 ± 16,11

**Tabla 9.** Variabilidad intradía de la técnica de Bradford.

### 1.2. MEDIDA DE AMPc:

Se han realizado un total de 36 rectas estándar de AMPc. En la figura 20 se muestran los valores medios  $\pm$  Ds de las concentraciones de AMPc medidas (0, 0.25, 0.4, 0.5, 0.8, 1, 1.6, 2, 3.2, 4, 8, 16). La  $R^2$  media de las 36 rectas fue en todos los casos superior a 0.95. (Intervalo de confianza-IC- del 95% entre 0.953 y 1.003).



**Figura 20.** Valores medios de las rectas estándares de AMPc. Los datos indican los valores  $Co/Cx$  medios  $\pm$  Ds de 36 medidas.

### 1.2.1. Variabilidad interdía:

Para cada concentración de AMPc incluida en la recta de calibración, se ha calculado el valor medio, la Ds y CV del cociente Co/Cx de las 36 determinaciones efectuadas en los diferentes días. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 10 en la que se puede apreciar que la variabilidad entre los diferentes días de estudio oscila entre un 6 y un 27% para la mayoría de las concentraciones excepto en el caso de las concentraciones de 4 y 16 picomoles de AMPc que mostraron una variabilidad interdía superior.

pmol AMPc	Media Co/Cx	Desviación Estándar	CV (%)	n
0,25	1,11	0,14	13	2
0,4	1,31	0,13	10	12
0,5	1,25	0,07	6	5
0,8	1,64	0,24	14	11
1	1,66	0,46	27	13
1,6	2,1	0,33	16	18
2	2,15	0,28	13	16
3,2	3,43	0,4	12	5
4	3,37	1,32	39	13
8	5,47	0,95	17	11
16	11,31	7,33	65	21

**Tabla 10.** Variabilidad interdía de los valores de AMPc.

### 1.2.2. Variabilidad intradía:

En 13 de las rectas de calibración se midió cada punto por duplicado. A continuación se detallan (tabla 11) para cada una de estas rectas de calibración el CV de las 2 medidas de cada punto. La variabilidad media expresada como  $\bar{X} \pm Ds$  es del  $11.5 \pm 9.6\%$  con un intervalo de confianza del 95% (IC 95%) comprendido entre 6-17%.

Fecha curva	CV 0 pmol	CV 0,25 pmol	CV 0,4 pmol	CV 0,5 pmol	CV 0,8 pmol	CV 1 pmol	CV 1,6 pmol	CV 2 pmol	CV 3,2 pmol	CV 4 pmol	CV 8 pmol	CV 16 pmol	$\bar{X} \pm Ds$
04/07/2001	30,91					8,49		37,01		20,65	11,08	23,85	22,00 ± 11.06
13/09/2001	23,85					18,27		31,1				79,62	38,21 ± 28.10
26/09/2001	8,97					3,23		14,18		15,25	19,21	8,95	11,63 ± 5.69
10/10/2001	11,73					6,6		9,75		7,94	17,31	34,64	14,66 ± 10.48
16/10/2001	3,15					3,13				10,88		15,83	8,25 ± 6.23
24/10/2001	16,29					1,58		10,18		0,77	6,94	11,44	7,87 ± 6.00
02/11/2001	0,97					7,38		2,45		2,06	1,23	17,41	5,25 ± 6.40
05/11/2001	3,65							1,03			10,51		5,06 ± 4.90
16/11/2001	0,76							23,29			1,23		8,43 ± 12.87
26/11/2001	7,7							15,05			9,92	26,17	14,71 ± 8.24
09/04/2002	5,4						4,35						4,88 ± 0.74
26/07/2002	4,49		1,98		4,58		6,08					2,29	3,88 ± 1.72
12/12/2003	0,08	1,74	1,68		7,26		3,13					13,78	4,61 ± 5.11
													$\bar{X} \pm Ds$
													11.5 ± 9.6
													IC 95%
													(6-17)

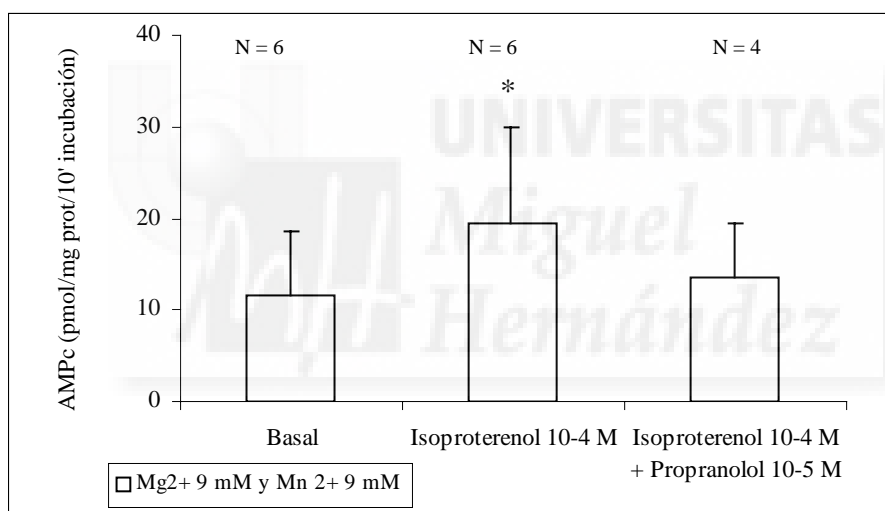
**Tabla 11.** Variabilidad intradía de los valores de AMPc.

### 1.2.3. Influencia de las condiciones experimentales sobre la medida de AMPc:

#### 1.2.3.1. Producción de AMPc en presencia de $Mn^{2+}$ 9 mM, $Mg^{2+}$ 9 mM, ATP 2 mM, IBMX 1 mM y 10 minutos de incubación:

Se adoptaron como condiciones estándar para la medición de la cantidad de AMPc producida por membranas de hematíes humanos adultos las efectuadas en presencia de  $Mn^{2+}$  9 mM,  $Mg^{2+}$  9mM, ATP 2 mM, IBMX 1 mM y 10 minutos de incubación, de acuerdo con trabajos previos (Gauger y cols, 1975; Hirata y cols, 1979; Horga y cols, 2000). Bajo estas condiciones se evaluaron 6 muestras de sangre obtenidas de 6 individuos sanos.

En estos experimentos se obtuvo un valor basal de  $11.53 \pm 7.02$  pmol AMPc/mg prot/10 min incubación ( $n = 6$ ) que aumentó de manera significativa ( $P = 0.028$ ) hasta  $19.40 \pm 10.64$  pmol AMPc/mg prot/10 min incubación ( $n = 6$ ) tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M. Este estímulo se redujo en presencia de propranolol  $10^{-5}$  M a  $13.48 \pm 6.07$  pmol AMPc/mg prot/10 min incubación ( $n = 4$ ). Estos resultados se representan en la figura 21.



**Figura 21.** Producción basal de AMPc en membranas de hematíes de individuos sanos bajo condiciones estándares de trabajo.\*  $P < 0.05$  comparado con el valor basal.

#### 1.2.3.2. Composición celular de las muestras:

Se comprobó la eficacia de los procedimientos de separación de nuestro método contabilizando la cantidad de elementos celulares que se obtienen en cada uno de los pasos del procedimiento:

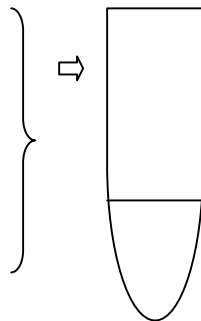
1. Centrifugación de la muestra de sangre (en tubos con EDTA) a 500 r.p.m durante 5 min. con objeto de separar el plasma y el mayor número de plaquetas posible (tubo 1).
2. Realización del gradiente de Ficoll como previamente se ha descrito para separar linfocitos (tubo 2).
3. 3 lavados sucesivos a 1000 r.p.m durante 10 min. con suero fisiológico para eliminar los restos de Ficoll y separar una interfase donde abundan los leucocitos y hematíes (tubo 3).

El contenido celular en cada uno de los tubos se determinó utilizando un contador Coulter en el Hospital Universitario de San Juan y es el que se recoge en los siguientes esquemas:

Plasma

Hematíes:  $0.05 \cdot 10^6 / \mu\text{l}$   
 Leucocitos:  $0.91 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$   
 Linfocitos:  $0.65 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$   
 Neutrófilos:  $0.10 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$   
 Monocitos:  $0.15 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$   
 Eosinófilos:  $0.0 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$   
 Plaquetas:  $392 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$

Tubo 1

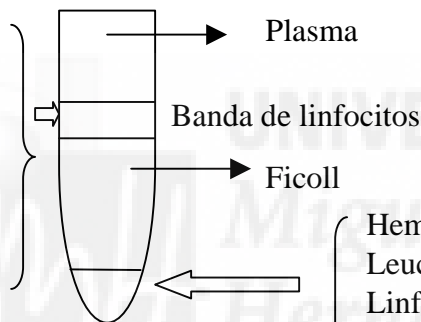


Precipitado celular

Hematíes:  $6.02 \cdot 10^6 / \mu\text{l}$   
 Leucocitos:  $8.03 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$   
 Linfocitos:  $2.42 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$   
 Neutrófilos:  $5.03 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$   
 Monocitos:  $0.28 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$   
 Eosinófilos:  $0.26 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$   
 Plaquetas:  $87 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$

Tubo 2 tras Ficoll

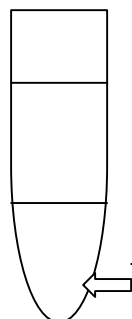
Hematíes:  $0 \cdot 10^6 / \mu\text{l}$   
 Leucocitos:  $3.43 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$   
 Linfocitos:  $2.81 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$   
 Neutrófilos:  $0.31 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$   
 Monocitos:  $0.31 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$   
 Eosinófilos:  $0.0 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$   
 Plaquetas:  $12 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$



Hematíes:  $7.81 \cdot 10^6 / \mu\text{l}$   
 Leucocitos:  $4.99 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$   
 Linfocitos:  $0.65 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$   
 Neutrófilos:  $3.92 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$   
 Monocitos:  $0.05 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$   
 Eosinófilos:  $0.25 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$   
 Plaquetas:  $4 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$

Tubo 3 (final 3<sup>er</sup> lavado) (Este resultado es la  $\bar{X} \pm Ds$  de 5 muestras)

Suero fisiológico



Hematíes:  $9.216 \pm 0.142 \cdot 10^6 / \mu\text{l}$  (99.82 %)  
 Linfocitos:  $0.082 \pm 0.015 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$  (0.0009 %)  
 Neutrófilos:  $8.562 \pm 0.409 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$  (0.09 %)  
 Eosinófilos:  $0.392 \pm 0.114 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$  (0.004 %)  
 Plaquetas:  $7.200 \pm 3.769 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$  (0.08 %)

Para obtener las membranas siempre tomamos la muestra del fondo del tubo y puesto que un 99.82 % de los elementos celulares son hematíes, podemos asumir que las membranas que obtenemos son básicamente de hematíes.

### 1.2.3.3. Estabilidad de los kits de AMPc:

Se evaluó la estabilidad de los Kits de AMPc a distintas temperaturas de almacenamiento.

En la figura 22 se representa para las distintas concentraciones estándares del kit de AMPc las cpm que se obtuvieron con un mismo kit en dos fechas diferentes. El kit permaneció durante este periodo almacenado a 4°C.

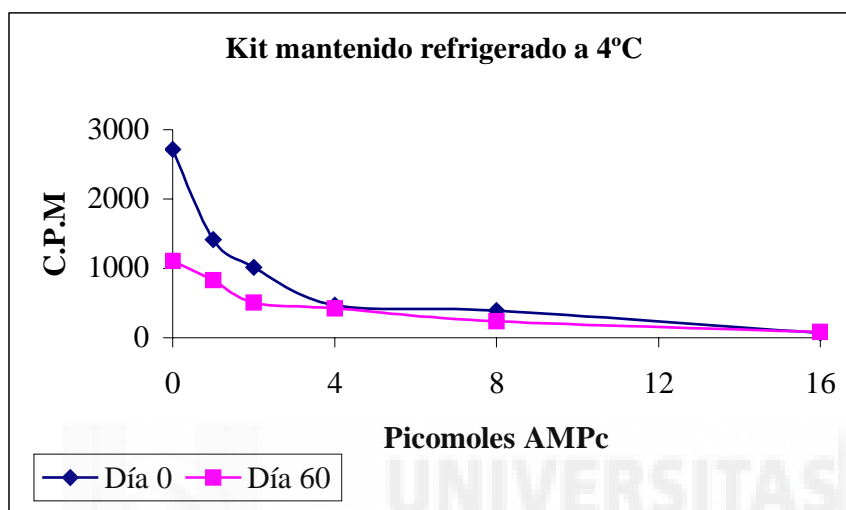


Figura 22. Representación de las c.p.m alcanzadas en 2 días diferentes de estudio.

Las c.p.m. obtenidas a los 2 meses son prácticamente la mitad de las esperadas. De dicho experimento se desprende que se produce una pérdida de la señal del kit en un periodo de 2 meses cuando se almacena a 4 °C. El mismo experimento pero con el kit congelado a -20 °C demostró que no había pérdida en el número de c.p.m. La figura 24 muestra los resultados obtenidos:

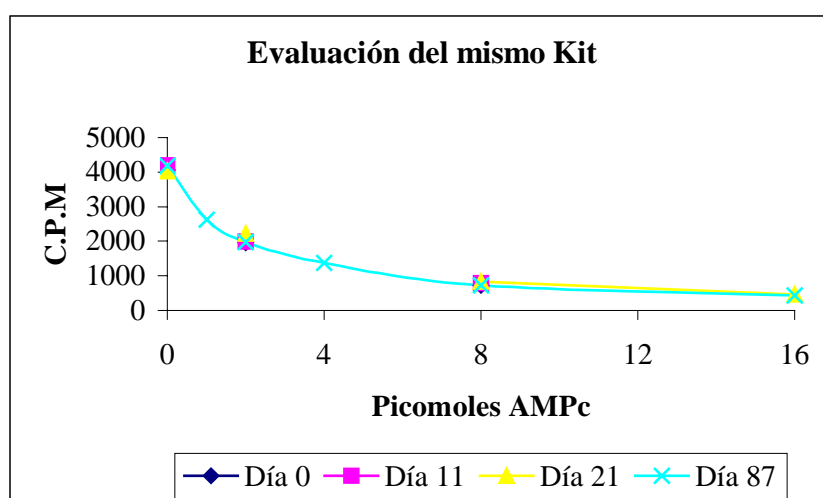


Figura 23. C.p.m obtenidas tras un periodo de 2 meses con un kit almacenado a -20 °C.

#### 1.2.3.4. Influencia del modelo de contador de centelleo, tiempo de contaje y agitación:

Se ha evaluado la influencia del modelo de contador de centelleo, tiempo necesario para el contaje y la agitación de los viales antes de ser contados. Para ello, las mismas muestras se midieron en 2 contadores de centelleo diferentes (Beckman LS 1701 y Wallac 1410), a diferentes tiempos, con y sin agitación de la muestra previa al contaje (tabla 12).

Ecuación	Contador	Agitación	Tiempo de medida
$Y = 1.022 + 0.489X$	Wallac 1410	No	1 minuto
$Y = 0.978 + 0.462X$	Beckman LS 1701	No	5 minutos
$Y = 1.042 + 0.418X$	Beckman LS 1701	No	1 minuto
$Y = 0.995 + 0.442X$	Wallac 1410	Si	1 minuto
$Y = 1.002 + 0.437X$	Wallac 1410	Si	5 minutos

**Tabla 12.** Ecuaciones de las rectas de AMPc en función del modelo de contador de centelleo.

A la vista de estas ecuaciones, la medida de AMPc es independiente del contador utilizado, del tiempo y de si se agitan o no las muestras previamente al contaje. Se adoptó trabajar siempre con el contador Wallac 1410 puesto que proporciona la medida en 1 minuto y agitar las muestras antes de situarlas en el contador.

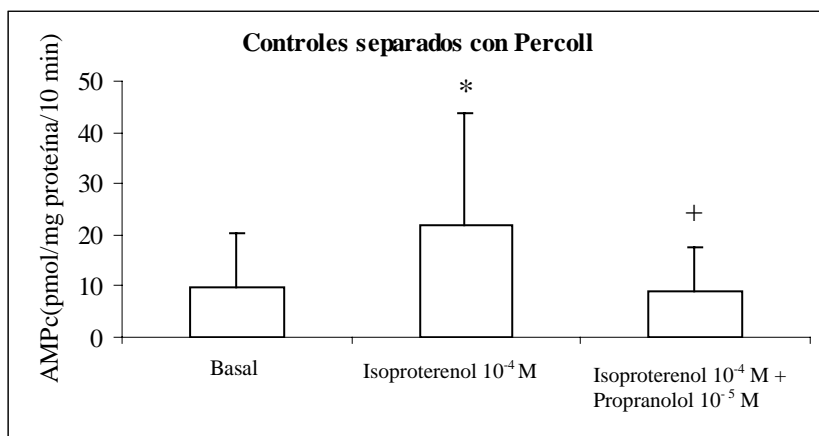
#### 1.2.3.5. Efecto de separar los elementos celulares de las muestras con Percoll, Ficoll o con centrifugación simple:

En la tabla 13 se muestran los valores de AMPc (pmol/mg proteína/10 min) obtenidos en muestras controles cuyas membranas de hematíes se obtuvieron usando un gradiente de Percoll (n = 13), usando un gradiente de Ficoll (n = 12), y reemplazando el gradiente por una centrifugación a 1000 r.p.m durante 10 min (n = 12).

Tipo de separación	Basal	Tras isoproterenol $10^{-4}$ M
Percoll (n = 13)	$9.93 \pm 10.19$	$22.07 \pm 21.83$
Ficoll (n = 12)	$14.36 \pm 20.02$	$19.27 \pm 26.15$
Centrifugación (n = 12)	$10.17 \pm 11.44$	$17.51 \pm 17.41$

**Tabla 13.** Valores de AMPc obtenidos en los controles (pmol AMPc/mg proteína/10min) utilizando un gradiente de Ficoll, un gradiente de Percoll, y una centrifugación a 1000 r.p.m.

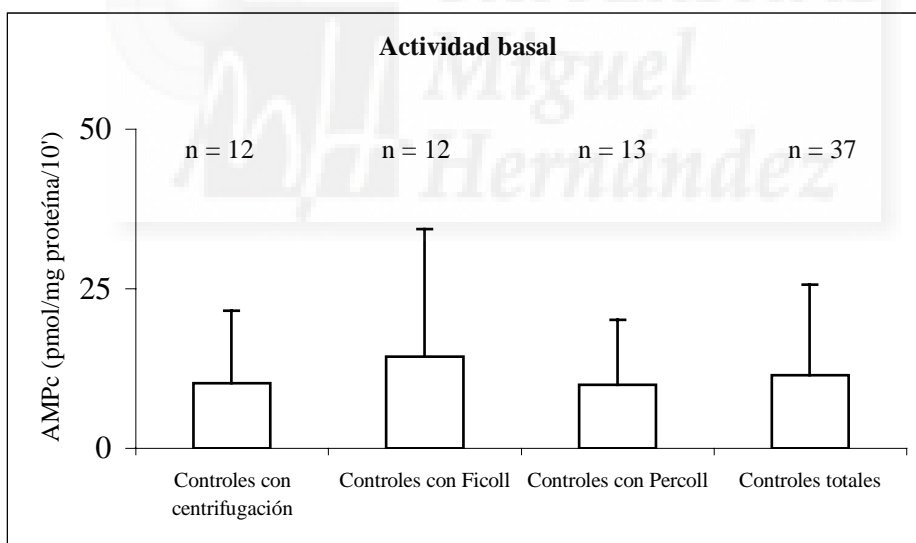




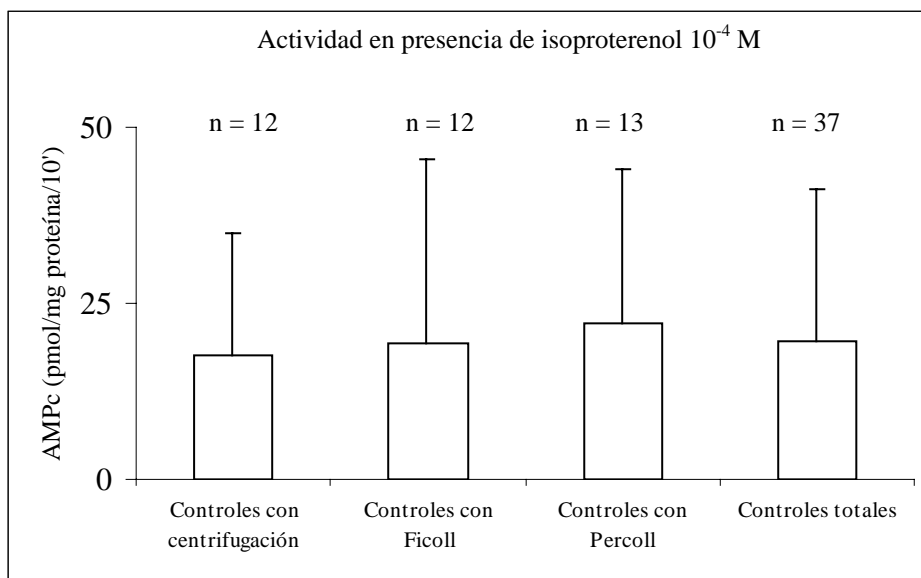
**Figura 24.** Representación gráfica de los valores de AMPc producidos por membranas de hematíes en muestras controles separadas con Percoll. \* P < 0.05 comparado con la basal. + P < 0.05 comparado con isoproterenol 10<sup>-4</sup> M.

En la figura 24 se puede ver que el estímulo con isoproterenol 10<sup>-4</sup> M incrementa significativamente la actividad de la AC (P = 0.037); un efecto que se abole en presencia de propranolol 10<sup>-5</sup> M.

En las figuras 25 y 26 se representan los valores de AMPc basales y tras el estímulo con isoproterenol 10<sup>-4</sup> M para los controles en los 3 procesos de separación celular y cuando se evalúan en general:



**Figura 25.** Actividad basal de la AC en los controles en función del procedimiento de separación de los elementos celulares.



**Figura 26.** Actividad de la AC tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M en función del procedimiento de separación de los elementos celulares.

No se encontraron diferencias significativas en los valores de AMPc basales y tras estimular con isoproterenol  $10^{-4}$  M, entre las muestras de controles procesadas con Percoll, las procesadas con Ficoll y las procesadas con centrifugación.

### 1.3. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LA DBH:

#### 1.3.1. Recuperación de octopamina:

Se evaluó la pérdida de octopamina en su paso a través de la columna de Dowex. Para ello se prepararon diferentes concentraciones de octopamina determinándose la absorbancia producida pasando y sin pasar la octopamina a través de la columna de Dowex. Los resultados que se obtuvieron se muestran en la tabla 14:

Nmoles octopamina	Absorbancia sin pasar por la columna	Absorbancia pasando por columna	% de recuperación
0	0.020	0.052	260
3.15	0.567	0.539	95
6.5	0.770	0.770	100
12.5	0.830	0.857	103
25	0.958	0.968	101
50	0.957	0.806	84
100	0.929	0.811	87
200	0.808	0.803	99

**Tabla 14.** Recuperación de octopamina.

A la vista de los resultados, no parece que el hecho de atravesar la columna de Dowex origine pérdidas relevantes en la cantidad de octopamina.

### 1.3.2. Variabilidad interdía:

Cada punto de las respectivas rectas estándar de octopamina se midió por duplicado o triplicado. A continuación se detallan cada uno de los CV (tabla 14) de estas medidas pudiendo observarse que la variabilidad media en la media de los duplicados de cada día no supera en ningún caso el 25 %, excepto para el valor del blanco, en el caso de que las concentraciones de octopamina atraviesen la columna de Dowex.

Nmoles octopamina	Media Absorbancias	Desviación Estándar	CV (%)	n
0	0.030	0.067	227	4
0.026	0.261	0.062	24	2
0.039	0.499	-	-	1
0.052	0.539	0.016	3	2
0.065	0.624	0.013	2	2
0.078	0.665	0.027	4	2
0.092	0.738	0.020	3	2
0.33	0.775	0.019	2	2
0.66	0.807	0.062	8	2
1.32	0.807	0.048	6	2
3.94	0.777	-	-	1
5.26	0.810	-	-	1

Tabla 15. Variabilidad interdía de la determinación de DBH.

### 1.3.3. Efectos del ácido ascórbico:

Se valoró la actividad de la DBH en presencia y en ausencia de ácido ascórbico en muestras de voluntarios sanos. La absorbancia que se obtuvo sin ascórbico fue de  $0.079 \pm 0.017$  (n = 6) Unidades de absorbancia (UA) y de  $0.177 \pm 0.055$  en presencia de ascórbico (n = 6) UA. Queda patente que en presencia de ascórbico, la actividad de la DBH se incrementa.

### 1.3.4. Efecto de la mezcla: acetato sódico, ascorbato, fumarato, pargilina, N-etilmaleimida, catalasa y H<sub>2</sub>O:

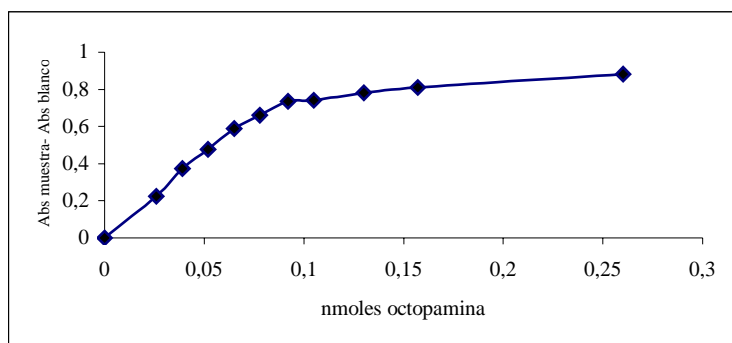
Se evaluó la influencia de esta mezcla en la cuantificación de la medida de absorbancia. Para ello, se procesaron muestras con todos los componentes de esta mezcla. El suero y la tiramina se cambiaron por H<sub>2</sub>O. La absorbancia que se midió fue de  $0.035 \pm 0.002$  UA (n = 2), un valor similar a los valores blanco, lo que indica que la mezcla inicial no interfiere sobre el valor de absorbancia final determinado.

### 1.3.5. Determinación de la actividad de la DBH en muestras de suero control:

Se determinó la actividad de la DBH en 21 muestras de suero de control. La actividad medida en 25 µl de suero fue de  $34.50 \pm 0.09$  UI/L. Este resultado está en concordancia con los de Nagatsu y cols, 1972.

### 1.3.6. Linealidad de la determinación:

Se preparó una recta estándar de octopamina añadiendo a muestras control octopamina para alcanzar las siguientes concentraciones finales: 0, 0.026, 0.039, 0.052, 0.065, 0.078, 0.092, 0.105, 0.13, 0.157, 0.26 nmoles y se determinó la absorbancia. Los resultados se representan en la figura 27:

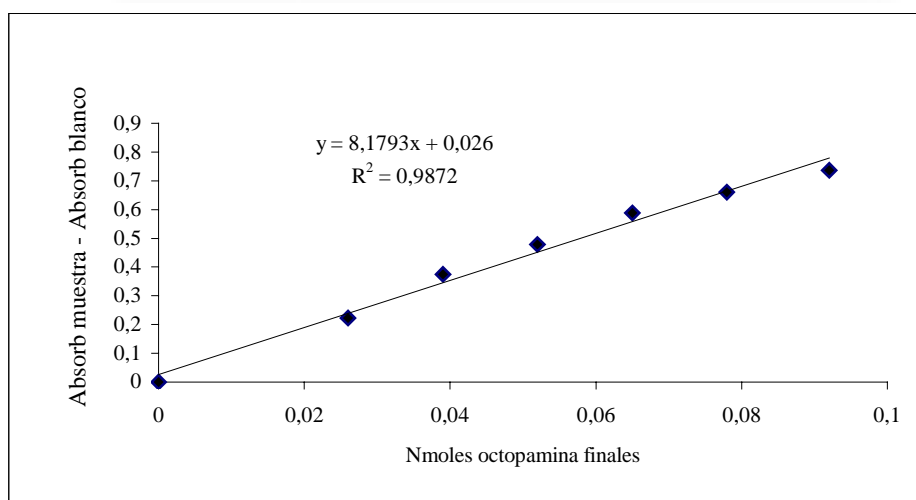


**Figura 27.** Linealidad de la cuantificación de octopamina.

Puesto que sólo aparece un intervalo lineal de concentraciones entre los puntos 0 y 0.092 nmoles de octopamina finales, se eligió este intervalo lineal para construir la rectas estándar de cada día de trabajo.

### 1.3.7. Recta estándar de calibración:

En la figura 28 se representa una recta estándar típica de octopamina. Es lineal entre 0 y 0.092 nmoles octopamina finales.



**Figura 28.** Recta estándar de calibración de octopamina. Relación entre los nmoles de octopamina de la muestra y la absorbancia neta (Abs muestra-Abs blanco) para una recta de calibración.

## **2. PACIENTES Y CONTROLES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO:**

Desde Septiembre del 2001 a Diciembre del 2003, se han incluido secuencialmente 48 pacientes. Un primer grupo lo constituyeron aquellos pacientes referidos al Hospital para evaluación de la profilaxis primaria del sangrado de varices esofágicas ( $n = 17$ ) mientras que un segundo grupo lo integraron pacientes incluidos 5-7 días después de la recuperación de un episodio agudo por sangrado de varices esofágicas (profilaxis secundaria) ( $n = 31$ ). Las características clínicas y demográficas de los pacientes fueron similares en ambos grupos, excepto la edad, los niveles de glucosa, la presión arterial diastólica y la presión arterial media (tabla 16). Diecinueve pacientes del grupo de profilaxis secundaria recibieron una transfusión durante los 5 primeros días después del sangrado. Trece pacientes de este grupo recibieron un bolus de 250  $\mu\text{g}$  de somatostatina seguido por una infusión continua intravenosa (250  $\mu\text{g}/\text{h}$ ) que se mantuvo durante los 5 primeros días de admisión.

Como controles se incluyeron un total de 37 muestras sanguíneas de voluntarios sanos aprovechando la realización de un ensayo clínico llevado a cabo en la Unidad de Ensayos Clínicos de la Universidad Miguel Hernández. Las muestras correspondían a voluntarios de ambos sexos, con un rango de edad entre 20 y 26 años, con un índice de masa corporal menor de 30 y sin patologías relevantes detectadas.



	Profilaxis secundaria	Profilaxis primaria
	N = 32	N = 16
Edad (años)	60 ± 10	52 ± 8*
Sexo (M/F)	21/11	12/4
Peso (Kg)	76 ± 15	82 ± 19
Etiología de la cirrosis		
Alcohol	18	8
Virus	11	4
Alcohol + Virus	-	2
Otras	3	2
Consumo activo de alcohol (si/no)	5/27	4/12
Puntuación Child-Pugh	7.8 ± 2.4	7.4 ± 2.0
Bilirrubina total (mg/100 ml)	2.3 ± 1.5	2.5 ± 1.8
Albúmina sérica (g/dl)	2.9 ± 0.6	2.9 ± 1.0
Quick (%)	64 ± 15	71 ± 13
Creatinina (mg/dL)	0.8 ± 0.3	0.7 ± 0.2
Hemoglobina (g/100 ml)	11 ± 2	12 ± 2
Hematocrito (ml/100ml)	32 ± 6	36 ± 5
Plaquetas (mm <sup>3</sup> )	102969 ± 60169	96313 ± 48086
Leucocitos (mm <sup>3</sup> )	6364 ± 3499	5306 ± 2432
Fosfatasa alcalina (mU/ml)	180 ± 116	185 ± 110
Glucosa en ayunas (mg/100 ml)	188 ± 92	110 ± 32*
Ascitis (si/no)	9/23	4/12
Presión arterial sistólica (mmHg)	135 ± 17	146 ± 22
Presión arterial diastólica (mmHg)	72 ± 12	81 ± 9*
Presión arterial media (mmHg)	93 ± 12	103 ± 11*
Frecuencia cardíaca (latidos/minuto)	79 ± 13	81 ± 11
Tratamiento previo con β-bloqueantes (si/no)	11/21	9/7
Somatostatina (si/no)	13/19	0/16
Bolsas concentrado de hematíes	4 ± 3	-
Número de pacientes transfundidos (si/no)	15/17	0/16*

**Tabla 16.** Características clínicas de los pacientes cirróticos incluidos en el estudio. \*P < 0.05.

En la tabla 17 se describen los parámetros hemodinámicos medidos en los pacientes (total de pacientes, pacientes en profilaxis primaria y pacientes en profilaxis secundaria) en el momento de la realización del estudio hemodinámico, 30 minutos después de la administración de un bolus iv de propranolol y tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral.

<b>Todos los pacientes</b>	Antes del propranolol iv	30 minutos tras propranolol iv	3 meses con propranolol oral
	n = 48	n = 46	n = 21
Presión arterial sistólica	139 ± 20	131 ± 18*	132 ± 21
Presión arterial diastólica	75 ± 12	73 ± 13	66 ± 11*
Presión arterial media	97 ± 12	92 ± 13*	88 ± 12*
Frecuencia cardíaca	79 ± 12	66 ± 10*	62 ± 7*
Presión enclavada	25.1 ± 5.9	23.3 ± 6.1*	23.1 ± 4.6
Presión libre	7.4 ± 3.3	8.7 ± 5.1*	7.3 ± 3.2
GPVH	17.8 ± 4.3	15.0 ± 4.4*	15.8 ± 4.3*
<b>Pacientes en profilaxis primaria</b>	Antes del propranolol iv	30 minutos tras propranolol iv	3 meses con propranolol oral
	n = 16	n = 15	n = 6
Presión arterial sistólica	146 ± 22	134 ± 23*	139 ± 32
Presión arterial diastólica	81 ± 9+	76 ± 9*	73 ± 11*
Presión arterial media	103 ± 11+	96 ± 12*	95 ± 14
Frecuencia cardíaca	81 ± 11	68 ± 10*	64 ± 6
Presión enclavada	24.3 ± 5.2	22.6 ± 4.9	22.8 ± 6.6*
Presión libre	7.4 ± 3.0	8.8 ± 3.0*	9.2 ± 3.7
GPVH	16.9 ± 4.0	13.7 ± 3.2*	13.7 ± 3.9*
<b>Pacientes en profilaxis secundaria</b>	Antes del propranolol iv	30 minutos después del propranolol iv	3 meses con propranolol via oral
	n = 32	n = 31	n = 15
Presión arterial sistólica	135 ± 17	129 ± 15*	130 ± 15
Presión arterial diastólica	72 ± 12	71 ± 14	64 ± 10
Presión arterial media	93 ± 12	91 ± 13	86 ± 10*
Frecuencia cardíaca	79 ± 13	64 ± 9*	61 ± 8*
Presión enclavada	25.6 ± 6.3	23.6 ± 6.7*	23.3 ± 3.8
Presión libre	7.4 ± 3.5	8.6 ± 5.9	6.6 ± 2.7
GPVH	18.2 ± 4.4	15.6 ± 4.8*	16.7 ± 4.2

**Tabla 17.** Parámetros hemodinámicos de los pacientes que participan en el estudio. \* P< 0.05 comparado con antes del propranolol iv. + P< 0.05 comparado con profilaxis secundaria.

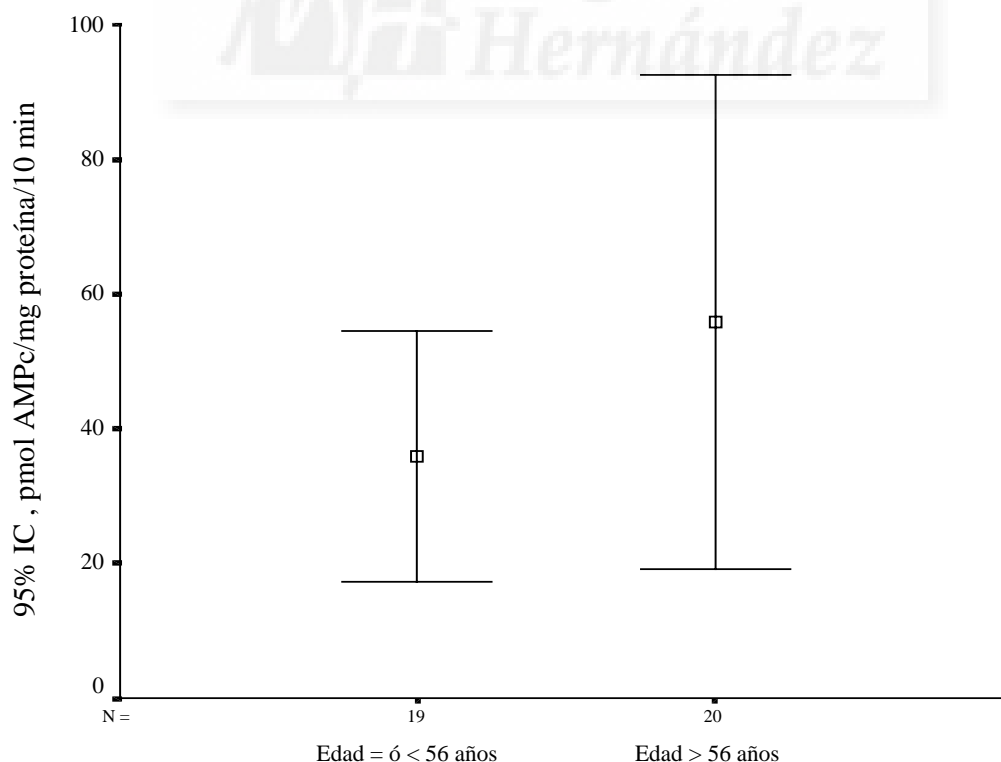
En los pacientes de profilaxis primaria se han encontrado diferencias significativas antes y después del bolus iv de propranolol para la presión arterial sistólica, presión arterial diastólica, presión arterial media, frecuencia cardíaca, presión libre y GPVH. En los pacientes de profilaxis secundaria hay diferencias significativas entre los valores, antes y después del bolus iv de propranolol, en la presión arterial sistólica, frecuencia cardíaca, presión enclavada y GPVH.

En 21 pacientes (6 de profilaxis primaria y 15 de profilaxis secundaria) se llevó a cabo un nuevo EH de la actividad de la AC tras 3 meses de tratamiento continuado con propranolol oral (25 mg/12 h). En el total de pacientes cirróticos con HTP tratados durante 3 meses con propranolol oral se observaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de presión arterial diastólica, media, frecuencia cardiaca y GPVH comparado con la situación previa a la administración del bolus de propranolol iv en el estudio inicial. Particularmente, en el grupo de profilaxis primaria, disminuyó significativamente la presión arterial diastólica, la presión enclavada y el GPVH. Sin embargo, en los pacientes de profilaxis secundaria, sólo se apreció la disminución de la presión arterial media y la frecuencia cardiaca, pero no de la presión enclavada ni del GPVH.

### 2.1. EFECTO DE LA EDAD DE LOS PACIENTES SOBRE LOS VALORES DE AMPc:

Dado que la edad fue significativamente diferente en los 2 grupos de pacientes estudiados y existe información acerca de que la actividad adrenérgica se modifica con la edad, evaluamos si la edad de los pacientes cirróticos incluidos en el estudio podría influir sobre los valores de AMPc tanto en condiciones basales como después de un estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M. Para ello, calculamos la mediana de la edad de todos los pacientes cirróticos resultando en un valor de 56 años, e independientemente de su profilaxis, evaluamos la formación de AMPc en las membranas de los hematíes en el grupo de pacientes de edad inferior o igual a la mediana y en el grupo de edad superior. Los resultados se muestran en las siguientes figuras:

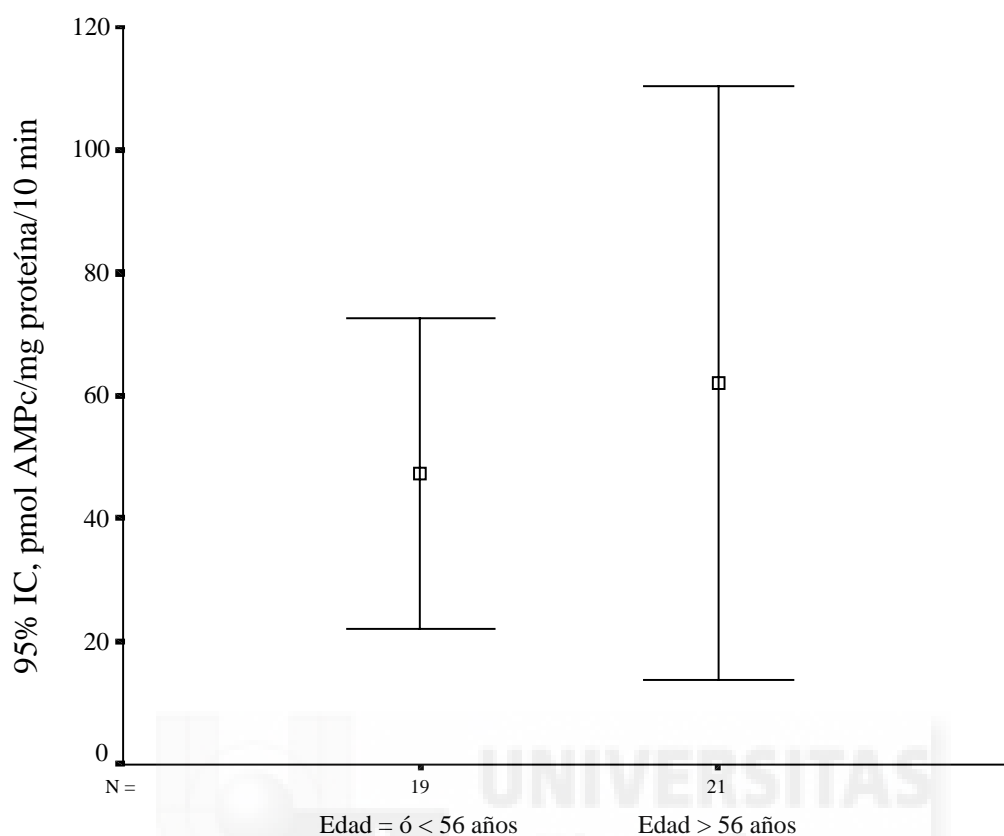
A) Basal:



**Figura 29.** Representación de los valores de AMPc en membranas de hematíes ( $\bar{X}$ ) e IC 95% en los grupos de edad separados por el valor de la mediana de la edad en situación basal.



B) Tras isoproterenol  $10^{-4}$  M:

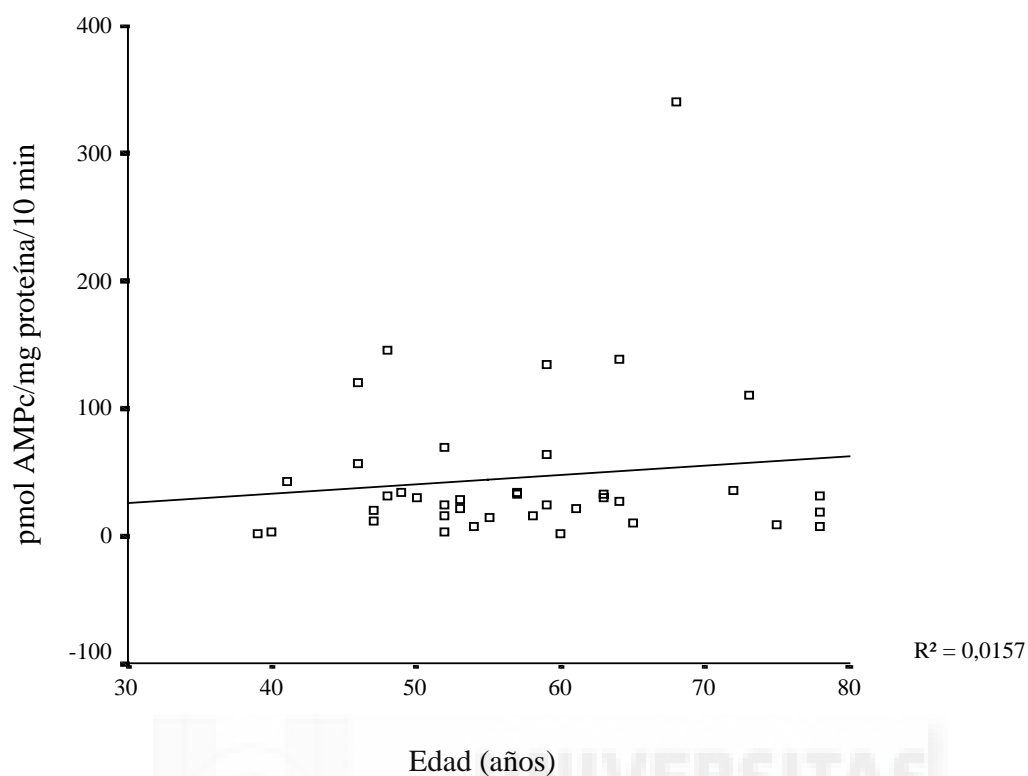


**Figura 30.** Representación de los valores de AMPc en membranas de hematíes ( $\bar{X}$ ) e IC 95% después de un estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M en los grupos de edad separados por el valor de la mediana de la edad.

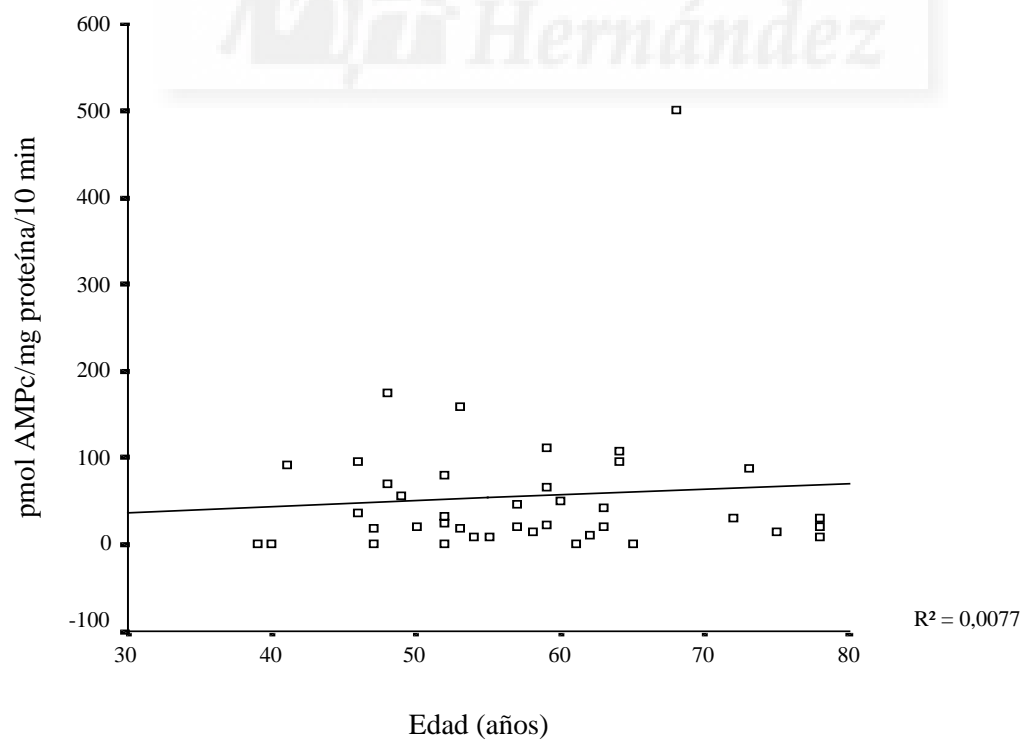
No se encontraron diferencias significativas en los valores medios de AMPc entre aquellos pacientes con una edad menor o igual a 56 años y los mayores de 56 ni en situación basal ( $P = 0.428$ ) ni tras el estímulo con isoproterenol ( $P = 0.768$ ).

Igualmente, el análisis de la posible correlación entre la edad y los valores de AMPc medidos basalmente y tras el estímulo con isoproterenol descartó la existencia de una correlación significativa como se observa en las siguientes figuras ( $P = 0.928$  figura A y  $P = 0.530$  figura B).

A) Basal:



**Figura 31.** Representación de los picomoles de AMPc en membranas de hematíes en función de la edad de los pacientes en situación basal.

B) Tras isoproterenol  $10^{-4}$  M:

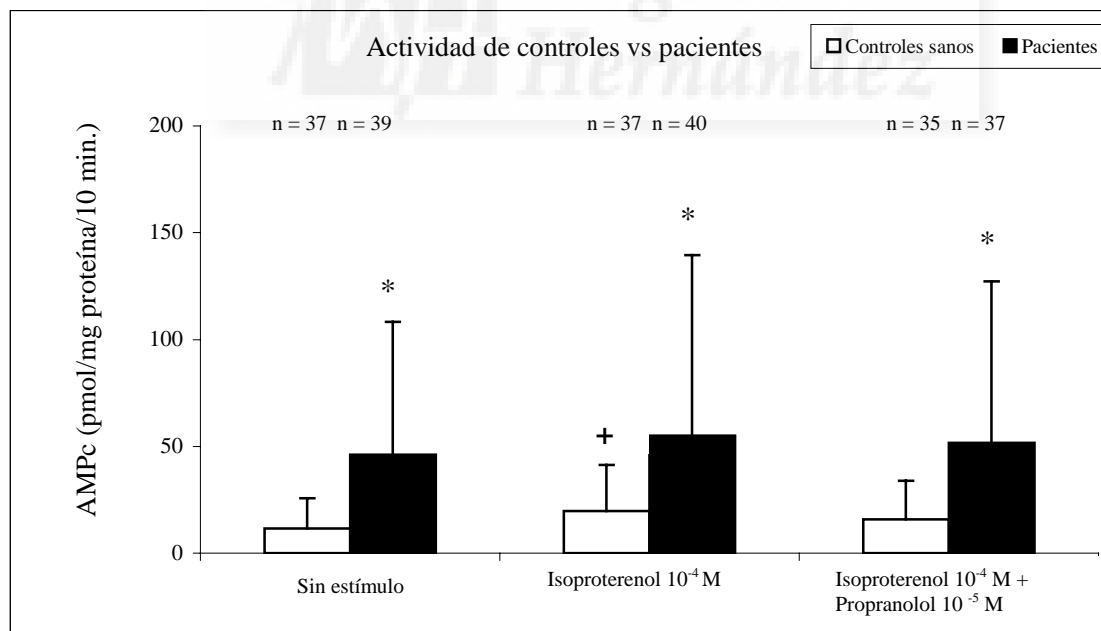
**Figura 32.** Representación de los picomoles de AMPc en membranas de hematíes en función de la edad de los pacientes después de un estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M.

### 3. ACTIVIDAD DEL SISTEMA DE LA ADENILATO CICLASA (AC) EN MEMBRANAS DE HEMATÍES DE PACIENTES CIRRÓTICOS CON HTP EN EL MOMENTO DEL EH INICIAL:

#### 3.1. ACTIVIDAD DE LA AC PREVIA A LA ADMINISTRACIÓN DE PROPRANOLOL IV:

##### 3.1.1. Pacientes:

Se ha evaluado la funcionalidad del sistema AC de membranas de hematíes en sujetos controles y en los pacientes cirróticos con hipertensión portal incluidos en el estudio antes de someterles al bolus iv de propranolol. Como puede observarse en la figura 30, en el caso de los controles se obtuvo una actividad media de  $11.45 \pm 14.18$  pmol AMPc/mg proteína/10 min mientras que los pacientes mostraron una actividad significativamente mayor ( $46.11 \pm 62.25$  pmol AMPc/mg proteína/10 min). Cuando se evaluó el incremento en la actividad de la AC tras estimular los receptores  $\beta$  con Isoproterenol  $10^{-4}$  M, en el caso de los controles, la actividad media se incrementó significativamente a  $19.68 \pm 21.54$  pmol AMPc/mg proteína/10 min mientras que en el caso de los pacientes la producción de AMPc fue de  $55.01 \pm 84.44$  pmol AMPc/mg proteína/10 min., un incremento no significativo. Cuando se evaluó la capacidad del propranolol  $10^{-5}$  M para antagonizar la activación de la AC inducida por isoproterenol  $10^{-4}$  M en el caso de los controles se redujo la actividad media a  $15.74 \pm 18.17$  pmol AMPc/mg proteína/10 min mientras que en los pacientes la actividad fue de  $51.57 \pm 75.65$  pmol AMPc/mg proteína/10 min.



**Figura 33.** Funcionalidad de la AC en membranas de hematíes de pacientes cirróticos y en controles.

\*  $P < 0.05$  comparado con controles. +  $P < 0.05$  comparado con la basal.

Tanto para los controles como para los pacientes cirróticos, se calculó el estímulo absoluto y relativo del isoproterenol  $10^{-4}$  M y el bloqueo relativo y absoluto del propranolol  $10^{-5}$  M. Los resultados se recogen en la tabla 18:

	Controles	Pacientes
Estímulo relativo del isoproterenol $10^{-4}$ M	$5.28 \pm 13.70$ (37)	$1.36 \pm 7.40$ (39)*
Bloqueo relativo del propranolol $10^{-5}$ M	$3.11 \pm 7.07$ (35)	$1.31 \pm 4.04$ (37)
Estímulo absoluto del isoproterenol $10^{-4}$ M	$8.23 \pm 24.13$ (37)	$10.03 \pm 38.30$ (39)
Bloqueo absoluto del propranolol $10^{-5}$ M	$-4.15 \pm 22.83$ (35)	$-3.22 \pm 26.28$ (37)

**Tabla 18.**  $\bar{X} \pm Ds$  (n) del estímulo relativo y absoluto para isoproterenol y bloqueo relativo y absoluto para propranolol en membranas de hematíes de pacientes cirróticos y en voluntarios sanos. Tanto el estímulo relativo del isoproterenol como el bloqueo relativo del propranolol se expresan en tanto por 1 mientras que el estímulo absoluto del isoproterenol y el bloqueo absoluto del propranolol se expresan en pmol AMPc/mg proteína/10 min. \*  $P < 0.05$  comparado con controles

Como se puede observar en la tabla anterior no se han encontrado diferencias significativas entre los pacientes y los controles excepto para el estímulo relativo del isoproterenol que en el caso de los pacientes fue significativamente inferior al de los controles ( $P = 0.041$ ).

### 3.1.1.1. Análisis de las posibles correlaciones entre la actividad de la AC y las variables clínicas de todos los pacientes incluidos en el estudio antes de la administración de un bolus iv de propranolol (EH inicial):

#### 3.1.1.1.1. Actividad basal:

Se ha estudiado la existencia de posibles correlaciones entre las diferentes variables clínicas y los valores de AMPc basales medidos antes del bolus iv de propranolol. Los resultados obtenidos se recogen en las tablas 19 y 20. Como se puede observar, no se ha encontrado ninguna correlación significativa.

Variable	Coefficiente correlación Pearson	P
Edad	0.125	0.447
Peso	-0.027	0.928
Presión enclavada	-0.068	0.679
Presión libre	0.086	0.604
GPVH	-0.132	0.422
Presión arterial sistólica	0.004	0.982
Presión arterial diastólica	0.138	0.444
Presión arterial media	0.088	0.627
Frecuencia cardiaca	-0.075	0.679
Puntuación Child	0.040	0.810
Leucocitos	0.159	0.333
Hemoglobina	0.189	0.249
Hematocrito	0.178	0.280
Plaquetas	0.024	0.886
GOT	-0.212	0.228
GPT	-0.197	0.265
GGT	-0.294	0.103
Fosfatasa alcalina	-0.182	0.311
Creatinina	-0.150	0.390
Glucosa	-0.113	0.517
Albúmina	0.063	0.740
Bilirrubina	-0.018	0.919
Índice de Quick	-0.011	0.947

**Tabla 19.** Análisis del grado de correlación existente entre la producción de AMPc basal y las variables clínicas cuantitativas en membranas de hematíes de pacientes cirróticos con HTP durante el EH inicial.

Variable		AMPc ( $\bar{X} \pm Ds$ )(n)	P
Sexo	Masculino	30.9 $\pm$ 31.0 (25)	0.111
	Femenino	73.2 $\pm$ 91.2 (14)	
Etiología de la cirrosis	Alcohol	44.8 $\pm$ 44.6 (20)	0.931
	Virus	55.5 $\pm$ 89.5 (14)	
	Otras	15.0 $\pm$ 8.2 (3)	
	Alcohol + virus	39.8 $\pm$ 33.1 (2)	
Consumo activo de alcohol	Si	55.4 $\pm$ 54.2 (8)	0.573
	No	43.7 $\pm$ 64.8 (31)	
$\beta$ -bloqueantes en el mes previo	Si	51.4 $\pm$ 82.8 (16)	0.789
	No	42.4 $\pm$ 44.5 (23)	
Nitritos en el mes previo	Si	52.8 $\pm$ 59.2 (3)	0.862
	No	45.6 $\pm$ 63.3 (36)	
Furosemida en el mes previo	Si	21.1 $\pm$ 16.6 (5)	0.334
	No	49.8 $\pm$ 65.7 (34)	
Espironolactona en el mes previo	Si	34.5 $\pm$ 28.7 (12)	0.753
	No	51.3 $\pm$ 72.3 (27)	
Lactulosa en el mes previo	Si	74.2 $\pm$ 65.1 (2)	0.389
	No	45.6 $\pm$ 62.7 (37)	
Respuesta estudio hemodinámico	Si	36.3 $\pm$ 35.2 (18)	0.828
	No	55.6 $\pm$ 80.3 (20)	
Somatostatina	Simple	44.3 $\pm$ 53.7 (8)	0.376
	Doble	62.5 $\pm$ 50.0 (3)	
Transfusión	Si	43.3 $\pm$ 41.0 (12)	0.391
	No	47.4 $\pm$ 70.4 (27)	

**Tabla 20.** Producción de AMPc basal (  $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas estudiadas en los pacientes cirróticos con HTP durante el EH inicial.

### 3.1.1.1.2. Tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M.

También se ha evaluado la posible existencia de correlaciones entre las variables clínicas y los valores de AMP tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M. Los resultados se recogen en la siguientes tablas (tablas 21 y 22):

Variable	Coefficiente correlación Pearson	P
Edad	0.088	0.590
Peso	-0.376	0.167
Presión enclavada	-0.125	0.444
Presión libre	-0.008	0.960
GPVH	-0.154	0.344
Presión arterial sistólica	0.127	0.476
Presión arterial diastólica	0.277	0.112
Presión arterial media	0.239	0.173
Frecuencia cardiaca	0.082	0.646
Puntuación Child	0.011	0.947
Leucocitos	0.067	0.681
Hemoglobina	0.246	0.126
Hematocrito	0.236	0.142
Plaquetas	-0.019	0.907
GOT	-0.098	0.574
GPT	-0.122	0.485
GGT	-0.111	0.539
Fosfatasa alcalina	-0.060	0.736
Creatinina	-0.074	0.666
Glucosa	-0.198	0.248
Albúmina	0.106	0.570
Bilirrubina	0.084	0.633
Índice de Quick	0.093	0.574

**Tabla 21.** Análisis del grado de correlación existente entre la producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M y las variables clínicas cuantitativas en membranas de hematíes de pacientes cirróticos con HTP durante el EH inicial.

Variable		AMPc ( $\bar{X} \pm Ds$ ) (n)	P
Sexo	Masculino	35.6 $\pm$ 31.2 (25)	0.069
	Femenino	90.7 $\pm$ 126.5 (15)	
Etiología de la cirrosis	Alcohol	52.1 $\pm$ 45.6 (20)	0.610
	Virus	68.6 $\pm$ 127.9 (15)	
	Otras	13.8 $\pm$ 12.0 (3)	
	Alcohol + virus	44.8 $\pm$ 29.2 (2)	
Consumo activo de alcohol	Si	76.2 $\pm$ 53.8 (8)	0.088
	No	49.7 $\pm$ 90.4 (32)	
$\beta$ -bloqueantes en el mes previo	Si	70.3 $\pm$ 122.3 (16)	
Nitritos en el mes previo	Si	43.6 $\pm$ 46.0 (3)	1.000
	No	55.9 $\pm$ 87.1 (37)	
Furosemida en el mes previo	Si	29.1 $\pm$ 32.0 (6)	0.447
	No	59.6 $\pm$ 90.1 (34)	
Espironolactona en el mes previo	Si	54.3 $\pm$ 45.4 (13)	0.264
	No	55.4 $\pm$ 98.7 (27)	
Lactulosa en el mes previo	Si	88.8 $\pm$ 74.2 (3)	0.296
	No	52.3 $\pm$ 85.5 (37)	
Respuesta estudio hemodinámico	Si	43.7 $\pm$ 44.6 (18)	0.922
	No	64.0 $\pm$ 109.6 (21)	
Somatostatina	Simple	38.5 $\pm$ 57.6 (9)	0.145
	Doble	64.9 $\pm$ 28.4 (3)	
Transfusión	Si	36.2 $\pm$ 34.6 (12)	0.610
	No	63.1 $\pm$ 97.9 (28)	

**Tabla 22.** Producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M (  $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas evaluadas en el conjunto de pacientes cirróticos con HTP durante el EH inicial.

Al igual que en el caso anterior, no se han encontrado correlaciones significativas entre los niveles de AMPc tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M y las variables clínicas en los paciente cirróticos antes de la administración del bolus iv de propranolol.

**3.1.1.2. Análisis de las posibles correlaciones entre la capacidad de respuesta al isoproterenol  $10^{-4}$  M (estímulo relativo del isoproterenol) durante el EH inicial o basal y las variables clínicas y/o demográficas en los pacientes cirróticos con HTP:**

Hemos analizado la existencia de posibles correlaciones entre diversas características de los pacientes y el incremento en la producción de AMPc sobre la actividad basal de la AC después de estimular con isoproterenol  $10^{-4}$  M. Para ello, hemos calculado el número de veces que se incrementa la producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol en relación al valor de AMPc previo, es decir, antes del estímulo beta (estímulo relativo del isoproterenol  $10^{-4}$  M). En las tablas 23 y 24 se muestran los resultados.

Variable	Coefficiente correlación Pearson	P
Edad	0.035	0.834
Peso	-0.387	0.171
Presión enclavada	0.009	0.957
Presión libre	-0.146	0.375
GPVH	0.108	0.514
Presión arterial sistólica	0.066	0.715
Presión arterial diastólica	-0.114	0.526
Presión arterial media	-0.036	0.842
Frecuencia cardiaca	<b>0.353*</b>	<b>0.044*</b>
Puntuación Child	0.104	0.533
Leucocitos	0.296	0.068
Hemoglobina	0.162	0.325
Hematocrito	0.153	0.353
Plaquetas	-0.046	0.781
GOT	0.196	0.267
GPT	0.066	0.712
GGT	<b>0.766*</b>	<b>0.000*</b>
Fosfatasa alcalina	0.173	0.335
Creatinina	0.122	0.484
Glucosa	-0.090	0.609
Albúmina	-0.030	0.875
Bilirrubina	<b>0.478*</b>	<b>0.004*</b>
Índice de Quick	0.012	0.941

**Tabla 23.** Análisis del grado de correlación existente entre el estímulo relativo del isoproterenol y las variables clínicas cuantitativas en las membranas de hematíes de los pacientes cirróticos con HTP durante el EH inicial. \* P < 0.05.

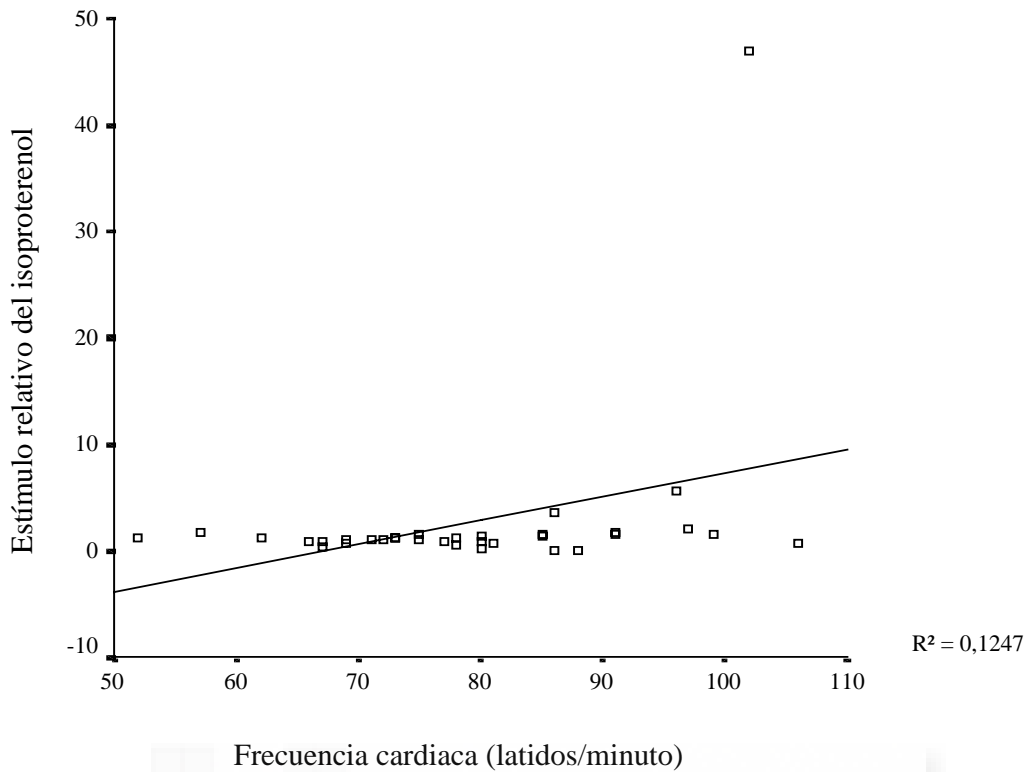


Variable		Estímulo relativo del isoproterenol ( $\bar{X} \pm Ds$ ) (n)	P
Somatostatina	Simple	0.7 ± 0.4 (8)	0.085
	Doble	1.2 ± 0.4 (3)	
Sexo	Masculino	2.9 ± 9.2 (25)	0.988
	Femenino	1.5 ± 1.5 (14)	
Etiología de la cirrosis	Alcohol	3.5 ± 10.3 (20)	0.641
	Virus	1.2 ± 0.9 (14)	
	Otras	0.9 ± 0.8 (3)	
	Alcohol + virus	1.3 ± 0.3 (2)	
Consumo activo de alcohol	Si	7.3 ± 16.1 (8)	0.421
	No	1.1 ± 0.7 (31)	
β-bloqueantes en el mes previo	Si	1.3 ± 1.2 (16)	0.489
	No	3.1 ± 9.6 (23)	
Nitritos en el mes previo	Si	1.0 ± 0.5 (3)	0.785
	No	2.5 ± 7.7 (36)	
Furosemida en el mes previo	Si	1.5 ± 0.5 (5)	0.089
	No	2.5 ± 7.9 (34)	
Espironolactona en el mes previo	Si	1.9 ± 1.4 (12)	<b>0.017*</b>
	No	2.6 ± 8.9 (27)	
Lactulosa en el mes previo	Si	3.2 ± 3.4 (2)	0.529
	No	2.3 ± 7.6 (37)	
Respuesta estudio hemodinámico	Si	1.4 ± 1.3 (18)	0.633
	No	3.3 ± 10.3 (20)	

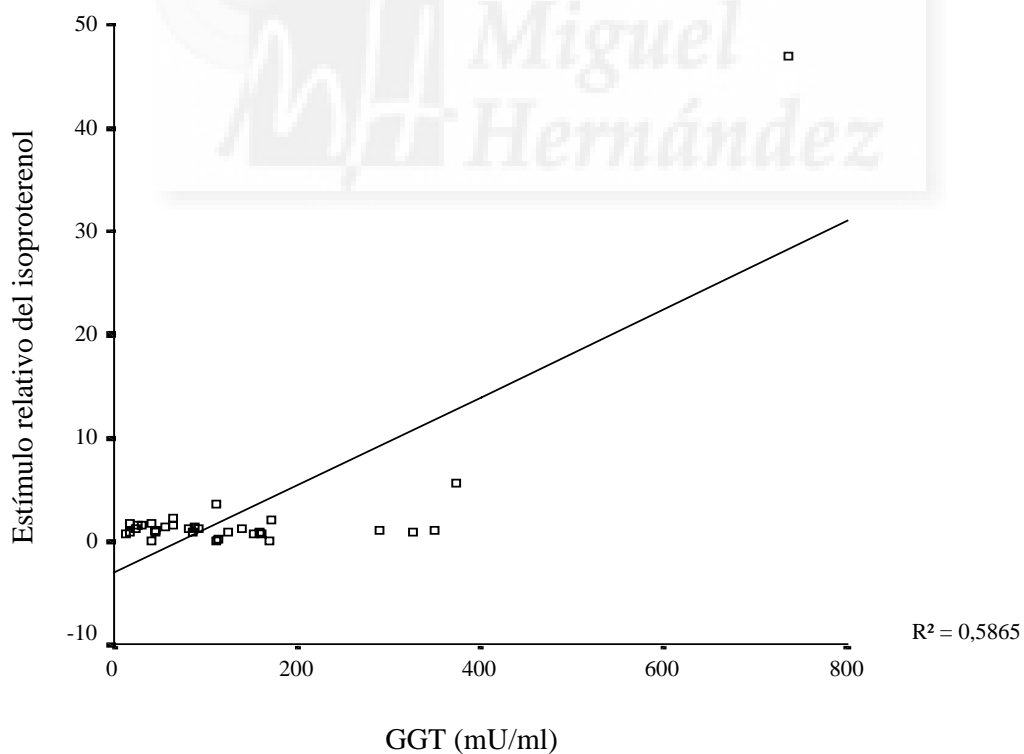
**Tabla 24.** Estímulo relativo del isoproterenol en función de las variables clínicas cualitativas en membranas de hematíes de pacientes cirróticos con HTP antes de la administración de un bolus iv de propranolol.

\* P < 0.05.

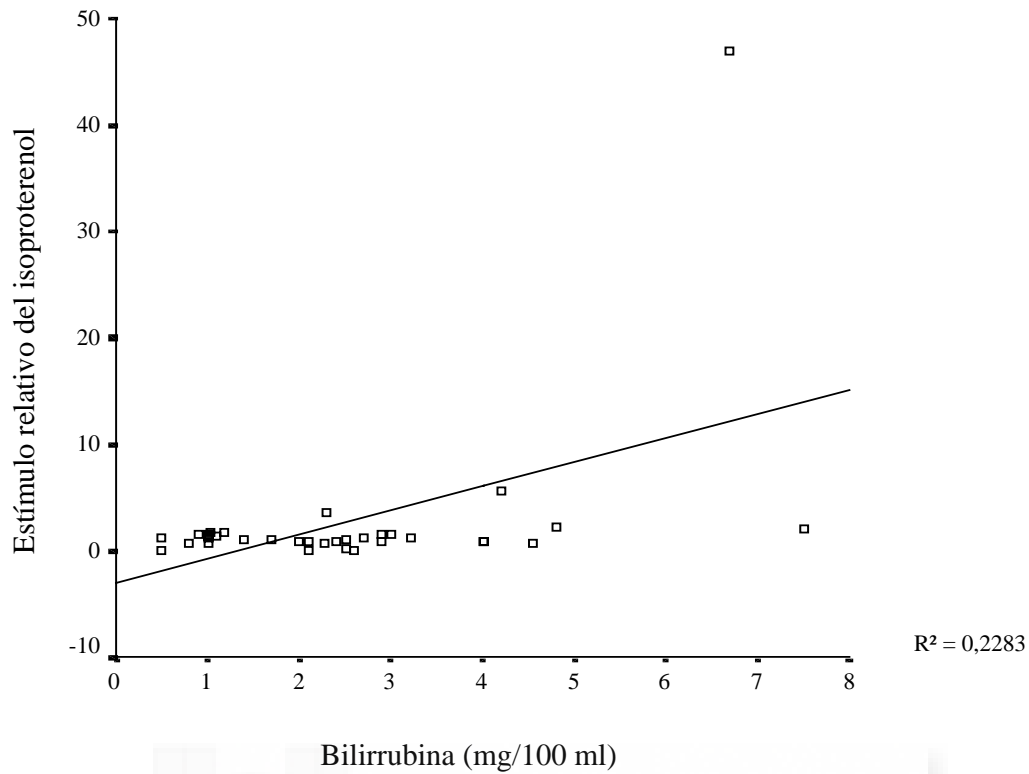
De todas las variables evaluadas, tan sólo se ha encontrado correlaciones significativas entre el estímulo relativo del isoproterenol y la frecuencia cardiaca, GGT, niveles de bilirrubina y la espironolactona en el mes previo al estudio hemodinámico inicial. En las figuras 34 a 37 se representan cada una de estas variables y su relación con el estímulo relativo del isoproterenol:



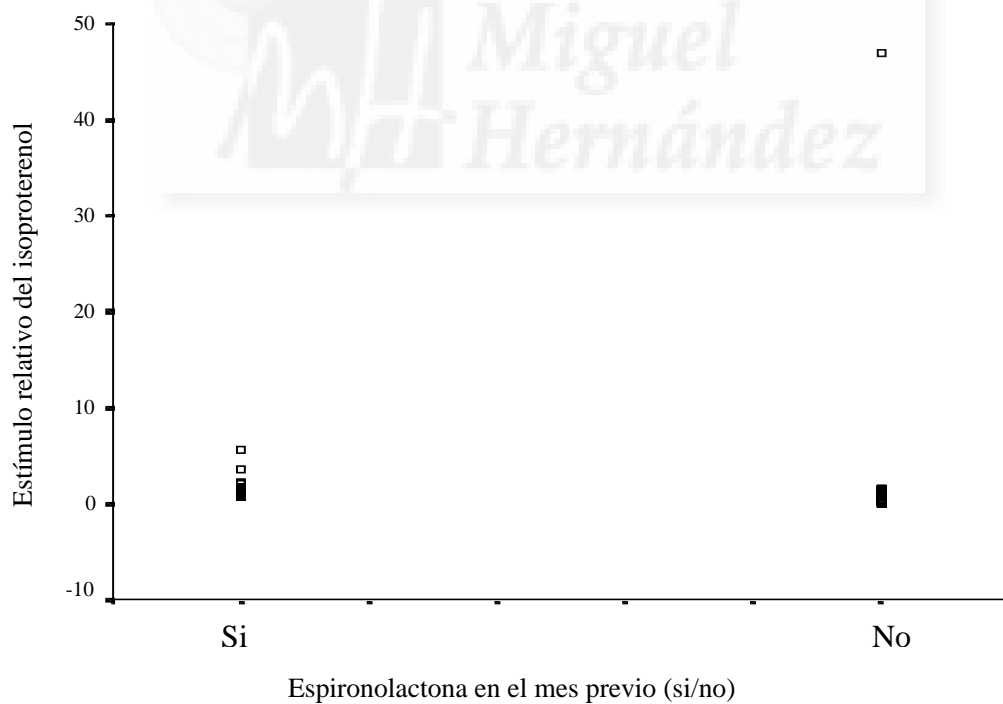
**Figura 34.** Correlación existente entre el estímulo relativo del isoproterenol y la frecuencia cardiaca en las membranas de hematíes de pacientes cirróticos con HTP durante el EH inicial.



**Figura 35.** Correlación existente entre el estímulo relativo del isoproterenol y la GGT en las membranas de hematíes de pacientes cirróticos con HTP durante el EH inicial.



**Figura 36.** Correlación existente entre el estímulo relativo del isoproterenol y los niveles de bilirrubina en las membranas de hematíes de pacientes cirróticos con HTP durante el EH inicial.



**Figura 37.** Comparación entre el estímulo relativo del isoproterenol y la toma o no de espironolactona en el mes previo al EH en las membranas de hematíes de pacientes cirróticos con HTP durante el EH inicial.

En las 4 representaciones anteriores se observa que el estímulo relativo del isoproterenol es independiente de los niveles de frecuencia cardiaca, de la GGT, de los niveles de bilirrubina y de la toma o no de espironolactona en los pacientes cirróticos con HTP durante el EH inicial.

**3.1.1.3. Análisis de las posibles correlaciones entre la capacidad de bloqueo del propranolol  $10^{-5}$  M (bloqueo relativo del propranolol) y las variables clínicas y/o demográficas en los pacientes cirróticos con HTP durante el EH inicial:**

Hemos evaluado el descenso en la producción de AMPc por parte de la AC en membranas de hematíes después de estimular con isoproterenol  $10^{-4}$  M y bloquear con propranolol  $10^{-5}$  M. Para ello, hemos calculado el número de veces que disminuye la producción de AMPc tras el bloqueo con propranolol  $10^{-5}$  M en relación al estímulo con el isoproterenol  $10^{-4}$  M (bloqueo relativo del propranolol) en membranas de hematíes de pacientes cirróticos con HTP. En la tabla 25 y 26 se muestran los resultados de estos análisis.

Variable	Coficiente correlación Pearson	P
Edad	-0.318	0.055
Peso	-0.205	0.501
Presión enclavada	0.187	0.267
Presión libre	-0.060	0.723
GPVH	0.291	-0.050
Presión arterial sistólica	0.016	0.934
Presión arterial diastólica	0.120	0.519
Presión arterial media	0.081	0.665
Frecuencia cardiaca	0.060	0.750
Puntuación Child	0.131	0.445
Leucocitos	-0.047	0.783
Hemoglobina	-0.221	0.189
Hematocrito	-0.214	0.202
Plaquetas	-0.148	0.383
GOT	-0.097	0.596
GPT	-0.141	0.442
GGT	-0.050	0.794
Fosfatasa alcalina	-0.103	0.582
Creatinina	0.041	0.821
Glucosa	-0.131	0.467
Albúmina	-0.069	0.727
Bilirrubina	-0.002	0.993
Índice de Quick	-0.093	0.588

**Tabla 25.** Análisis del grado de correlación existente entre el bloqueo relativo del propranolol y las variables clínicas cuantitativas en las membranas de hematíes de los pacientes cirróticos con HTP durante el EH basal (antes de la administración de un bolus iv de propranolol). \* P < 0.05.

Variable		Bloqueo relativo del propranolol ( $\bar{X} \pm Ds$ ) (n)	P
Somatostatina	Simple	3.7 ± 6.6 (8)	0.194
	Doble	1.0 ± 0.2 (3)	
Sexo	Masculino	3.0 ± 4.9 (24)	0.626
	Femenino	1.1 ± 0.6 (13)	
Etiología de la cirrosis	Alcohol	1.4 ± 2.1 (19)	0.084
	Virus	3.9 ± 5.9 (14)	
	Otras	0.7 ± 0.0 (2)	
	Alcohol + virus	1.4 ± 0.2 (2)	
Consumo activo de alcohol	Si	2.1 ± 3.5 (7)	0.458
	No	2.4 ± 4.2 (30)	
β-bloqueantes en el mes previo	Si	1.1 ± 0.5 (13)	0.626
	No	3.0 ± 4.9 (24)	
Nitritos en el mes previo	Si	1.27 ± 0.2 (2)	0.631
	No	2.4 ± 4.1 (35)	
Furosemida en el mes previo	Si	2.5 ± 3.5 (6)	0.703
	No	2.3 ± 4.2 (31)	
Espironolactona en el mes previo	Si	1.1 ± 0.6 (11)	0.987
	No	2.8 ± 4.7 (26)	
Lactulosa en el mes previo	Si	1.3 ± 0.2 (2)	0.589
	No	2.4 ± 4.1 (35)	
Respuesta estudio hemodinámico	Si	2.7 ± 3.8 (17)	0.684
	No	2.0 ± 4.4 (19)	

**Tabla 26.** Bloqueo relativo del propranolol en función de las variables clínicas cualitativas en las membranas de hematíes de pacientes cirróticos con HTP durante el estudio basal.

Una vez evaluadas todas las variables, no se ha encontrado ninguna correlación significativa con el bloqueo relativo del propranolol.

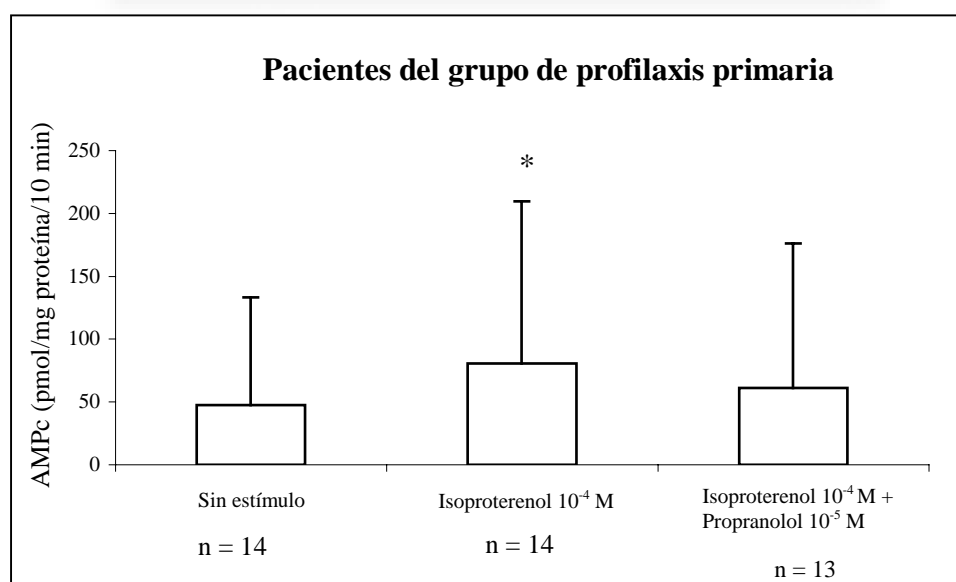
En la tabla 27 se recogen las correlaciones encontradas entre los valores de AMPc y las variables clínicas de los pacientes cirróticos con HTP incluidos en el estudio:

	Condiciones basales: antes del bolus iv de propranolol	
	Pacientes cirróticos	Relevancia de la correlación
AMPc sin estímulo	-	-
AMPc tras isoproterenol $10^{-4}$ M	-	-
Incremento en la producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M (Estímulo relativo del isoproterenol)	Frecuencia cardiaca GGT Bilirrubina Espironolactona en el mes previo	Irrelevante Irrelevante Irrelevante Irrelevante
Descenso en la producción de AMPc inducido por propranolol $10^{-5}$ M en presencia de isoproterenol $10^{-4}$ M (Bloqueo relativo del isoproterenol)	-	-

**Tabla 27.** Cuadro resumen de las correlaciones entre la actividad de la AC en membranas de hematíes y las variables clínicas de los pacientes cirróticos con HTP durante el EH inicial.

### 3.1.2. Pacientes del grupo de profilaxis primaria:

En el subgrupo de pacientes evaluados para indicación de profilaxis primaria, encontramos una actividad basal de AC en membranas de hematíes de  $47.5 \pm 86.0$  pmol AMPc/mg proteína/10 min, que se incrementó de manera estadísticamente significativa tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M a  $80.6 \pm 129.1$  pmol AMPc/mg proteína/10 min y disminuyó a  $61.0 \pm 115.3$  pmol AMPc/mg proteína/10 min en presencia de propranolol  $10^{-5}$  M (figura 31).



**Figura 38.** Actividad de la AC en membranas de hematíes en el subgrupo de pacientes de profilaxis primaria durante el EH inicial. \*  $P < 0.05$  comparado con la basal.

Para los pacientes de profilaxis primaria los valores del estímulo absoluto y relativo del isoproterenol  $10^{-4}$  M y el bloqueo relativo y absoluto del propranolol  $10^{-5}$  M se recogen en la tabla 28.

	Pacientes de profilaxis primaria
Estímulo relativo del isoproterenol $10^{-4}$ M	$0.81 \pm 1.36$ (14)
Bloqueo relativo del propranolol $10^{-5}$ M	$1.17 \pm 3.39$ (13)
Estímulo absoluto del isoproterenol $10^{-4}$ M	$33.07 \pm 53.05$ (14)
Bloqueo absoluto del propranolol $10^{-5}$ M	$-13.57 \pm 32.25$ (13)

**Tabla 28.**  $\bar{X} \pm Ds$  (n) del estímulo relativo y absoluto para el isoproterenol y el bloqueo relativo y absoluto para propranolol en membranas de hematíes de pacientes de profilaxis primaria durante el EH inicial. Tanto el estímulo relativo del isoproterenol como el bloqueo relativo del propranolol se expresan en tanto por 1 mientras que el estímulo absoluto del isoproterenol y el bloqueo absoluto del propranolol se expresan en pmol AMPc/mg proteína/10 min.

### 3.1.2.1. Análisis de las posibles correlaciones entre la actividad de la AC y las características de los pacientes de profilaxis primaria durante el EH inicial:

#### 3.1.2.1.1. Actividad basal:

Se ha estudiado la existencia de posibles correlaciones entre las diferentes variables clínicas y los valores de AMPc basales medidos antes del bolus iv de propranolol. Los resultados obtenidos se recogen en las tablas 29 y 30:

Variable	Coefficiente correlación Pearson	P
Edad	<b>0.575*</b>	<b>0.031*</b>
Peso	0.188	0.722
Presión enclavada	-0.164	0.574
Presión libre	0.012	0.969
GPVH	-0.240	0.408
Presión arterial sistólica	0.344	0.249
Presión arterial diastólica	0.552	0.050
Presión arterial media	0.484	0.094
Frecuencia cardíaca	0.292	0.333
Puntuación Child	-0.373	0.189
Leucocitos	0.199	0.496
Hemoglobina	0.243	0.403
Hematocrito	0.275	0.341
Plaquetas	0.083	0.777
GOT	-0.238	0.435
GPT	-0.143	0.642
GGT	-0.306	0.333
Fosfatasa alcalina	-0.182	0.552
Creatinina	-0.115	0.709
Glucosa	0.273	0.368
Albúmina	0.317	0.342
Bilirrubina	-0.214	0.483
Índice de Quick	<b>0.549*</b>	<b>0.042*</b>

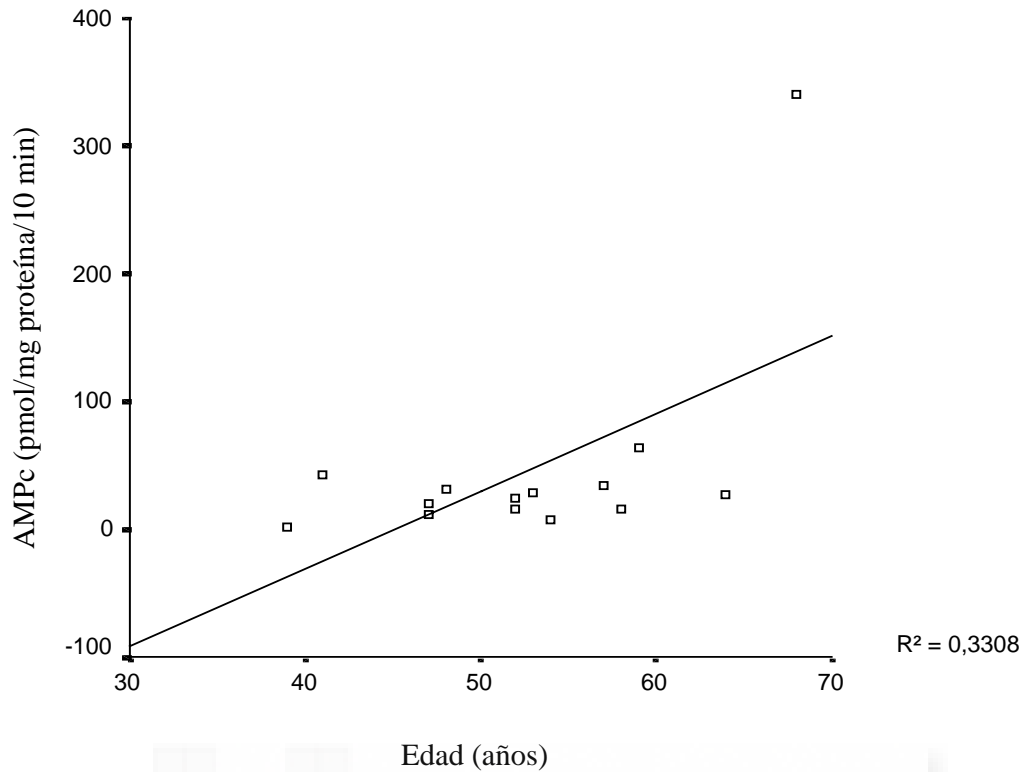
**Tabla 29.** Análisis del grado de correlación existente entre la producción de AMPc basal y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes de profilaxis primaria durante el EH inicial. \*  $P < 0.05$ .

Variable		AMPc ( $\bar{X} \pm Ds$ ) (n)	P
Sexo	Masculino	24.5 $\pm$ 18.8 (10)	0.304
	Femenino	105.1 $\pm$ 157.5 (4)	
Etiología de la cirrosis	Alcohol	25.9 $\pm$ 12.0 (7)	0.927
	Virus	98.3 $\pm$ 162.4 (4)	
	Otras	10.9 (1)	
	Alcohol + virus	39.8 $\pm$ 33.1 (2)	
Consumo activo de alcohol	Si	24.9 $\pm$ 14.8 (4)	0.945
	No	56.5 $\pm$ 101.4 (10)	
$\beta$ -bloqueantes en el mes previo	Si	71.4 $\pm$ 120.3 (7)	0.805
	No	23.7 $\pm$ 15.0 (7)	
Furosemida en el mes previo	Si	18.4 $\pm$ 22.0 (3)	0.368
	No	55.4 $\pm$ 95.9 (11)	
Espironolactona en el mes previo	Si	28.2 $\pm$ 11.6 (5)	0.606
	No	58.2 $\pm$ 107.6 (9)	
Lactulosa en el mes previo	Si	28.1 (1)	0.857
	No	48.9 $\pm$ 89.3 (13)	
Respuesta estudio hemodinámico	Si	22.8 $\pm$ 19.0 (8)	0.284
	No	90.1 $\pm$ 140.9 (5)	

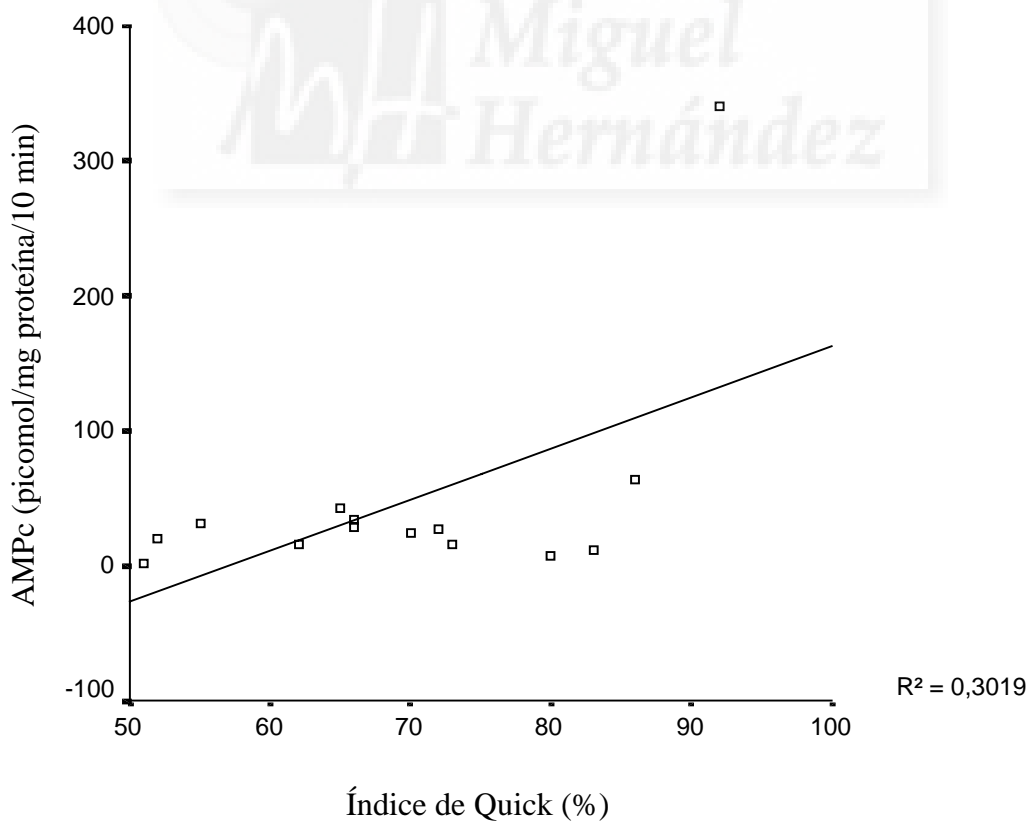
**Tabla 30.** Producción de AMPc basal (  $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas evaluadas en las membranas de hematíes de los pacientes de profilaxis primaria durante el EH inicial.

De todas las variables evaluadas, tan sólo se ha encontrado una correlación significativa entre los valores de AMPc basales y la edad y el índice de Quick. En las figuras 39 y 40, se representan cada una de estas variables y su relación con el AMPc:





**Figura 39.** Correlación entre la actividad basal de la AC en membranas de hematíes y la edad de los pacientes de profilaxis primaria durante el EH inicial.



**Figura 40.** Correlación entre la actividad basal de la AC en membranas de hematíes y el índice de Quick en los pacientes de profilaxis primaria durante el EH inicial.

La representación gráfica permite apreciar que todo el peso de la correlación significativa es a expensas de 1 caso, por lo que estos resultados deben tomarse con precaución.

### 3.1.2.1.2. Tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M:

También se ha evaluado la existencia de correlaciones entre las diferentes variables clínicas y los valores de AMPc tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M. Los resultados obtenidos se recogen en las tablas 31 y 32:

Variable	Coefficiente correlación Pearson	P
Edad	<b>0.573*</b>	<b>0.032*</b>
Peso	-0.574	0.233
Presión enclavada	-0.205	0.481
Presión libre	-0.072	0.806
GPVH	-0.228	0.433
Presión arterial sistólica	0.344	0.250
Presión arterial diastólica	<b>0.656*</b>	<b>0.015*</b>
Presión arterial media	0.534	0.060
Frecuencia cardíaca	0.430	0.143
Puntuación Child	-0.252	0.384
Leucocitos	0.107	0.716
Hemoglobina	0.219	0.451
Hematocrito	0.247	0.396
Plaquetas	0.016	0.958
GOT	-0.241	0.429
GPT	-0.185	0.546
GGT	-0.200	0.534
Fosfatasa alcalina	0.042	0.891
Creatinina	0.103	0.738
Glucosa	0.212	0.487
Albúmina	0.317	0.342
Bilirrubina	-0.094	0.759
Índice de Quick	0.504	0.066

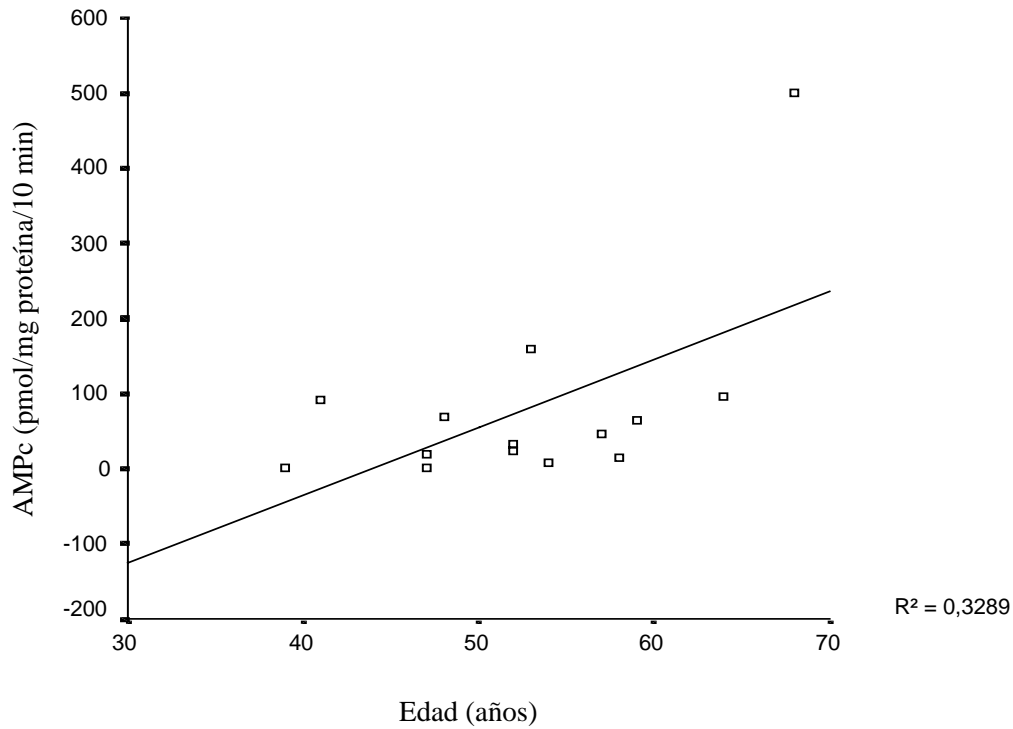
**Tabla 31.** Análisis del grado de correlación existente entre la producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M y las variables clínicas cuantitativas en las membranas de hematíes de los pacientes de profilaxis primaria durante el EH inicial. \* P < 0.05.

Variable		AMPc ( $\bar{X} \pm Ds$ ) (n)	P
Sexo	Masculino	34.0 $\pm$ 32.0 (10)	<b>0.024*</b>
	Femenino	197.1 $\pm$ 209.2 (4)	
Etiología de la cirrosis	Alcohol	55.6 $\pm$ 56.4 (7)	0.648
	Virus	157.8 $\pm$ 232.3 (4)	
	Otras	18.2 (1)	
	Alcohol + virus	44.8 $\pm$ 29.2 (2)	
Consumo activo de alcohol	Si	64.9 $\pm$ 74.8 (4)	0.839
	No	86.9 $\pm$ 148.5 (10)	
$\beta$ -bloqueantes en el mes previo	Si	116.3 $\pm$ 177.1 (7)	0.535
	No	44.8 $\pm$ 41.8 (7)	
Furosemida en el mes previo	Si	37.0 $\pm$ 47.7 (3)	0.456
	No	92.5 $\pm$ 143.1 (11)	
Espironolactona en el mes previo	Si	86.7 $\pm$ 50.8 (5)	0.083
	No	77.1 $\pm$ 160.5 (9)	
Lactulosa en el mes previo	Si	158.8 (1)	0.286
	No	74.5 $\pm$ 132.3 (13)	
Respuesta estudio hemodinámico	Si	47.7 $\pm$ 56.0	0.435
	No	135.4 $\pm$ 206.7	

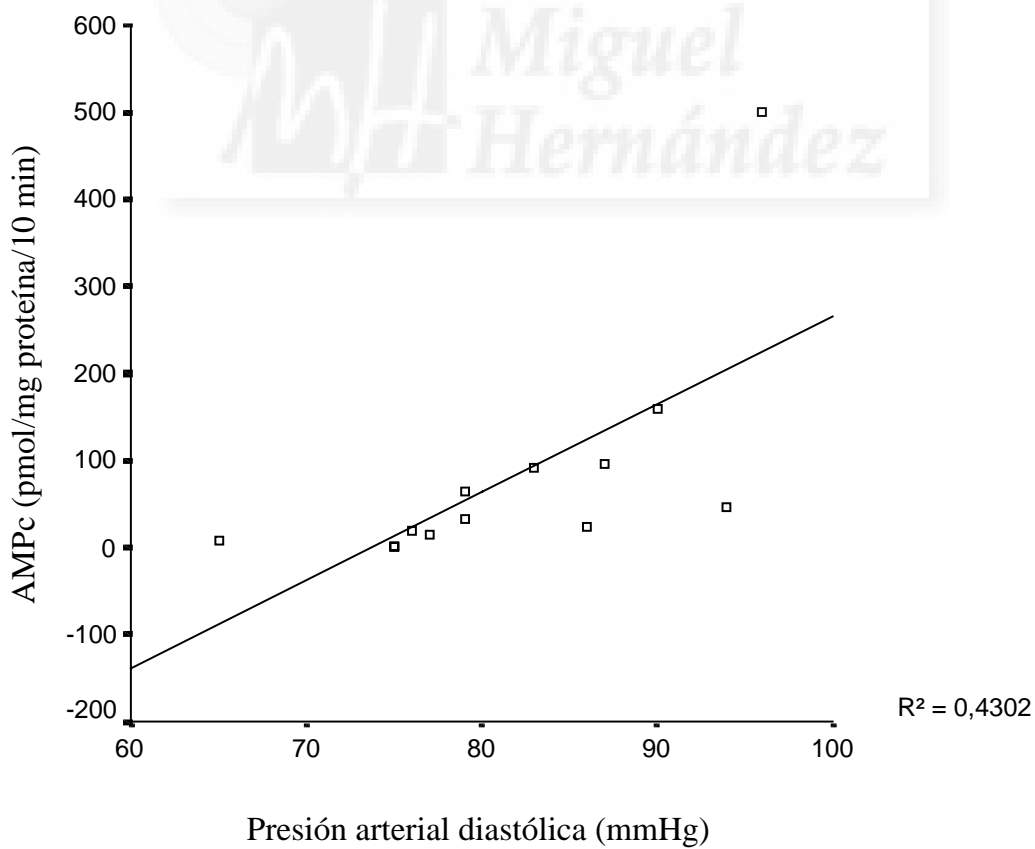
**Tabla 32.** Producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M (  $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas estudiadas en los pacientes de profilaxis primaria durante el EH inicial.

\* P < 0.05.

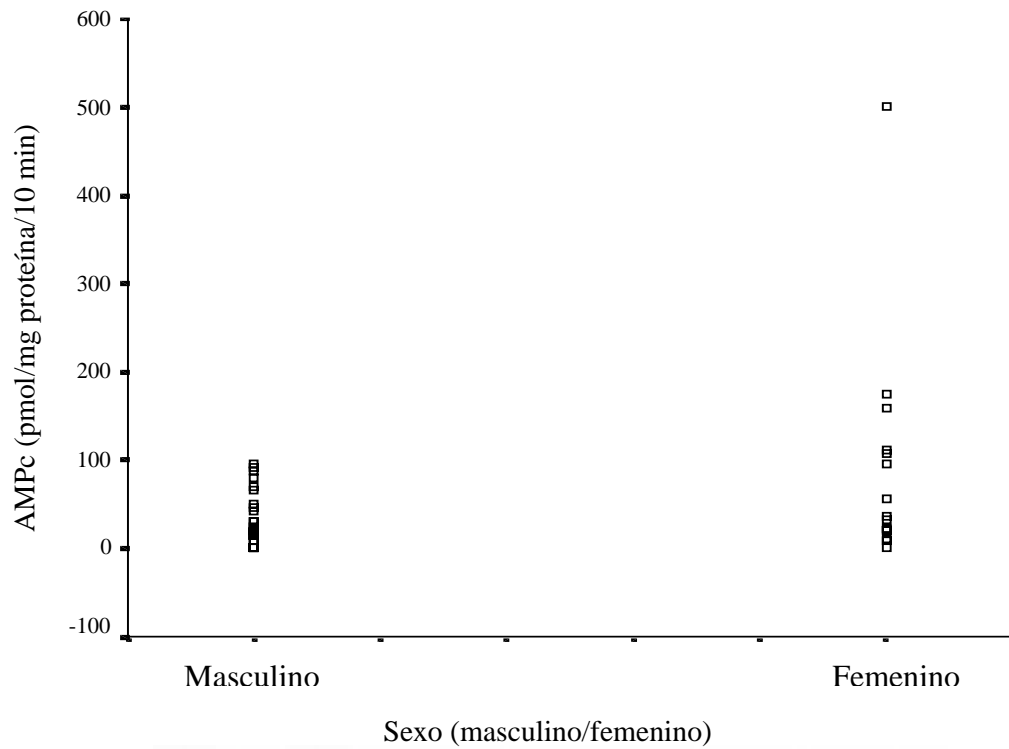
En las figuras 41 a 43, se representan cada una de estas variables y su relación con el AMPc tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M antes del bolus iv de propranolol:



**Figura 41.** Correlación entre la actividad de la AC estimulada por isoproterenol  $10^{-4}$  M en membranas de hematíes y la edad de los pacientes en profilaxis primaria durante el EH inicial.



**Figura 42.** Correlación entre la actividad de la AC estimulada por isoproterenol  $10^{-4}$  M en membranas de hematíes y la presión arterial diastólica de los pacientes en profilaxis primaria durante el EH inicial.



**Figura 43.** Comparación entre la actividad de la AC estimulada por isoproterenol  $10^{-4}$  M en membranas de hematíes y el sexo de los pacientes en profilaxis primaria durante el EH inicial

**3.1.2.2. Análisis de las posibles correlaciones entre la capacidad de respuesta al isoproterenol  $10^{-4}$  M (estímulo relativo del isoproterenol) durante el estudio basal y las variables clínicas y/o demográficas en los pacientes de profilaxis primaria:**

Hemos analizado la existencia de posibles correlaciones entre diversas características de los pacientes y el incremento en la producción de AMPc sobre la actividad basal de la AC después de estimular con isoproterenol  $10^{-4}$  M. Para ello, hemos calculado el número de veces que se incrementa la producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol en relación al valor de AMPc previo, es decir, antes del estímulo beta (estímulo relativo del isoproterenol  $10^{-4}$  M). En las tablas 33 y 34 se muestran los resultados.

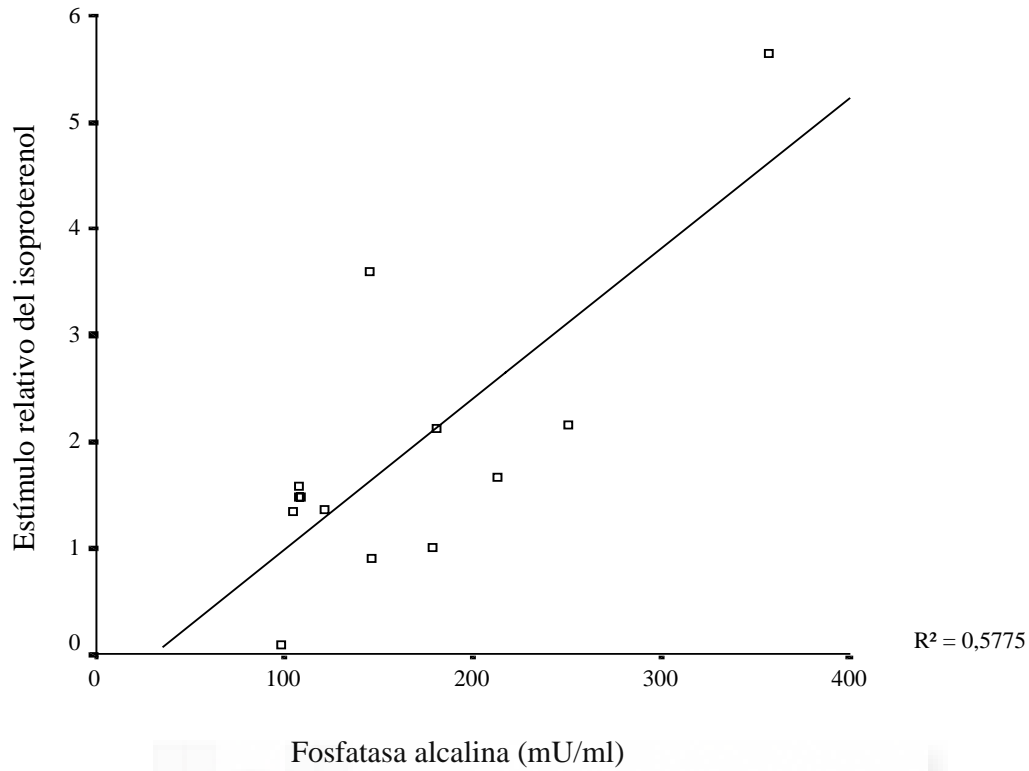
Variable	Coefficiente correlación Pearson	P
Edad	0.089	0.761
Peso	-0.740	0.093
Presión enclavada	-0.246	0.397
Presión libre	-0.420	0.135
GPVH	0.003	0.991
Presión arterial sistólica	0.116	0.706
Presión arterial diastólica	0.442	0.131
Presión arterial media	0.287	0.341
Frecuencia cardiaca	0.420	0.153
Puntuación Child	0.327	0.253
Leucocitos	-0.401	0.156
Hemoglobina	-0.032	0.912
Hematocrito	-0.050	0.865
Plaquetas	-0.292	0.311
GOT	-0.122	0.693
GPT	-0.201	0.511
GGT	0.273	0.390
Fosfatasa alcalina	<b>0.760*</b>	<b>0.003*</b>
Creatinina	<b>0.744*</b>	<b>0.004*</b>
Glucosa	-0.198	0.517
Albúmina	0.058	0.865
Bilirrubina	0.346	0.247
Índice de Quick	-0.049	0.868

**Tabla 33.** Análisis del grado de correlación existente entre el estímulo relativo del isoproterenol en membranas de hematíes y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes de profilaxis primaria durante el EH inicial. \*  $P < 0.05$ .

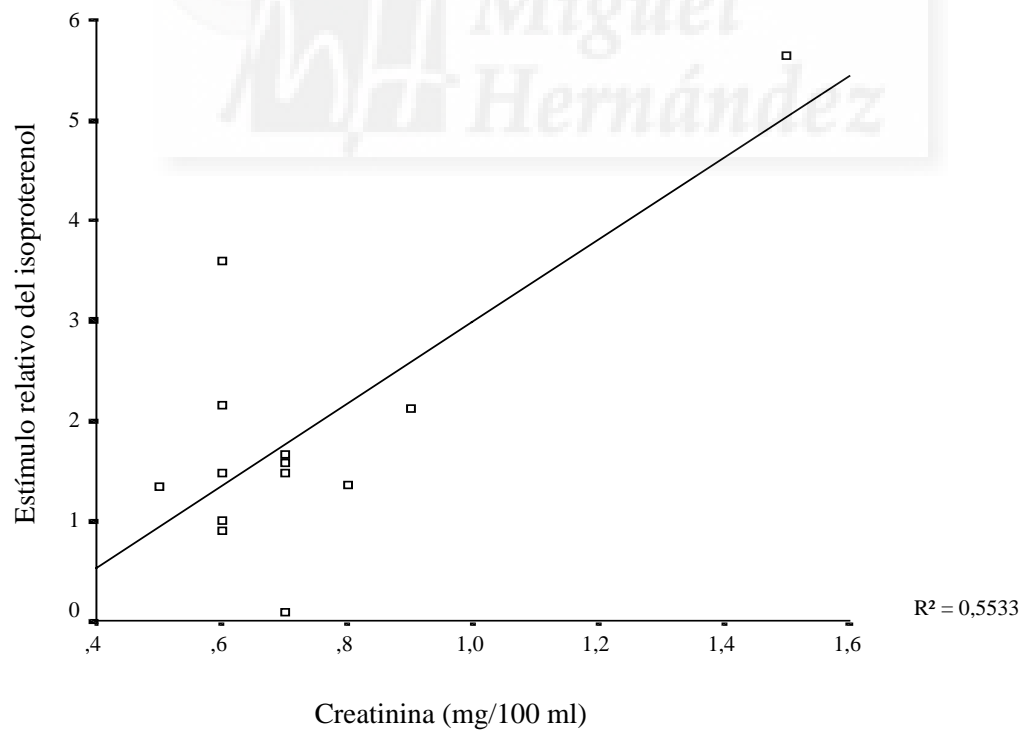
Variable		Estímulo relativo del isoproterenol ( $\bar{X} \pm Ds$ ) (n)	P
Sexo	Masculino	1.3 $\pm$ 0.7 (10)	0.240
	Femenino	3.0 $\pm$ 2.0 (4)	
Etiología de la cirrosis	Alcohol	1.9 $\pm$ 1.8 (7)	0.648
	Virus	2.0 $\pm$ 1.1 (4)	
	Otras	1.7 (1)	
	Alcohol + virus	1.3 $\pm$ 0.3 (2)	
Consumo activo de alcohol	Si	2.2 $\pm$ 2.4 (4)	0.945
	No	1.7 $\pm$ 0.8 (10)	
$\beta$ -bloqueantes en el mes previo	Si	1.9 $\pm$ 1.7 (7)	0.805
	No	1.7 $\pm$ 1.1 (7)	
Furosemida en el mes previo	Si	1.8 $\pm$ 0.3 (3)	0.291
	No	1.8 $\pm$ 1.5 (11)	
Espironolactona en el mes previo	Si	3.0 $\pm$ 1.6 (5)	<b>0.001*</b>
	No	1.1 $\pm$ 0.5 (9)	
Lactulosa en el mes previo	Si	5.6 (1)	0.943
	No	1.5 $\pm$ 0.8 (13)	
Respuesta estudio hemodinámico	Si	2.0 $\pm$ 1.8 (8)	0.284
	No	1.5 $\pm$ 0.4 (5)	

**Tabla 34.** Estímulo relativo del isoproterenol ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas en las membranas de hematíes de los pacientes de profilaxis primaria durante el EH inicial. \*  $P < 0.05$ .

De todas las variables evaluadas, tan sólo se ha encontrado correlaciones significativas entre el estímulo relativo del isoproterenol y los niveles de fosfatasa alcalina, creatinina y espironolactona en el mes previo al estudio hemodinámico inicial. En las figuras 44 a 46 se representan cada una de estas variables y su relación con el incremento en la producción de AMPc tras estimular con isoproterenol  $10^{-4}$  M:



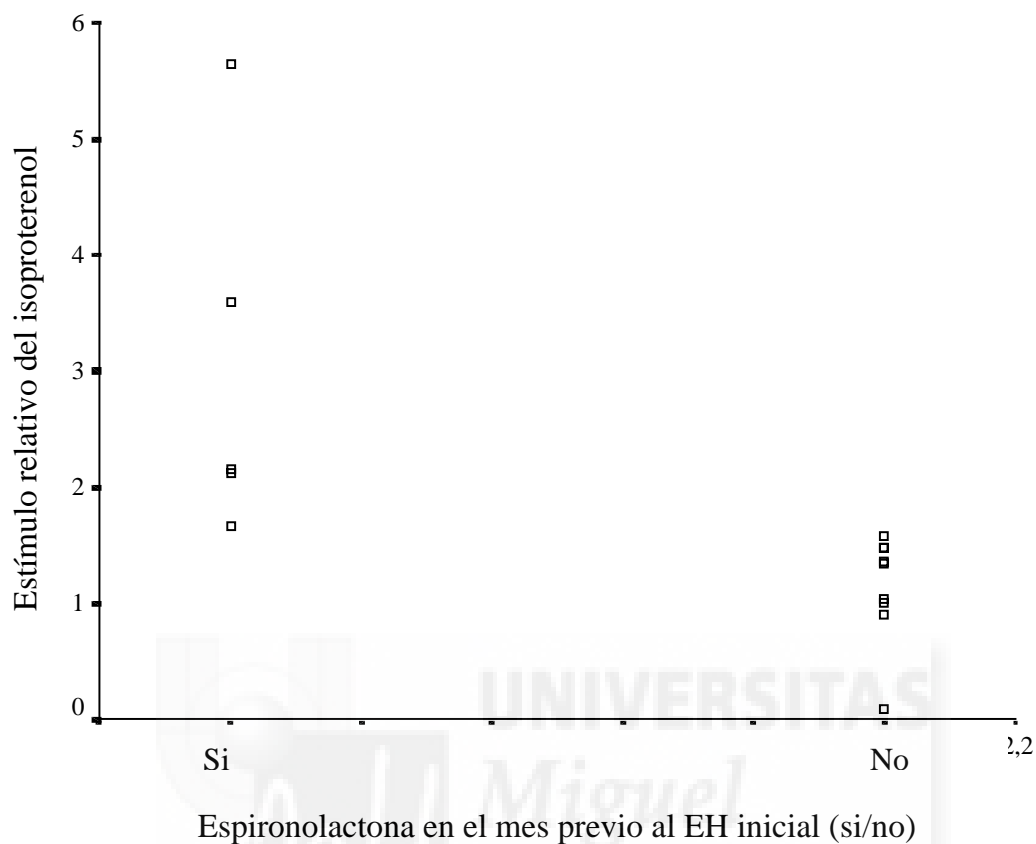
**Figura 44.** Correlación entre el estímulo relativo del isoproterenol y la fosfatasa alcalina en membranas de hematíes de pacientes de profilaxis primaria durante el EH inicial.



**Figura 45.** Correlación entre el estímulo relativo del isoproterenol en membranas de hematíes y la creatinina en los pacientes de profilaxis primaria durante el EH inicial.



En estas dos correlaciones se observa que cuanto más elevados son los valores de creatinina o fosfatasa alcalina, mayor es la capacidad de respuesta al isoproterenol  $10^{-4}$  M, aunque es a expensas de un punto.



**Figura 46.** Comparación entre el estímulo relativo del isoproterenol en membranas de hematíes y la espironolactona en el mes previo al EH inicial en los pacientes de profilaxis primaria.

De esta correlación se desprende que aquellos pacientes que tomaban espironolactona en el mes previo al EH inicial poseen mayor capacidad de respuesta al isoproterenol.

**3.1.2.3. Análisis de las posibles correlaciones entre la capacidad de bloqueo del propranolol  $10^{-5}$ M (bloqueo relativo del propranolol) y las variables clínicas y/o demográficas de los pacientes de profilaxis primaria durante el EH inicial:**

Hemos evaluado el descenso en la producción de AMPc por parte de la AC en membranas de hematíes después de estimular con isoproterenol  $10^{-4}$  M y bloquear con propranolol  $10^{-5}$  M. Para ello, hemos calculado el número de veces que disminuye la producción de AMPc tras el bloqueo con propranolol  $10^{-5}$  M en relación al estímulo con el isoproterenol  $10^{-4}$  M (bloqueo relativo del propranolol). En la tabla 35 y 36 se muestran los resultados de estos análisis.

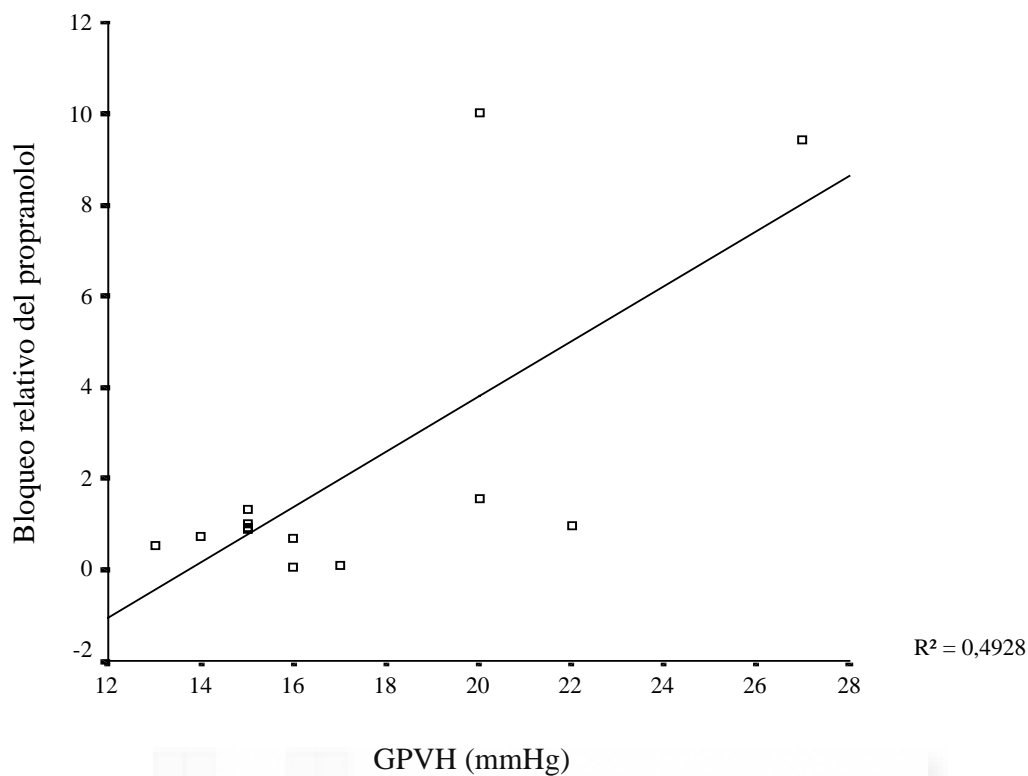
Variable	Coefficiente correlación Pearson	P
Edad	-0.473	0.102
Peso	-0.587	0.298
Presión enclavada	0.457	0.117
Presión libre	-0.070	0.821
GPVH	<b>0.702*</b>	<b>0.007*</b>
Presión arterial sistólica	-0.158	0.624
Presión arterial diastólica	-0.314	0.320
Presión arterial media	-0.251	0.431
Frecuencia cardiaca	-0.021	0.947
Puntuación Child	0.218	0.475
Leucocitos	0.087	0.778
Hemoglobina	-0.327	0.275
Hematocrito	-0.310	0.303
Plaquetas	-0.340	0.256
GOT	-0.256	0.422
GPT	-0.219	0.494
GGT	-0.107	0.754
Fosfatasa alcalina	-0.417	0.178
Creatinina	0.142	0.659
Glucosa	-0.227	0.479
Albúmina	0.027	0.941
Bilirrubina	0.13	0.967
Índice de Quick	<b>-0.608*</b>	<b>0.027*</b>

**Tabla 35.** Análisis del grado de correlación existente entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes de profilaxis primaria durante el estudio basal.\*  $P < 0.05$ .

Variable		Bloqueo relativo del propranolol ( $\bar{X} \pm Ds$ ) (n)	P
Sexo	Masculino	2.7 $\pm$ 3.7 (10)	0.077
	Femenino	0.5 $\pm$ 0.4 (3)	
Etiología de la cirrosis	Alcohol	2.3 $\pm$ 3.8 (6)	0.476
	Virus	2.7 $\pm$ 4.5 (4)	
	Otras	0.7 (1)	
	Alcohol + virus	1.4 $\pm$ 0.2 (2)	
Consumo activo de alcohol	Si	3.7 $\pm$ 5.5 (3)	0.692
	No	1.7 $\pm$ 2.7 (10)	
$\beta$ -bloqueantes en el mes previo	Si	0.9 $\pm$ 0.5 (6)	0.534
	No	3.3 $\pm$ 4.4 (7)	
Furosemida en el mes previo	Si	3.4 $\pm$ 5.2 (3)	0.811
	No	1.8 $\pm$ 2.9 (10)	
Espironolactona en el mes previo	Si	0.6 $\pm$ 0.4 (4)	0.148
	No	2.9 $\pm$ 3.9 (9)	
Lactulosa en el mes previo	Si	- (0)	-
	No	2.2 $\pm$ 3.4 (13)	
Respuesta estudio hemodinámico	Si	3.3 $\pm$ 4.4 (7)	0.639
	No	0.8 $\pm$ 0.5 (5)	

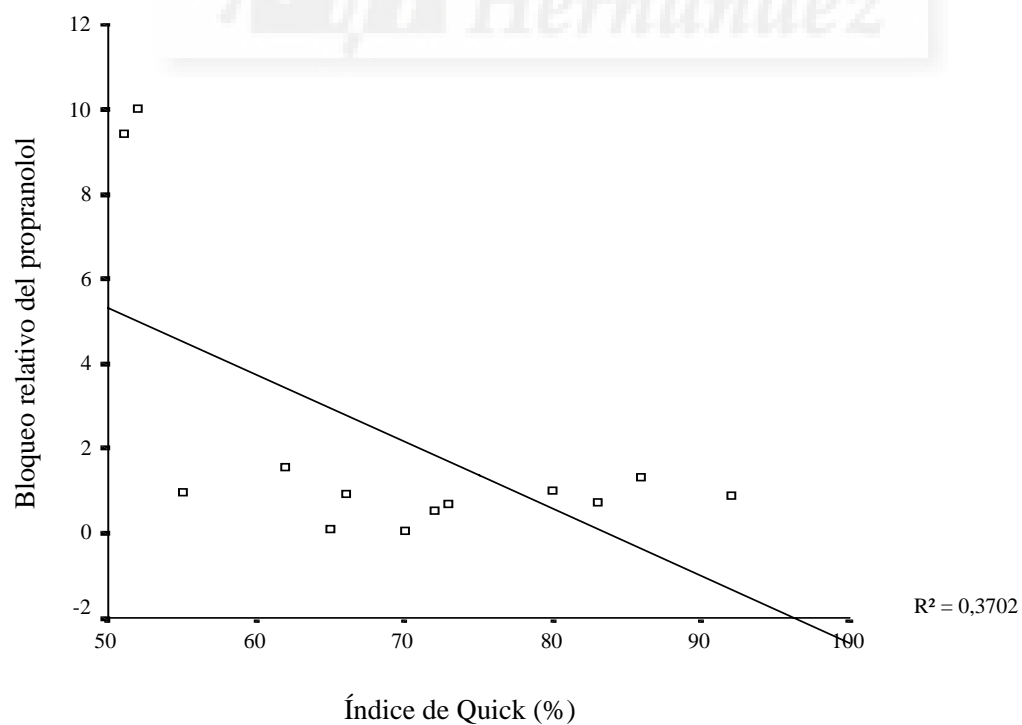
**Tabla 36.** Bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes en función de las variables clínicas cualitativas en los pacientes de profilaxis primaria durante el estudio basal.

De todas las variables evaluadas, sólo se ha encontrado una correlación significativa entre el bloqueo relativo del propranolol y el GPVH e índice de Quick. En las siguientes figuras, se representan cada una de estas variables y su relación con el incremento en la producción.



**Figura 47.** Correlación entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y el GPVH en los pacientes de profilaxis primaria durante el EH inicial.

En esta correlación se observa que, a excepción de 2 puntos, un mayor o menor GPVH, no influye sobre la capacidad de bloqueo del propranolol  $10^{-5}$  M.



**Figura 48.** Correlación entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y el índice de Quick en los pacientes de profilaxis primaria durante el EH inicial.

Al igual que ocurre con el caso anterior, si exceptuamos 2 puntos, el índice de Quick no es determinante para la capacidad de bloqueo por parte del propranolol  $10^{-5}$  M.

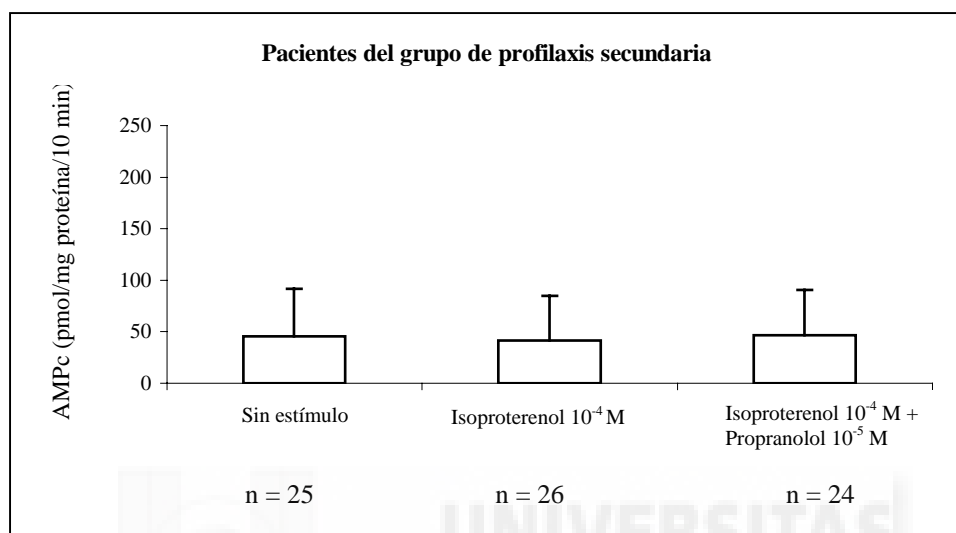
En la tabla 37 se recogen las correlaciones encontradas entre los valores de AMPc y las variables clínicas de los pacientes incluidos en el estudio:

	<b>Condiciones basales: antes del bolus iv de propranolol</b>	
	<b>Profilaxis primaria</b>	<b>Relevancia de la correlación</b>
AMPc sin estímulo	Edad, Índice de Quick	Irrelevante Irrelevante
AMPc tras isoproterenol $10^{-4}$ M	Edad, PAD, Sexo	Irrelevante Irrelevante Irrelevante
Incremento en la producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M (Estímulo relativo del isoproterenol)	Fosfatasa Alcalina Creatinina Espinolactona en el mes previo	Irrelevante Irrelevante Relevante
Descenso en la producción de AMPc inducido por propranolol $10^{-5}$ M en presencia de isoproterenol $10^{-4}$ M (Bloqueo relativo del isoproterenol)	GPVH, Índice de Quick	Irrelevante Irrelevante

**Tabla 37.** Cuadro resumen de las correlaciones entre la actividad de la AC en membranas de hematíes y las variables clínicas de los pacientes cirróticos con HTP evaluados para la profilaxis primaria en los de profilaxis primaria durante el EH inicial.

### 3.1.3. Pacientes del grupo de profilaxis secundaria:

En los pacientes cirróticos del subgrupo de profilaxis secundaria la actividad del sistema AC no estimulado en membranas de hematíes fue de  $45.3 \pm 46.1$  pmol AMPc/mg proteína/10 min que, a diferencia del subgrupo anterior, no se modificó tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M ( $41.3 \pm 43.6$  pmol AMPc/mg proteína/10 min) y tampoco varió tras el bloqueo  $\beta$  adrenérgico con propranolol  $10^{-5}$  M ( $46.5 \pm 44.1$  pmol AMPc/mg proteína/10 min). Los resultados se muestran en la figura 49.



**Figura 49.** Actividad de la AC ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en las membranas de hematíes de los pacientes de profilaxis secundaria durante el EH basal.

Para los pacientes de profilaxis secundaria los valores del estímulo absoluto y relativo del isoproterenol  $10^{-4}$  M y el bloqueo relativo y absoluto del propranolol  $10^{-5}$  M se recogen en la tabla 38. También se indican los valores obtenidos en los pacientes de profilaxis primaria para facilitar la comparación:

	Pacientes de profilaxis primaria	Pacientes de profilaxis secundaria
Estímulo relativo del isoproterenol $10^{-4}$ M	$0.81 \pm 1.36$ (14)	$-0.17 \pm 0.42$ (25)*
Bloqueo relativo del propranolol $10^{-5}$ M	$1.17 \pm 3.39$ (13)	$1.43 \pm 4.51$ (24)
Estímulo absoluto del isoproterenol $10^{-4}$ M	$33.07 \pm 53.05$ (14)	$-5.04 \pm 14.35$ (25)*
Bloqueo absoluto del propranolol $10^{-5}$ M	$-13.57 \pm 32.25$ (13)	$1.87 \pm 21.43$ (24)

**Tabla 38.**  $\bar{X} \pm Ds$  (n) del estímulo relativo y absoluto para el isoproterenol y el bloqueo relativo y absoluto para propranolol en membranas de hematíes de pacientes de profilaxis primaria y secundaria. Tanto el estímulo relativo del isoproterenol como el bloqueo relativo del propranolol se expresan en tanto por 1 mientras que el estímulo absoluto del isoproterenol y el bloqueo absoluto del propranolol se expresan en pmol AMPc/mg proteína/10 min. \*  $P < 0.05$  comparado con los pacientes de profilaxis primaria.

Entre los pacientes de profilaxis primaria y secundaria no se han observado diferencias significativas en cuanto al bloqueo relativo y absoluto del propranolol. Sin embargo, los pacientes de profilaxis secundaria tienen estímulo absoluto y relativo del isoproterenol significativamente inferior al de los pacientes de profilaxis primaria.

Así pues, existe un comportamiento diferente entre los 2 subgrupos de pacientes cirróticos estudiados, con una pérdida de la capacidad del isoproterenol para incrementar la actividad del sistema AC en membranas de hematíes en los pacientes del grupo de profilaxis secundaria.

### 3.1.3.1 Análisis de las posibles correlaciones entre la actividad de la AC y las características de los pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial:

#### 3.1.3.1.1. Actividad basal:

Al igual que con los pacientes de profilaxis primaria, se ha buscado la existencia de posibles correlaciones entre las diferentes variables clínicas y los valores de AMPc basales antes del bolus iv de propranolol. Los resultados obtenidos se recogen en las tablas 39 y 40.

Variable	Coefficiente correlación Pearson	P
Bolsas sangre transfundidas	-0.007	0.984
Edad	-0.160	0.444
Peso	-0.085	0.842
Presión enclavada	0.003	0.988
Presión libre	0.171	0.415
GPVH	-0.067	0.749
Presión arterial sistólica	<b>-0.566*</b>	<b>0.009*</b>
Presión arterial diastólica	-0.209	0.377
Presión arterial media	-0.430	0.058
Frecuencia cardiaca	<b>-0.495*</b>	<b>0.026*</b>
Puntuación Child	0.381	0.066
Leucocitos	0.159	0.449
Hemoglobina	0.149	0.478
Hematocrito	0.121	0.565
Plaquetas	-0.036	0.864
GOT	-0.169	0.464
GPT	-0.326	0.149
GGT	-0.330	0.155
Fosfatasa alcalina	-0.219	0.354
Creatinina	-0.210	0.348
Glucosa	-0.367	0.093
Albúmina	-0.322	0.179
Bilirrubina	0.264	0.248
Quick	<b>-0.496*</b>	<b>0.014*</b>

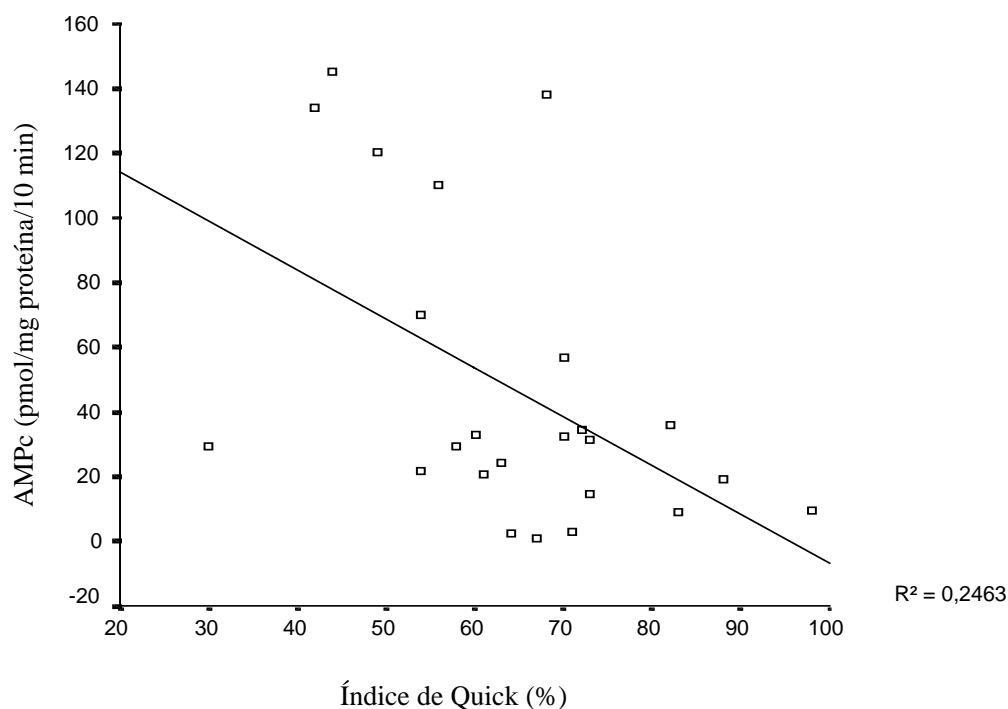
**Tabla 39.** Análisis del grado de correlación existente entre la producción de AMPc basal en membranas de hematíes y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.  
\* P < 0.05.

Variable		AMPc ( $\bar{X} \pm Ds$ ) (n)	P
Somatostatina	Simple	44.3 $\pm$ 53.7 (8)	0.376
	Doble	62.5 $\pm$ 50.0 (3)	
Sexo	Masculino	35.2 $\pm$ 37.1 (15)	0.238
	Femenino	60.5 $\pm$ 55.8 (10)	
Etiología de la cirrosis	Alcohol	55.0 $\pm$ 52.4 (13)	0.832
	Virus	38.4 $\pm$ 40.4 (10)	
Consumo activo de alcohol	Si	85.8 $\pm$ 64.5 (4)	0.262
	No	37.6 $\pm$ 39.3 (21)	
$\beta$ -bloqueantes en el mes previo	Si	35.9 $\pm$ 37.4 (9)	0.522
	No	50.6 $\pm$ 50.8 (16)	
Nitritos en el mes previo	Si	52.8 $\pm$ 59.2 (2)	0.969
	No	44.3 $\pm$ 45.7 (23)	
Furosemida en el mes previo	Si	25.3 $\pm$ 8.8 (2)	0.733
	No	47.1 $\pm$ 47.7 (23)	
Espironolactona en el mes previo	Si	39.0 $\pm$ 36.9 (7)	1.000
	No	47.8 $\pm$ 50.0 (18)	
Lactulosa en el mes previo	Si	120.2 (1)	0.320
	No	42.2 $\pm$ 44.4 (24)	
Respuesta estudio hemodinámico	Si	47.2 $\pm$ 42.0 (10)	0.428
	No	44.1 $\pm$ 50.1 (15)	

**Tabla 40.** Producción de AMPc basal (  $\bar{X} \pm Ds$ ) en membranas de hematíes en función de las variables cualitativas clínicas estudiadas en los pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.

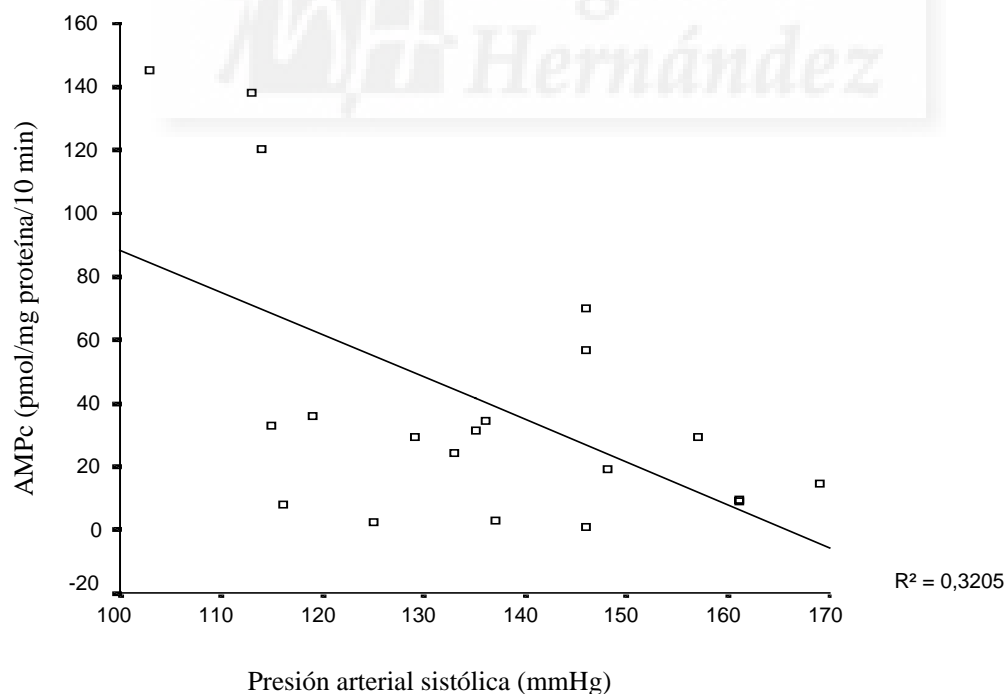
De todas las variables evaluadas, tan sólo se ha encontrado una correlación significativa entre la producción basal de AMPc y la presión arterial sistólica, el índice de Quick y la frecuencia cardiaca. En las figuras 50 a 52, se representan cada una de estas variables y su relación con el AMPc basal:





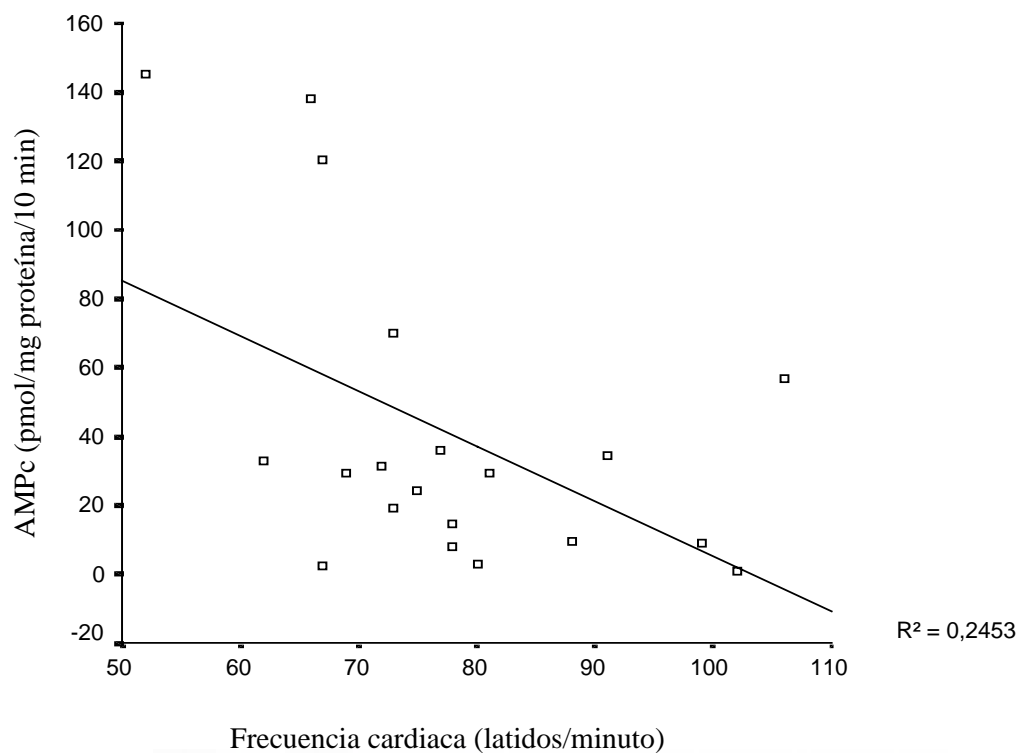
**Figura 50.** Correlación entre la producción basal de AMPc en membranas de hematíes y el índice de Quick en pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.

Se observa que en los pacientes con valores bajos del índice de Quick las cifras de producción de AMPc son superiores, disminuyendo a medida que aumenta el índice de Quick.



**Figura 51.** Correlación entre la producción basal de AMPc en membranas de hematíes y la presión arterial sistólica en pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.

Igualmente, valores bajos de tensión arterial sistólica se asocian a valores más elevados de producción basal de AMPc.



**Figura 52.** Correlación entre la producción basal de AMPc en membranas de hematíes y la frecuencia cardiaca en pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.

Los valores más altos de producción basal de AMPc se produjeron en aquellos pacientes con valores más bajos de frecuencia cardiaca.

3.1.3.1.2. Tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M:

Se ha buscado la existencia de posibles correlaciones entre las diferentes variables clínicas y los valores de AMPc producidos tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M. Los resultados obtenidos se recogen en las tablas 41 y 42:

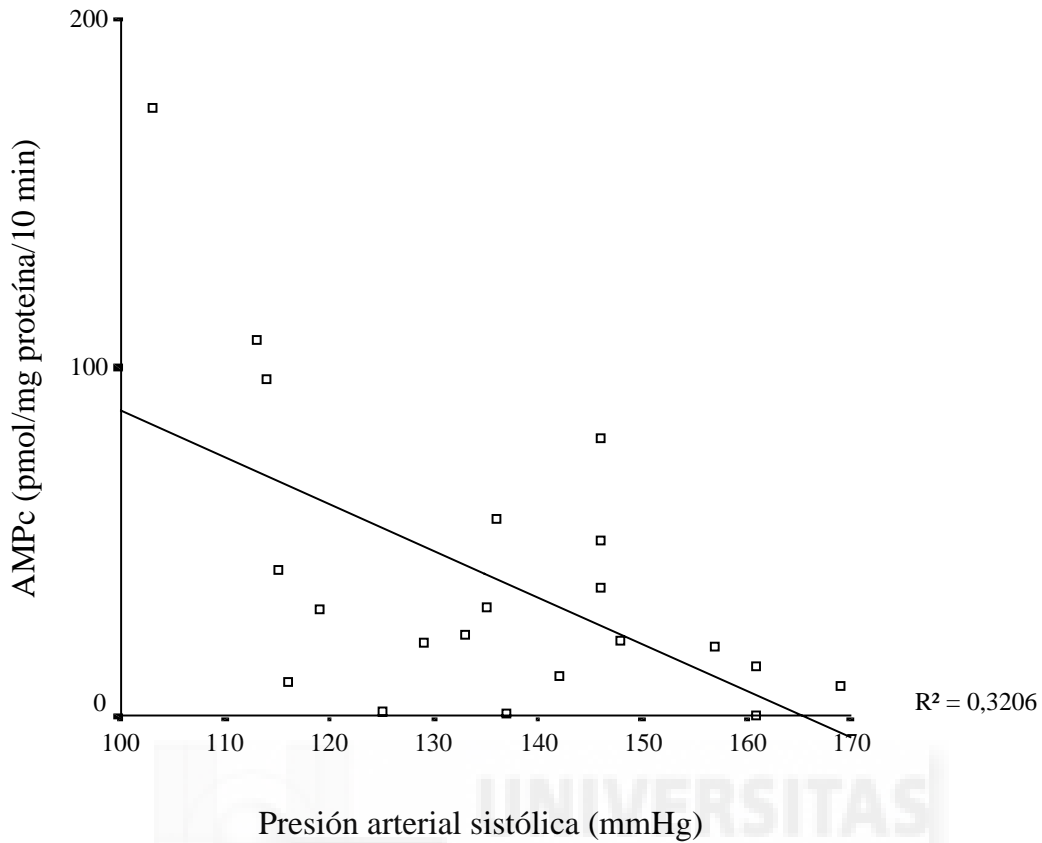
Variable	Coefficiente correlación Pearson	P
Bolsas sangre transfundidas	0.092	0.776
Edad	-0.191	0.349
Peso	-0.393	0.296
Presión enclavada	-0.065	0.754
Presión libre	0.071	0.729
GPVH	-0.102	0.620
Presión arterial sistólica	<b>-0.566*</b>	<b>0.007*</b>
Presión arterial diastólica	-0.217	0.345
Presión arterial media	<b>-0.435*</b>	<b>0.049*</b>
Frecuencia cardiaca	<b>-0.461*</b>	<b>0.035*</b>
Puntuación Child	0.354	0.083
Leucocitos	0.126	0.539
Hemoglobina	0.214	0.293
Hematocrito	0.152	0.459
Plaquetas	-0.126	0.539
GOT	-0.078	0.731
GPT	-0.298	0.177
GGT	-0.111	0.633
Fosfatasa alcalina	-0.232	0.312
Creatinina	-0.279	0.198
Glucosa	<b>-0.428*</b>	<b>0.042*</b>
Albúmina	-0.260	0.268
Bilirrubina	0.407	0.060
Quick	<b>-0.498*</b>	<b>0.011*</b>

**Tabla 41.** Análisis del grado de correlación existente entre la producción de AMPc en membranas de hematíes tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.\*  $P < 0.05$ .

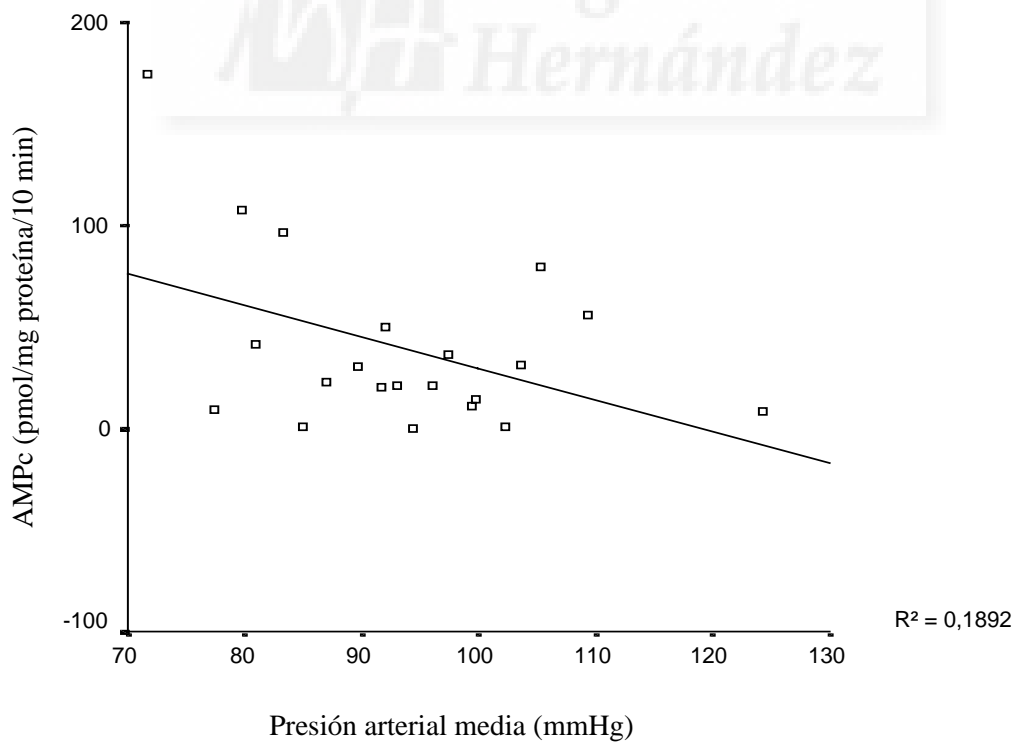
Variable		AMPc ( $\bar{X} \pm Ds$ ) (n)	P
Somatostatina	Simple	38.5 $\pm$ 57.6 (9)	0.145
	Doble	64.9 $\pm$ 28.4 (3)	
Sexo	Masculino	33.3 $\pm$ 31.8 (15)	0.413
	Femenino	52.0 $\pm$ 55.7 (11)	
Etiología de la cirrosis	Alcohol	50.2 $\pm$ 41.2 (13)	0.424
	Virus	36.1 $\pm$ 48.7 (11)	
Consumo activo de alcohol	Si	85.7 $\pm$ 28.7 (4)	<b>0.009*</b>
	No	32.8 $\pm$ 40.7 (22)	
$\beta$ -bloqueantes en el mes previo	Si	34.5 $\pm$ 34.8 (9)	0.672
	No	44.8 $\pm$ 48.2 (17)	
Nitritos en el mes previo	Si	43.6 $\pm$ 46.0 (3)	1.000
	No	41.0 $\pm$ 44.3 (23)	
Furosemida en el mes previo	Si	21.2 $\pm$ 10.1 (3)	0.762
	No	43.9 $\pm$ 45.6 (23)	
Espironolactona en el mes previo	Si	34.0 $\pm$ 29.0 (8)	0.978
	No	44.5 $\pm$ 49.1 (18)	
Lactulosa en el mes previo	Si	53.8 $\pm$ 60.5 (2)	0.812
	No	40.2 $\pm$ 43.4 (24)	
Respuesta estudio hemodinámico	Si	40.5 $\pm$ 35.9 (10)	0.698
	No	41.7 $\pm$ 48.8 (16)	

**Tabla 42.** Producción de AMPc (  $\bar{X} \pm Ds$ ) en membranas de hematíes tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M en función de las variables cualitativas clínicas estudiadas en los pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial. \* P < 0.05.

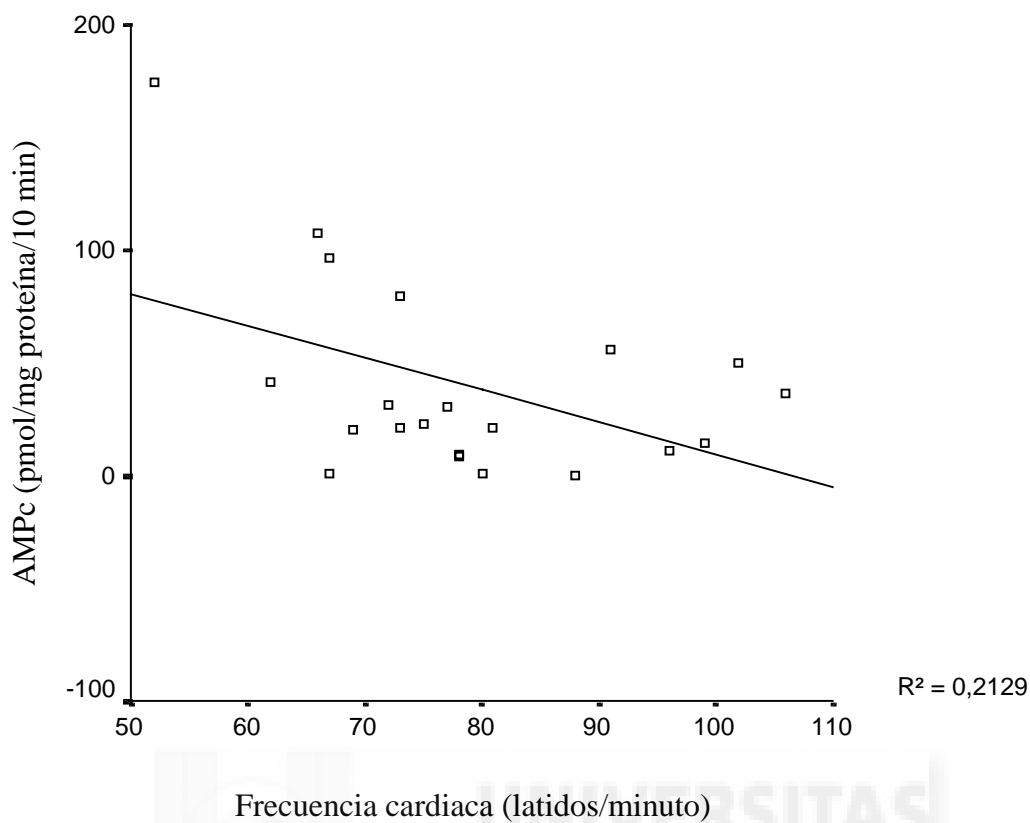
De todas las variables evaluadas, se ha encontrado una correlación significativa entre los valores de AMPc tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M con la presión arterial sistólica, presión arterial media, frecuencia cardiaca, niveles de glucosa, índice de Quick y el consumo activo de alcohol. En las figuras 53 a 58, se representan cada una de estas variables y su relación con la producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M en pacientes de profilaxis secundaria.



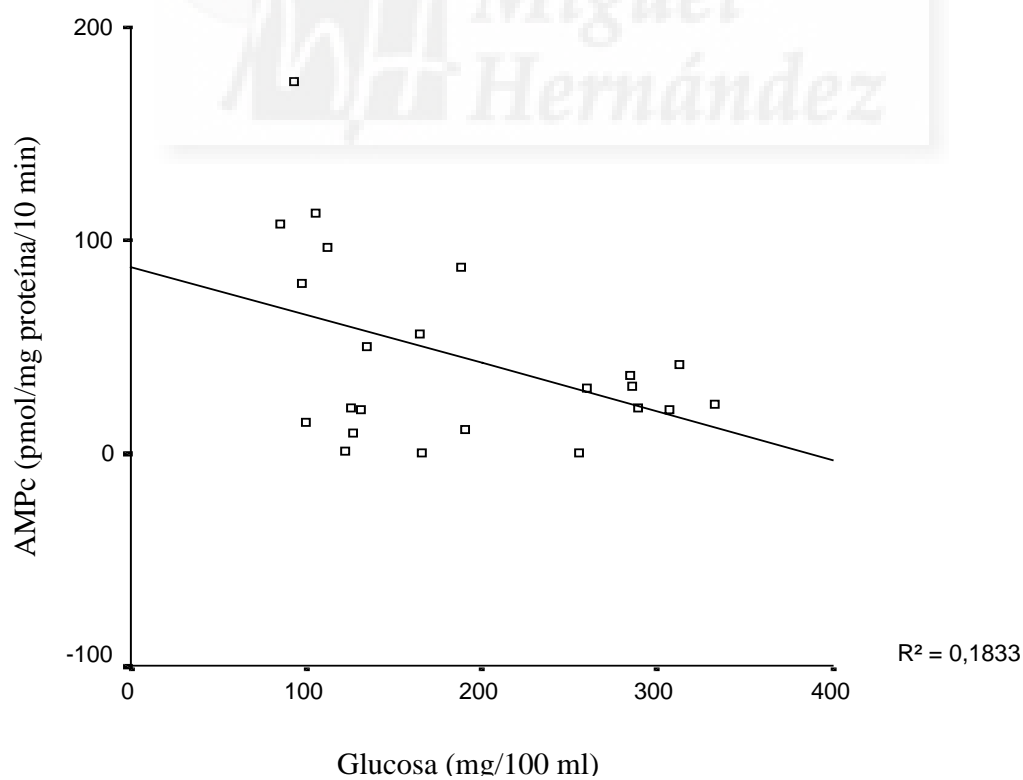
**Figura 53.** Correlación entre la producción de AMPc en membranas de hematíes en respuesta a isoproterenol  $10^{-4}$  M y la presión arterial sistólica en los pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.



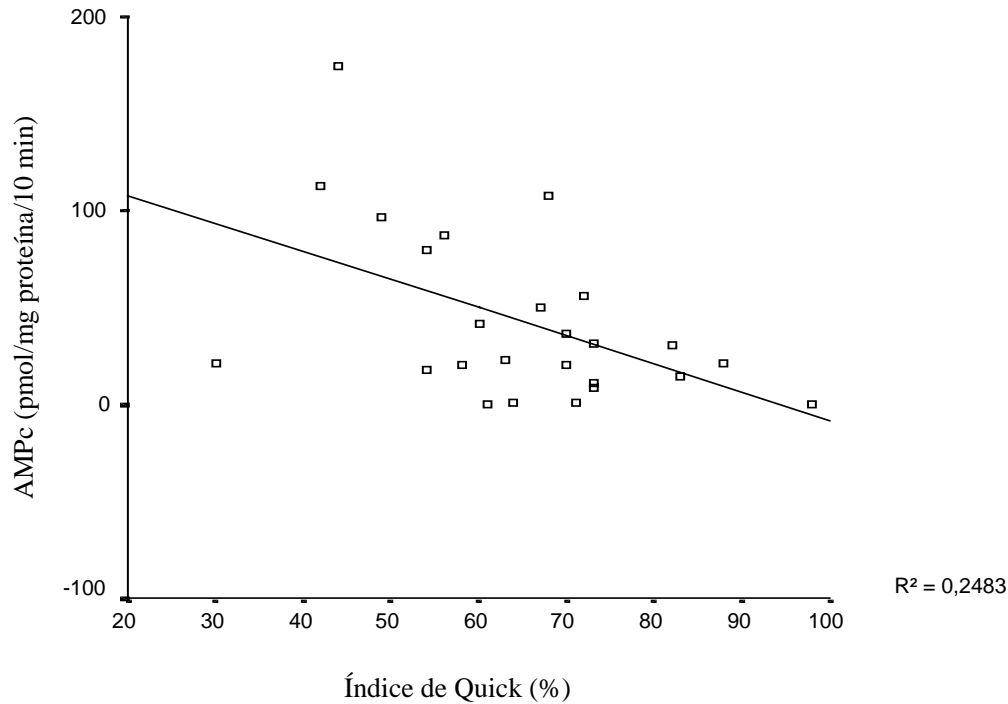
**Figura 54.** Correlación entre la producción de AMPc en membranas de hematíes en respuesta a isoproterenol  $10^{-4}$  M y la presión arterial media en los pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.



**Figura 55.** Correlación entre la producción de AMPc en respuesta a isoproterenol  $10^{-4}$  M en membranas de hematíes y la frecuencia cardiaca en los pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.

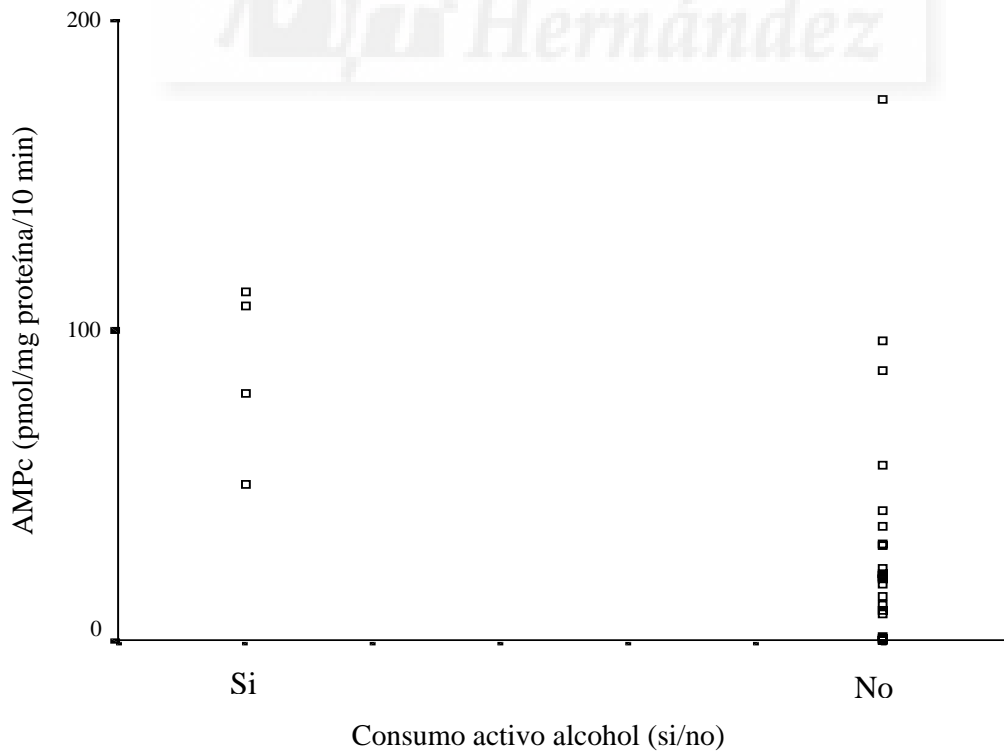


**Figura 56.** Correlación entre la producción de AMPc en respuesta a isoproterenol  $10^{-4}$  M en membranas de hematíes y los niveles de glucosa en los pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.



**Figura 57.** Correlación entre la producción de AMPc en respuesta a isoproterenol  $10^{-4}$  M en membranas de hematíes y el índice de Quick en los pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.

De todas estas correlaciones se desprende que aquellos pacientes con niveles bajos de presión arterial sistólica, media, frecuencia cardiaca, niveles de glucosa e índice de Quick, poseen niveles más elevados de AMPc.



**Figura 58.** Comparación entre la producción de AMPc en respuesta a isoproterenol  $10^{-4}$  M en membranas de hematíes y el consumo activo de alcohol en los pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.

**3.1.3.2. Análisis de las posibles correlaciones entre la capacidad de respuesta al isoproterenol  $10^{-4}$  M (estímulo relativo del isoproterenol) y las variables clínicas y/o demográficas en los pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial o basal:**

Hemos evaluado el incremento en la producción de AMPc por parte de la AC después de estimular con isoproterenol  $10^{-4}$  M. Para ello, hemos calculado el número de veces que se incrementa la producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol en relación al valor de AMPc previo, es decir, antes del estímulo beta (estímulo relativo del isoproterenol). En las tablas 43 y 44 se muestran los resultados de esta evaluación.

Variable	Coefficiente correlación Pearson	P
Bolsas de sangre transfundidas	0.223	0.485
Edad	0.015	0.945
Peso	-0.535	0.171
Presión enclavada	0.026	0.903
Presión libre	-0.148	0.480
GPVH	0.121	0.564
Presión arterial sistólica	0.125	0.600
Presión arterial diastólica	-0.126	0.596
Presión arterial media	-0.025	0.917
Frecuencia cardiaca	0.415	0.069
Puntuación Child	0.100	0.641
Leucocitos	0.365	0.073
Hemoglobina	0.247	0.233
Hematocrito	0.229	0.271
Plaquetas	-0.030	0.886
GOT	<b>0.515*</b>	<b>0.017*</b>
GPT	0.236	0.304
GGT	<b>0.902*</b>	<b>0.000*</b>
Fosfatasa alcalina	0.159	0.504
Creatinina	0.089	0.693
Glucosa	-0.140	0.535
Albúmina	-0.062	0.800
Bilirrubina	<b>0.646*</b>	<b>0.002*</b>
Índice de Quick	0.030	0.889

**Tabla 43.** Análisis del grado de correlación existente entre el estímulo relativo del isoproterenol en membranas de hematíes y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.\*  $P < 0.05$ .

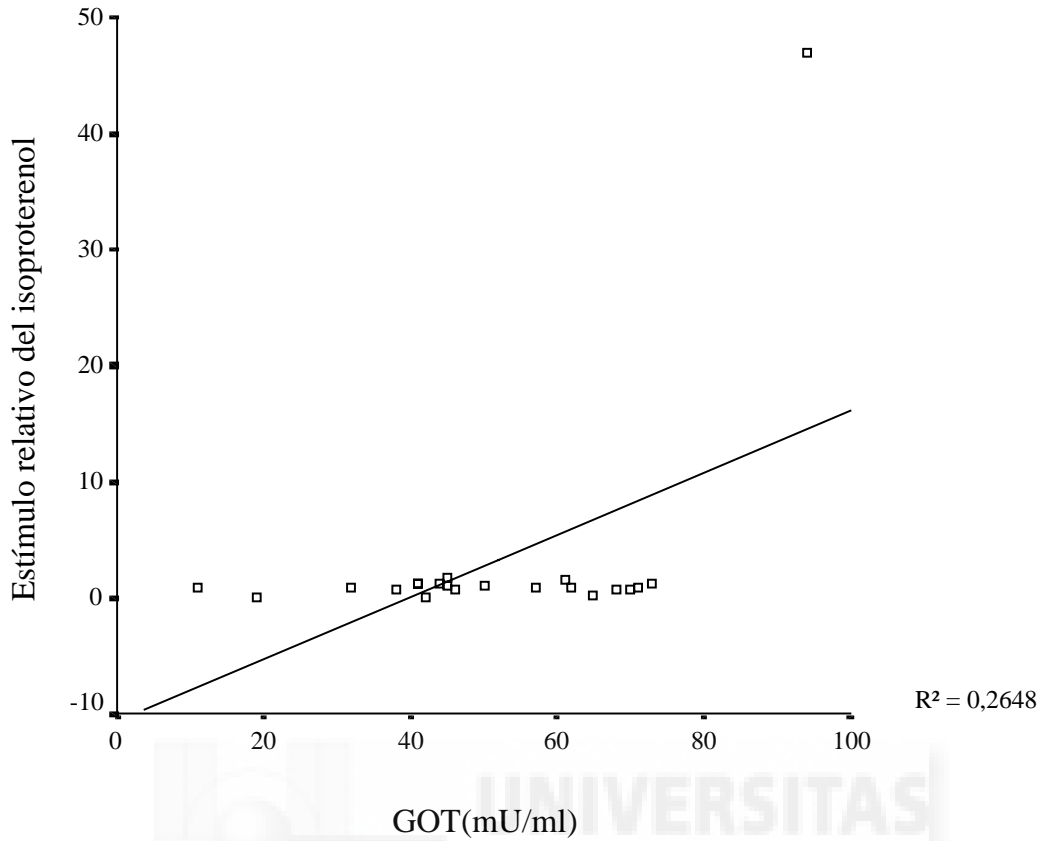


Variable		Estímulo relativo del isoproterenol ( $\bar{X} \pm Ds$ ) (n)	P
Somatostatina	Simple	0.7 ± 0.4 (8)	0.085
	Doble	1.2 ± 0.4 (3)	
Sexo	Masculino	3.9 ± 11.9 (15)	0.849
	Femenino	0.8 ± 0.4 (10)	
Etiología de la cirrosis	Alcohol	4.4 ± 12.8 (13)	0.832
	Virus	0.9 ± 0.5 (10)	
	Otras	0.5 ± 0.7 (2)	
	Alcohol + virus	(0)	
Consumo activo de alcohol	Si	12.4 ± 23.0 (4)	0.262
	No	0.8 ± 0.4 (21)	
β-bloqueantes en el mes previo	Si	0.9 ± 0.5 (9)	0.934
	No	3.7 ± 11.5 (16)	
Nitritos en el mes previo al estudio	Si	1.0 ± 0.5 (3)	0.783
	No	2.9 ± 9.8 (22)	
Furosemida en el mes previo	Si	1.1 ± 0.1 (2)	0.427
	No	2.8 ± 9.6 (23)	
Espironolactona en el mes previo	Si	1.1 ± 0.4 (7)	0.244
	No	3.3 ± 10.9 (18)	
Lactulosa en el mes previo	Si	0.8 (1)	0.960
	No	2.7 ± 9.4 (24)	
Respuesta estudio hemodinámico	Si	0.9 ± 0.4 (10)	0.807
	No	3.9 ± 11.9 (15)	

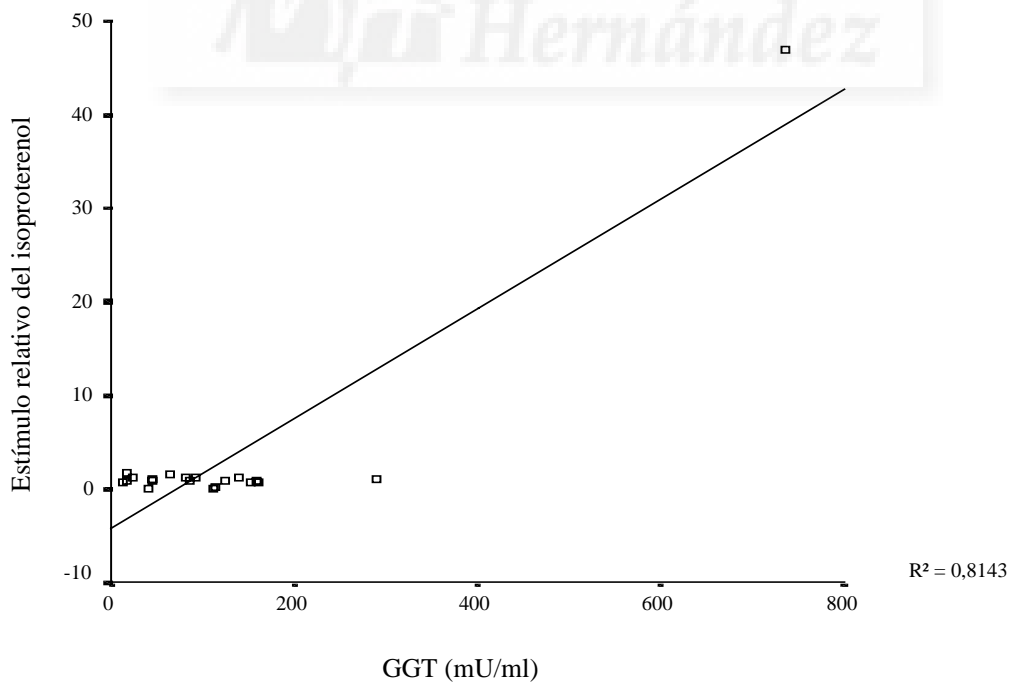
**Tabla 44.** Estímulo relativo del isoproterenol ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en membranas de hematíes en función de las variables clínicas cualitativas en los pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.

De todas las variables evaluadas, sólo se ha encontrado correlación significativa entre el estímulo relativo del isoproterenol y los niveles de GOT, GGT y bilirrubina en los pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.

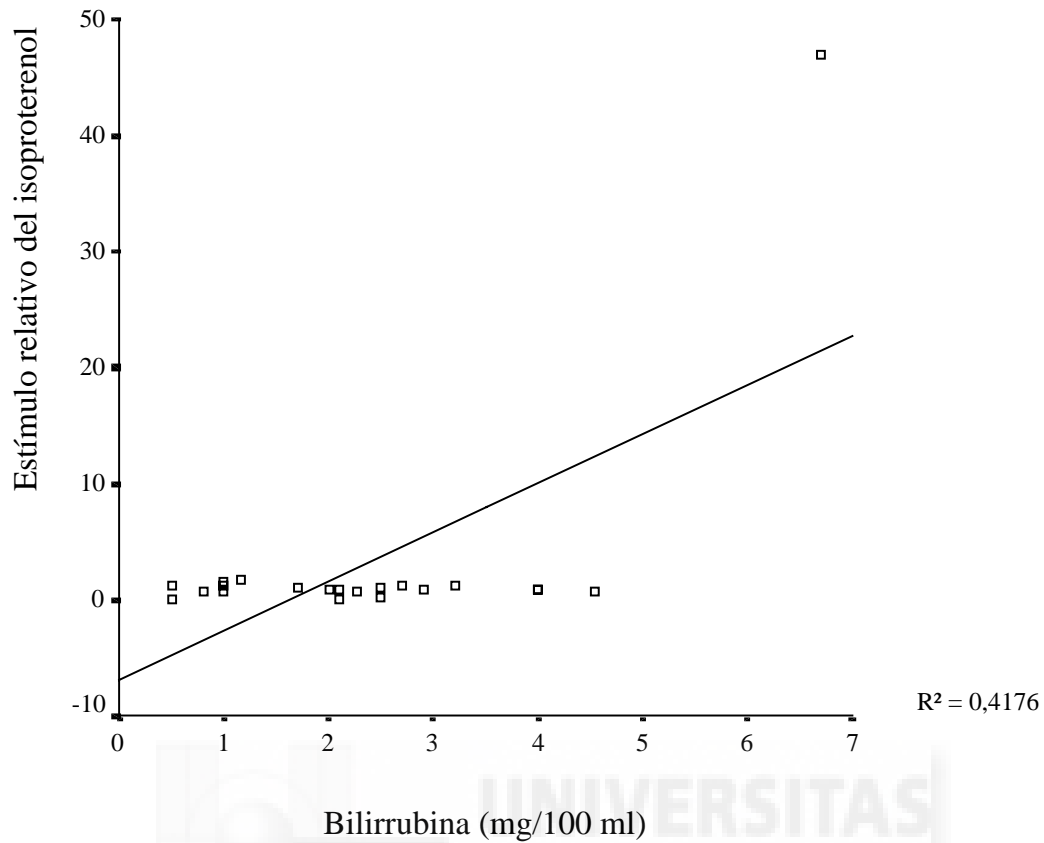
En las figuras 59 a 61, se representa cada una de estas variables y su relación con el incremento en la producción de AMPc tras estimular con isoproterenol  $10^{-4}$  M.



**Figura 59.** Correlación entre el estímulo relativo del isoproterenol y las concentraciones plasmáticas de GOT en pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.



**Figura 60.** Correlación entre el estímulo relativo del isoproterenol y las concentraciones plasmáticas de GGT en pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.



**Figura 61.** Correlación entre el estímulo relativo del isoproterenol y las concentraciones plasmáticas de bilirrubina en pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.

De estas 3 correlaciones se desprende que, salvo un punto, la capacidad de respuesta de los pacientes al isoproterenol  $10^{-4}$  M es independiente de los niveles de GOT, GGT y bilirrubina.

**3.1.3.3. Análisis de las posibles correlaciones entre la capacidad de bloqueo del propranolol  $10^{-5}$  M (bloqueo relativo del propranolol) y las variables clínicas y/o demográficas durante el EH inicial en los pacientes de profilaxis secundaria:**

Hemos evaluado el efecto del propranolol  $10^{-5}$  M sobre la producción de AMPc estimulada por isoproterenol  $10^{-4}$  M en membranas de hematíes. Para ello, hemos calculado el número de veces que disminuye el AMPc tras el bloqueo con propranolol  $10^{-5}$  M en relación al AMPc formado tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M (bloqueo relativo del propranolol). En las tablas 45 y 46 se muestran los resultados de este análisis.

Variable	Coefficiente correlación Pearson	P
Bolsas de sangre transfundidas	-0.155	0.650
Edad	-0.299	0.155
Peso	-0.166	0.695
Presión enclavada	0.096	0.655
Presión libre	-0.055	0.797
GPVH	0.158	0.461
Presión arterial sistólica	0.123	0.614
Presión arterial diastólica	0.266	0.270
Presión arterial media	0.238	0.327
Frecuencia cardiaca	0.089	0.716
Puntuación Child	0.102	0.643
Leucocitos	-0.091	0.673
Hemoglobina	-0.181	0.397
Hematocrito	-0.187	0.382
Plaquetas	-0.072	0.740
GOT	0.041	0.862
GPT	-0.094	0.693
GGT	-0.033	0.894
Fosfatasa alcalina	-0.030	0.904
Creatinina	0.021	0.928
Glucosa	-0.164	0.478
Albúmina	-0.133	0.599
Bilirrubina	-0.007	0.978
Índice de Quick	0.120	0.585

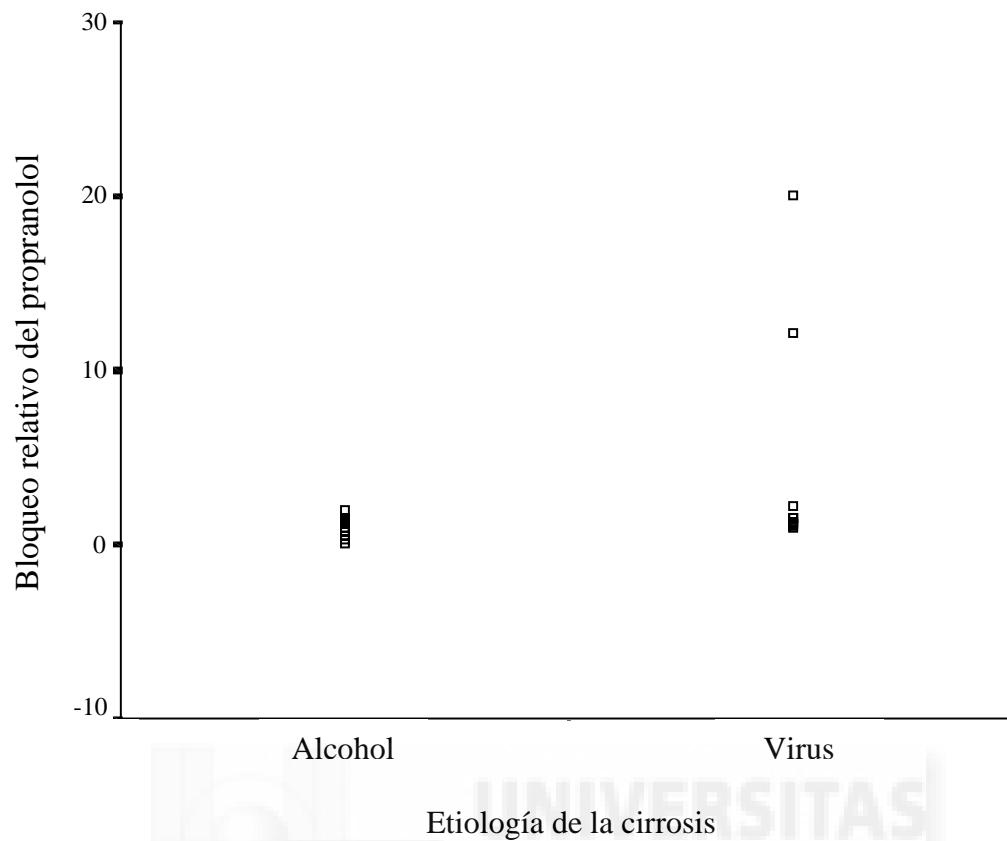
**Tabla 45.** Análisis del grado de correlación existente entre el bloqueo relativo del propranolol y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.

Variable		Bloqueo relativo del propranolol ( $\bar{X} \pm Ds$ ) (n)	P
Somatostatina	Simple	3.7 $\pm$ 6.6 (8)	0.194
	Doble	1.0 $\pm$ 0.2 (3)	
Sexo	Masculino	3.2 $\pm$ 5.7 (14)	0.841
	Femenino	1.3 $\pm$ 0.6 (10)	
Etiología de la cirrosis	Alcohol	1.0 $\pm$ 0.5 (13)	<b>0.026*</b>
	Virus	4.3 $\pm$ 6.5 (10)	
	Otras	0.7 (1)	
	Alcohol + virus	-	
Consumo activo de alcohol	Si	0.9 $\pm$ 0.5 (4)	0.183
	No	2.7 $\pm$ 4.8 (20)	
$\beta$ -bloqueantes en el mes previo	Si	1.3 $\pm$ 0.5 (7)	0.901
	No	2.8 $\pm$ 5.2 (17)	
Nitritos en el mes previo	Si	1.3 $\pm$ 0.2 (2)	0.877
	No	2.5 $\pm$ 4.6 (22)	
Furosemda en el mes previo	Si	1.6 $\pm$ 0.6 (3)	0.401
	No	2.5 $\pm$ 4.7 (21)	
Espironolactona en el mes previo	Si	1.4 $\pm$ 0.4 (7)	0.260
	No	2.8 $\pm$ 5.2 (17)	
Lactulosa en el mes previo	Si	1.3 $\pm$ 0.2 (2)	0.797
	No	2.5 $\pm$ 4.6 (22)	
Respuesta estudio hemodinámico	Si	2.3 $\pm$ 3.5 (10)	0.886
	No	2.5 $\pm$ 5.1 (14)	
Estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M	Si	1.2 $\pm$ 0.5 (6)	0.537
	No	2.8 $\pm$ 5.1 (18)	

**Tabla 46.** Bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas en los pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial. \*  $P < 0.05$ .

De todas las variables evaluadas, sólo se ha encontrado una correlación significativa entre el bloqueo relativo del propranolol y la etiología de la cirrosis en los pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.

En la figura 62, se representan esta variable y su relación con el descenso en la producción de AMPc tras isoproterenol  $10^{-4}$  M en presencia de propranolol  $10^{-5}$  M.



**Figura 62.** Comparación entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y la etiología de la cirrosis en los pacientes de profilaxis secundaria.

Independientemente de la etiología de la cirrosis (alcohol, virus), la capacidad de bloqueo del propranolol en los pacientes cirróticos es la misma, con la excepción de 2 valores.

En la tabla 47 se resumen las correlaciones encontradas entre los valores de AMPc y las variables clínicas de los pacientes de profilaxis secundaria incluidos en el estudio durante el EH inicial:

	<b>Antes del bolus iv de propranolol</b>	
	<b>Profilaxis Secundaria</b>	<b>Relevancia de la correlación</b>
AMPc sin estímulo	PAS FC Índice de Quick	Relevante Relevante Relevante
AMPc tras isoproterenol $10^{-4}$ M	PAS, PAM, FC, Glucosa, Índice de Quick, Consumo activo de alcohol	Relevante Relevante Relevante Relevante Relevante
Incremento en la producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M (estímulo relativo del isoproterenol).	GOT GGT Bilirrubina	Irrelevante Irrelevante Irrelevante
Descenso en la producción de AMPc inducido por propranolol $10^{-5}$ M en presencia de isoproterenol $10^{-4}$ M (bloqueo relativo del propranolol)	Etiología de la cirrosis	Irrelevante

**Tabla 47.** Cuadro resumen de las correlaciones entre la actividad de la AC en membranas de hematíes y las variables clínicas en los pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial.

### **3.2. ACTIVIDAD DE LA AC EN LAS MEMBRANAS DE HEMATÍES DE LAS MUESTRAS DE SANGRE EXTRAÍDAS A LOS PACIENTES 30 MINUTOS DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE UN BOLUS DE PROPRANOLOL IV:**

#### **3.2.1. Pacientes:**

En muestras de sangre obtenidas 30 minutos después de administrar al paciente un bolus iv de propranolol  $10^{-5}$  M y coincidiendo con la segunda medida de la presión enclavada, libre y GPVH en el estudio hemodinámico, se determinó nuevamente la actividad del sistema de AC en membranas de hematíes sin y tras estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M en ausencia y en presencia de propranolol  $10^{-5}$  M. En la tabla 48 se recogen los valores de AMPc sin estimular con isoproterenol, tras estimular y en presencia de propranolol  $10^{-5}$  M en cada uno de los grupos de pacientes evaluados, donde se indican, además, los valores ya señalados anteriormente encontrados en condiciones basales, para facilitar su comparación.

<b>Pacientes</b>	Antes del propranolol iv	30 minutos después del propranolol iv
AMPc basal	46.1 ± 62.3 (n = 39)	37.3 ± 38.3 (n = 30)
AMPc producido por isoproterenol 10 <sup>-4</sup> M	55.01 ± 84.4 (n = 40)	43.0 ± 53.9 (n = 31)
AMPc producido por isoproterenol 10 <sup>-4</sup> M en presencia de propranolol 10 <sup>-5</sup> M	51.6 ± 75.7 (n = 37)	42.3 ± 62.5 (n = 30)
<b>Profilaxis primaria</b>	Antes del propranolol iv	30 minutos después del propranolol iv
AMPc basal	47.5 ± 86.0 (n = 14)	33.4 ± 43.4 (n = 9)
AMPc producido por isoproterenol 10 <sup>-4</sup> M	80.6 ± 129.1 (n = 14)*	70.9 ± 73.1 (n = 10)
AMPc producido por isoproterenol 10 <sup>-4</sup> M en presencia de propranolol 10 <sup>-5</sup> M	61.0 ± 115.3 (n = 13)	44.2 ± 53.9 (n = 9)+
<b>Profilaxis secundaria</b>	Antes del propranolol iv	30 minutos después del propranolol iv
AMPc basal	45.3 ± 46.1 (n = 25)	39.0 ± 37.0 (n = 21)
AMPc producido por isoproterenol 10 <sup>-4</sup> M	41.3 ± 43.6 (n = 26)	29.7 ± 37.1 (n = 21)*
AMPc producido por isoproterenol 10 <sup>-4</sup> M en presencia de propranolol 10 <sup>-5</sup> M	46.5 ± 44.1 (n = 24)	41.4 ± 67.1 (n = 21)

**Tabla 48.** Valores de AMPc (pmol/mg proteína/10 min) de los pacientes en su conjunto, de los pacientes de profilaxis primaria y secundaria, antes y tras la administración de un bolus iv de propranolol.

\* P < 0.05 comparado con la basal. + P < 0.05 comparado con AMPc producido por isoproterenol 10<sup>-4</sup> M.

Al igual que ocurre durante el estudio basal (antes de la administración del bolus iv de propranolol), existen diferencias entre los 2 grupos de pacientes estudiados. En el grupo de profilaxis primaria, se produce un incremento en la actividad tras el estímulo con isoproterenol 10<sup>-4</sup> M y un descenso significativo de la misma en presencia de propranolol 10<sup>-5</sup> M. Sin embargo, en el grupo integrado por pacientes de profilaxis secundaria, se observa un descenso significativo e inesperado de la actividad de la AC en presencia de isoproterenol 10<sup>-4</sup> M, fenómeno que se revierte en presencia de propranolol 10<sup>-5</sup> M. Cuando se evaluaron las posibles diferencias entre los valores de AMPc antes del propranolol iv y después del propranolol iv, no se encontraron que éstas fueran significativas.



Tanto para los pacientes cirróticos evaluados en su conjunto, así como en los subgrupos de profilaxis primaria y secundaria, se calcularon los valores del estímulo absoluto y relativo del isoproterenol  $10^{-4}$  M y el bloqueo relativo y absoluto del propranolol  $10^{-5}$  M. Los resultados se recogen en la tabla 49:

	<b>EH inicial</b>	<b>Tras bolus iv de propranolol</b>
	<b>Pacientes cirróticos con HTP</b>	<b>Pacientes cirróticos con HTP</b>
Estímulo relativo del isoproterenol $10^{-4}$ M	$1.36 \pm 7.40$ (39)	$1.89 \pm 6.38$ (30)
Bloqueo relativo del propranolol $10^{-5}$ M	$1.31 \pm 4.04$ (37)	$5.25 \pm 19.19$ (30)
Estímulo absoluto del isoproterenol $10^{-4}$ M	$10.03 \pm 38.30$ (39)	$2.96 \pm 36.72$ (30)
Bloqueo absoluto del propranolol $10^{-5}$ M	$-3.22 \pm 26.28$ (37)	$1.99 \pm 63.18$ (30)
	<b>Pacientes de profilaxis primaria</b>	<b>Pacientes de profilaxis primaria</b>
Estímulo relativo del isoproterenol $10^{-4}$ M	$0.81 \pm 1.36$ (14)	$3.93 \pm 7.90$ (9)
Bloqueo relativo del propranolol $10^{-5}$ M	$1.17 \pm 3.39$ (13)	$-0.16 \pm 0.74$ (9)
Estímulo absoluto del isoproterenol $10^{-4}$ M	$33.07 \pm 53.05$ (14)	$31.45 \pm 49.47$ (9)
Bloqueo absoluto del propranolol $10^{-5}$ M	$-13.57 \pm 32.25$ (13)	$-20.53 \pm 27.16$ (9)
	<b>Pacientes de profilaxis secundaria</b>	<b>Pacientes de profilaxis secundaria</b>
Estímulo relativo del isoproterenol $10^{-4}$ M	$-0.17 \pm 0.42$ (25)	$1.11 \pm 5.74$ (21)*
Bloqueo relativo del propranolol $10^{-5}$ M	$1.43 \pm 4.51$ (24)	$7.98 \pm 23.19$ (21)
Estímulo absoluto del isoproterenol $10^{-4}$ M	$-5.04 \pm 14.35$ (25)	$-7.82 \pm 20.83$ (21)*
Bloqueo absoluto del propranolol $10^{-5}$ M	$1.87 \pm 21.43$ (24)	$12.43 \pm 73.65$ (21)*

**Tabla 49:**  $\bar{X} \pm Ds$  (n) del estímulo relativo y absoluto para el isoproterenol y el bloqueo relativo y absoluto para propranolol en membranas de hematíes de pacientes de profilaxis primaria y secundaria y en los pacientes cirróticos evaluados en su conjunto antes y después de la administración del bolus iv de propranolol. Tanto el estímulo relativo del isoproterenol como el bloqueo relativo del propranolol se expresan en tanto por 1 mientras que el estímulo absoluto del isoproterenol y el bloqueo absoluto del propranolol se expresan en pmol AMPc/mg proteína/10 min. \*  $P < 0.05$  comparado con los pacientes de profilaxis primaria.

Entre los pacientes de profilaxis primaria y secundaria no se han observado diferencias significativas en cuanto al bloqueo relativo del propranolol. Sin embargo, los pacientes de profilaxis secundaria tienen un estímulo relativo y absoluto del isoproterenol significativamente inferior al de los pacientes de profilaxis primaria y un bloqueo absoluto del propranolol significativamente superior al de los pacientes de profilaxis primaria. Cuando se compararon los datos de las variables analizadas, antes y después de la administración del bolus iv de propranolol, no se observaron diferencias significativas entre ambos estudios.

### 3.2.1.1. Análisis de las posibles correlaciones entre la actividad de la AC y las variables clínicas de los pacientes cirróticos con HTP tras la administración de un bolus iv de propranolol:

#### 3.2.1.1.1. Actividad basal:

Se han evaluado las correlaciones entre las diferentes variables clínicas y los valores de AMPc basal en las muestras recogidas tras la administración del bolus iv de propranolol. Los resultados que se obtuvieron se recogen en las tablas 50 y 51.

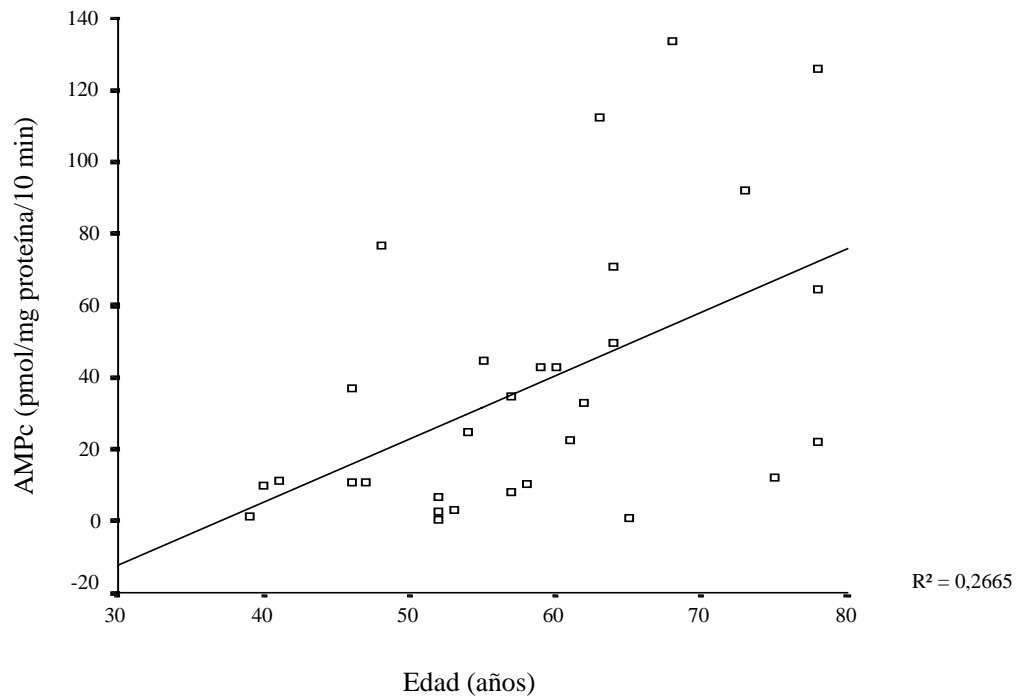
Variable	Coefficiente correlación Pearson	P
Edad	<b>0.516*</b>	<b>0.003*</b>
Peso	0.216	0.523
Presión enclavada	<b>-0.474*</b>	<b>0.009*</b>
Presión libre	<b>-0.400*</b>	<b>0.032*</b>
GPVH	-0.258	0.177
Presión arterial sistólica	0.088	0.676
Presión arterial diastólica	0.153	0.465
Presión arterial media	0.135	0.519
Frecuencia cardiaca	-0.073	0.728
Puntuación Child	-0.190	0.324
Leucocitos	0.027	0.885
Hemoglobina	-0.033	0.863
Hematocrito	-0.047	0.803
Plaquetas	-0.175	0.354
GOT	-0.329	0.101
GPT	-0.181	0.377
GGT	-0.166	0.427
Fosfatasa alcalina	-0.395	0.051
Creatinina	-0.001	0.995
Glucosa	0.290	0.142
Albúmina	0.062	0.774
Bilirrubina	-0.138	0.502
Índice de Quick	0.096	0.620

**Tabla 50.** Análisis del grado de correlación existente entre la producción de AMPc basal en membranas de hematíes y las variables clínicas en los pacientes cirróticos con HTP en las muestras de sangre obtenidas tras la administración del bolus iv de propranolol. \* P < 0.05.

Variable		AMPc ( $\bar{X} \pm Ds$ ) (n)	P
Sexo	Masculino	31.0 $\pm$ 37.7 (19)	0.145
	Femenino	48.2 $\pm$ 38.6 (11)	
Etiología de la cirrosis	Alcohol	31.9 $\pm$ 31.9 (16)	0.537
	Virus	47.0 $\pm$ 47.0 (12)	
	Otras	21.9 $\pm$ 29.8 (2)	
	Alcohol + virus	- (0)	
Consumo activo de alcohol	Si	24.3 $\pm$ 18.2 (6)	0.781
	No	40.5 $\pm$ 41.5 (24)	
$\beta$ -bloqueantes en el mes previo	Si	38.1 $\pm$ 49.3 (10)	0.422
	No	36.9 $\pm$ 33.0 (20)	
Nitritos en el mes previo	Si	53.8 $\pm$ 52.1 (3)	0.387
	No	35.5 $\pm$ 37.3 (27)	
Furosemida en el mes previo	Si	47.3 $\pm$ 50.3 (5)	0.706
	No	35.3 $\pm$ 36.4 (25)	
Espironolactona en el mes previo	Si	58.4 $\pm$ 43.3 (8)	<b>0.045*</b>
	No	29.6 $\pm$ 34.2 (22)	
Lactulosa en el mes previo	Si	35.0 $\pm$ 2.8 (2)	0.717
	No	37.5 $\pm$ 39.7 (28)	
Respuesta estudio hemodinámico	Si	31.4 $\pm$ 28.9 (11)	0.933
	No	40.7 $\pm$ 43.2 (19)	
Somatostatina	Simple	39.7 $\pm$ 38.2 (7)	1.000
	Doble	37.0 (1)	
Transfusión	Si	47.1 $\pm$ 46.3 (9)	0.594
	No	33.1 $\pm$ 34.8 (21)	

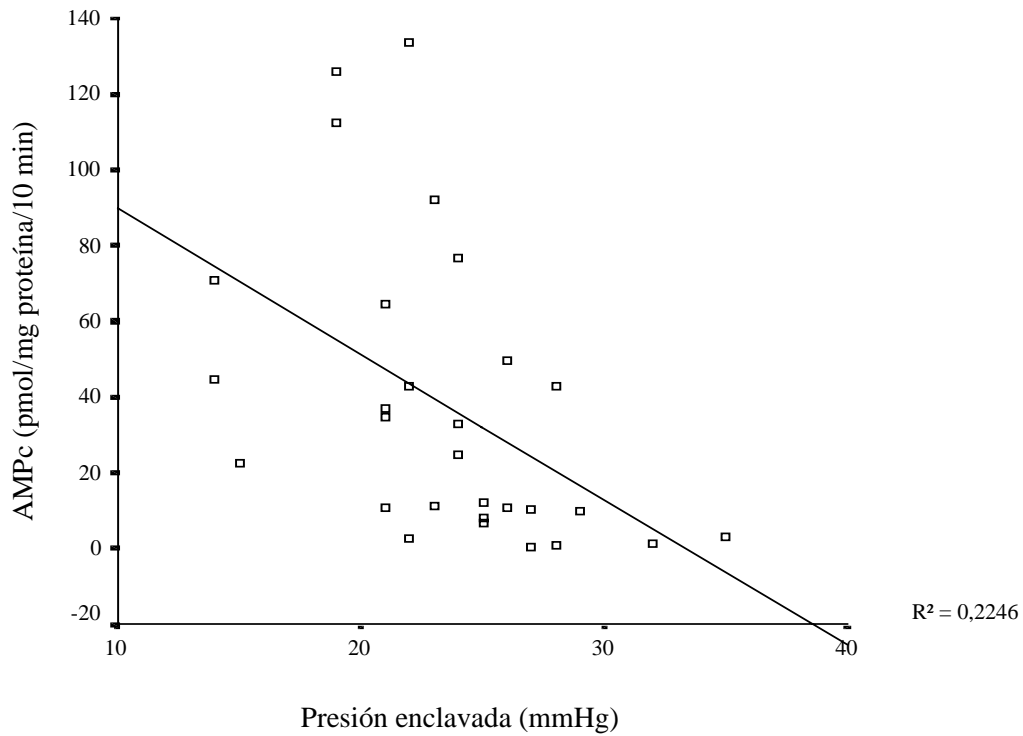
**Tabla 51.** Producción de AMPc basal (  $\bar{X} \pm Ds$ ) en membranas de hematíes en función de las variables clínicas evaluadas en los pacientes cirróticos con HTP en las muestras obtenidas tras la administración del bolus iv de propranolol. \* P < 0.05.

De las variables evaluadas, se ha encontrado correlación significativa entre la producción basal de AMPc en los hematíes de las muestras recogidas tras el bolus iv de propranolol, con la edad, presión enclavada, presión libre y con la toma o no de espironolactona en el mes previo al estudio hemodinámico inicial. En las figuras 63 a 66 se representan cada una de estas variables y su correlación con el AMPc sin estimular tras la administración de un bolus iv de propranolol:



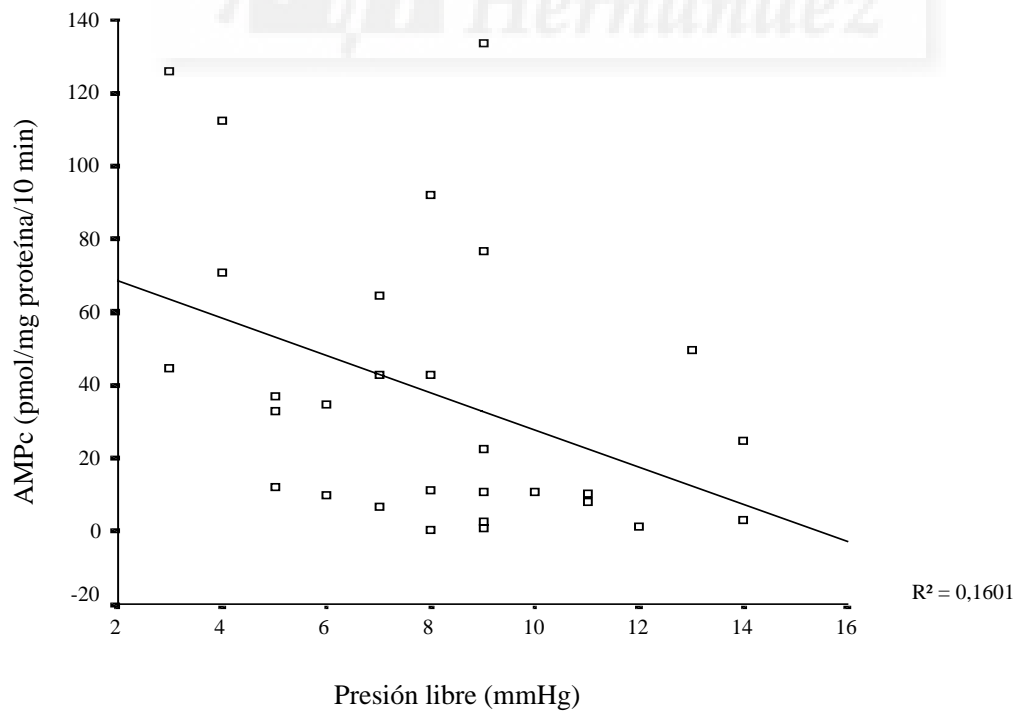
**Figura 63.** Correlación entre la producción basal de AMPc en membranas de hematíes y la edad en los pacientes cirróticos con HTP en muestras extraídas tras la administración de un bolus iv de propranolol.

Se observa claramente que cuanto mayor es la edad de los pacientes, más elevada es la producción de AMPc en estos pacientes.

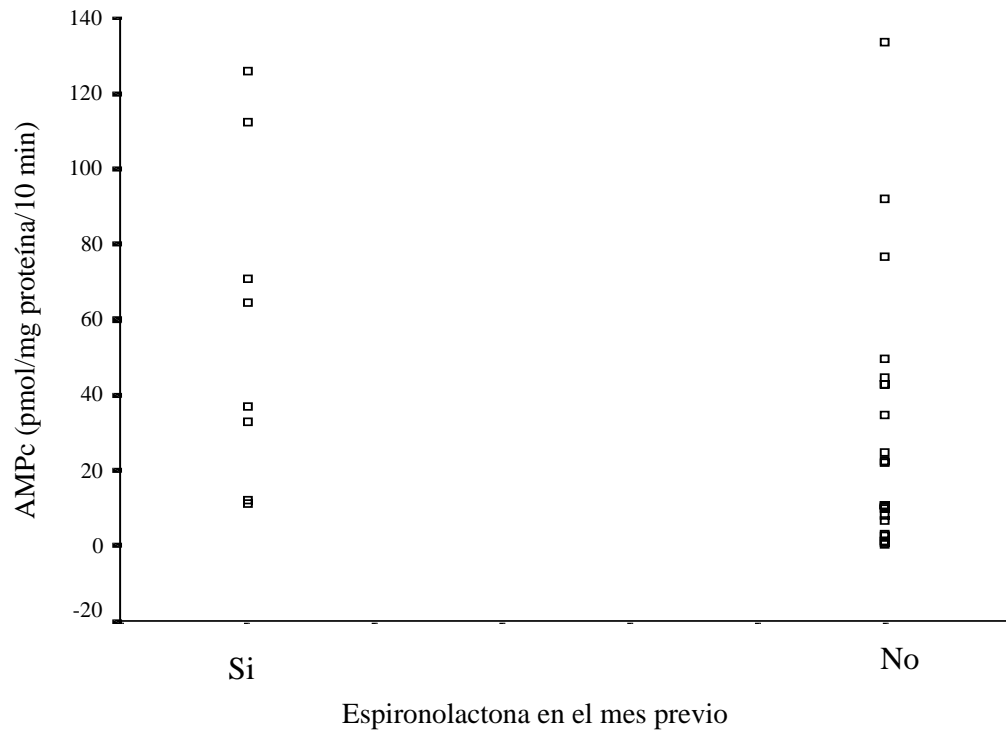


**Figura 64.** Correlación entre la producción basal de AMPc en membranas de hematíes y la presión enclavada en los pacientes cirróticos con HTP en muestras extraídas tras la administración de un bolus iv de propranolol.

Se observa que cuanto mayor es la presión enclavada de los pacientes, menor es la producción basal de AMPc en estas condiciones de estudio.



**Figura 65.** Correlación entre la producción basal de AMPc en membranas de hematíes y la presión libre en los pacientes cirróticos con HTP en muestras extraídas tras la administración de un bolus iv de propranolol.



**Figura 66.** Comparación entre la producción basal de AMPc en membranas de hematíes y la toma o no de espironolactona en el mes previo al EH inicial en los pacientes cirróticos con HTP en muestras extraídas tras la administración de un bolus iv de propranolol.

### 3.2.1.1.2. Tras la administración de isoproterenol $10^{-4}$ M.

Se evaluaron también las correlaciones entre la producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M y las variables clínicas en los hematíes de las muestras recogidas tras la administración del bolus iv de propranolol. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 52 y 53:

Variable	Coefficiente correlación Pearson	P
Edad	0.165	0.374
Peso	0.139	0.667
Presión enclavada	-0.322	0.082
Presión libre	0.193	0.306
GPVH	-0.258	0.168
Presión arterial sistólica	0.175	0.393
Presión arterial diastólica	0.204	0.317
Presión arterial media	0.208	0.308
Frecuencia cardiaca	0.301	0.135
Puntuación Child	0.023	0.905
Leucocitos	0.107	0.568
Hemoglobina	0.127	0.495
Hematocrito	0.120	0.521
Plaquetas	0.104	0.579
GOT	-0.011	0.955
GPT	0.103	0.610
GGT	-0.074	0.721
Fosfatasa alcalina	-0.183	0.371
Creatinina	-0.007	0.973
Glucosa	0.115	0.561
Albúmina	0.000	0.999
Bilirrubina	0.049	0.808
Índice de Quick	0.172	0.363

**Tabla 52.** Análisis del grado de correlación existente entre la producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M en membranas de hematíes y las variables clínicas cuantitativas en las muestras de sangre de los pacientes cirróticos con HTP tras recibir un bolus iv de propranolol.

Variable		AMPc ( $\bar{X} \pm Ds$ ) (n)	P
Sexo	Masculino	34.2 $\pm$ 42.1 (19)	0.484
	Femenino	57.0 $\pm$ 68.3 (12)	
Etiología de la cirrosis	Alcohol	41.6 $\pm$ 45.1 (17)	0.586
	Virus	46.2 $\pm$ 68.6 (12)	
	Otras	35.5 $\pm$ 49.0 (2)	
	Alcohol + virus	- (0)	
Consumo activo de alcohol	Si	50.0 $\pm$ 53.9 (7)	0.563
	No	41.0 $\pm$ 54.8 (24)	
$\beta$ -bloqueantes en el mes previo	Si	62.2 $\pm$ 74.7 (11)	0.338
	No	32.5 $\pm$ 36.3 (20)	
Nitritos en el mes previo	Si	60.0 $\pm$ 65.6 (3)	0.422
	No	41.2 $\pm$ 53.6 (28)	
Furosemida en el mes previo	Si	50.2 $\pm$ 57.5 (5)	0.897
	No	41.6 $\pm$ 54.2 (26)	
Espironolactona en el mes previo	Si	67.7 $\pm$ 53.3 (9)	0.057
	No	32.9 $\pm$ 51.9 (22)	
Lactulosa en el mes previo	Si	54.6 $\pm$ 62.2 (3)	0.826
	No	41.8 $\pm$ 53.9 (28)	
Respuesta estudio hemodinámico	Si	36.9 $\pm$ 40.2 (12)	0.857
	No	47.0 $\pm$ 61.7 (19)	
Somatostatina	Simple	23.5 $\pm$ 25.6 (7)	0.750
	Doble	36.4 (1)	
Transfusión	Si	42.8 $\pm$ 46.5 (9)	0.781
	No	43.1 $\pm$ 57.6 (22)	

**Tabla 53.** Producción de AMPc (  $\bar{X} \pm Ds$ ) en membranas de hematíes tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M en función de las variables clínicas cualitativas evaluadas en muestras de sangre de los pacientes cirróticos tras la administración de un bolus iv de propranolol.



**3.2.1.2. Análisis de las posibles correlaciones entre la capacidad de respuesta al isoproterenol  $10^{-4}$  M (estímulo relativo del isoproterenol) después de la administración iv de propranolol y las variables clínicas y/o demográficas en los pacientes cirróticos con HTP:**

Hemos analizado la existencia de posibles correlaciones entre diversas características de los pacientes y el incremento en la producción de AMPc sobre la actividad basal de la AC después de estimular con isoproterenol  $10^{-4}$  M. Para ello, hemos calculado el número de veces que se incrementa la producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol en relación al valor de AMPc previo, es decir, antes del estímulo beta (estímulo relativo del isoproterenol  $10^{-4}$  M). En las tablas 54 y 55 se muestran los resultados.

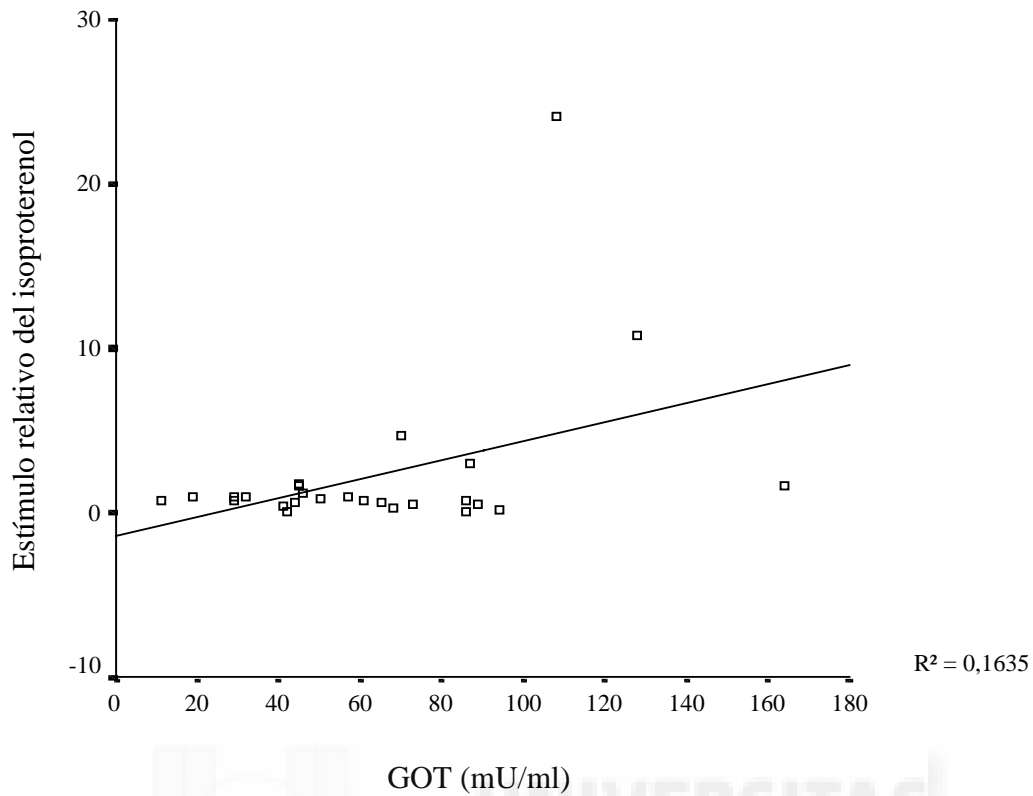
Variable	Coefficiente correlación Pearson	P
Bolsas de sangre	-0.215	0.578
Edad	-0.230	0.221
Peso	<b>0.698*</b>	<b>0.017*</b>
Presión enclavada	0.077	0.693
Presión libre	0.086	0.656
GPVH	-0.034	0.863
Presión arterial sistólica	0.029	0.889
Presión arterial diastólica	-0.122	0.560
Presión arterial media	-0.062	0.770
Frecuencia cardiaca	0.129	0.538
Puntuación Child	-0.002	0.992
Leucocitos	-0.011	0.953
Hemoglobina	0.198	0.293
Hematocrito	0.241	0.200
Plaquetas	0.252	0.178
GOT	<b>0.404*</b>	<b>0.040*</b>
GPT	<b>0.590*</b>	<b>0.002*</b>
GGT	-0.073	0.730
Fosfatasa alcalina	-0.159	0.449
Creatinina	-0.216	0.280
Glucosa	-0.167	0.406
Albúmina	-0.152	0.480
Bilirrubina	0.073	0.725
Índice de Quick	-0.002	0.993

**Tabla 54.** Análisis del grado de correlación existente entre el estímulo relativo del isoproterenol en membranas de hematíes y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes cirróticos con HTP después de la administración iv de propranolol. \*  $P < 0.05$ .

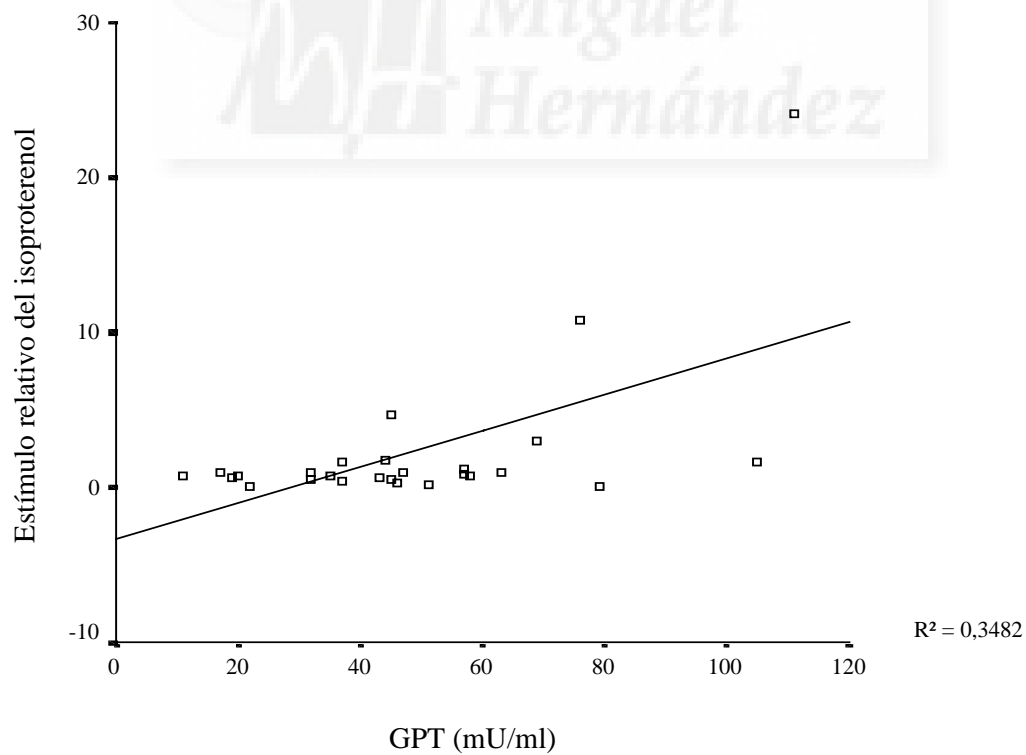
Variable		Estímulo relativo del isoproterenol ( $\bar{X} \pm Ds$ ) (n)	P
Somatostatina	Simple	4.2 ± 9.7 (7)	0.750
	Doble	1.0 (1)	
Sexo	Masculino	2.9 ± 6.2 (19)	0.672
	Femenino	2.9 ± 7.1 (11)	
Etiología de la cirrosis	Alcohol	3.3 ± 6.7 (16)	0.423
	Virus	2.6 ± 6.8 (12)	
	Otras	1.3 ± 0.4 (2)	
	Alcohol + virus	- (0)	
Consumo activo de alcohol	Si	2.4 ± 4.2 (6)	0.980
	No	3.0 ± 6.9 (24)	
β-bloqueantes en el mes previo	Si	6.0 ± 10.1 (10)	<b>0.031*</b>
	No	1.3 ± 2.5 (20)	
Nitritos en el mes previo	Si	1.0 ± 0.2 (3)	0.509
	No	3.1 ± 6.7 (27)	
Furosemida en el mes previo	Si	2.6 ± 4.6 (5)	0.872
	No	2.9 ± 6.8 (25)	
Espironolactona en el mes previo	Si	2.0 ± 3.6 (8)	0.945
	No	3.2 ± 7.2 (22)	
Lactulosa en el mes previo	Si	0.5 ± 0.7 (2)	0.460
	No	3.1 ± 6.6 (28)	
Respuesta estudio hemodinámico	Si	2.8 ± 7.1 (11)	0.372
	No	2.9 ± 6.1 (19)	

**Tabla 55.** Estímulo relativo del isoproterenol en membranas de hematíes ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas en los pacientes cirróticos con HTP después de la administración de un bolus iv de propranolol. \* P < 0.05.

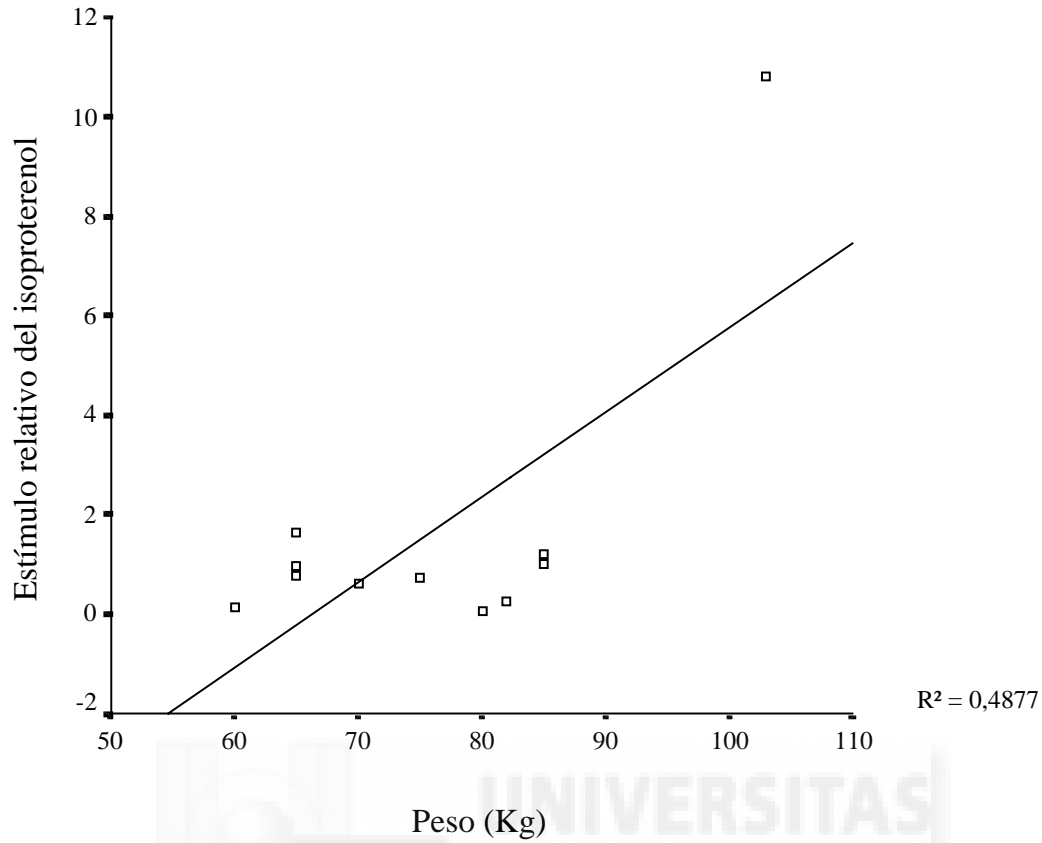
De todas las variables evaluadas, tan sólo se han encontrado correlaciones significativas entre el estímulo relativo del isoproterenol después de la administración de un bolus iv de propranolol y el peso, GOT, GPT y la toma o no de β-bloqueantes en el mes previo al EH inicial. En las figuras 67 a 70 se representan cada una de estas variables y su relación con el estímulo relativo del isoproterenol:



**Figura 67.** Correlación entre el estímulo relativo del isoproterenol en membranas de hematíes y la enzima GOT en los pacientes cirróticos con HTP después de la administración de un bolus iv de propranolol.

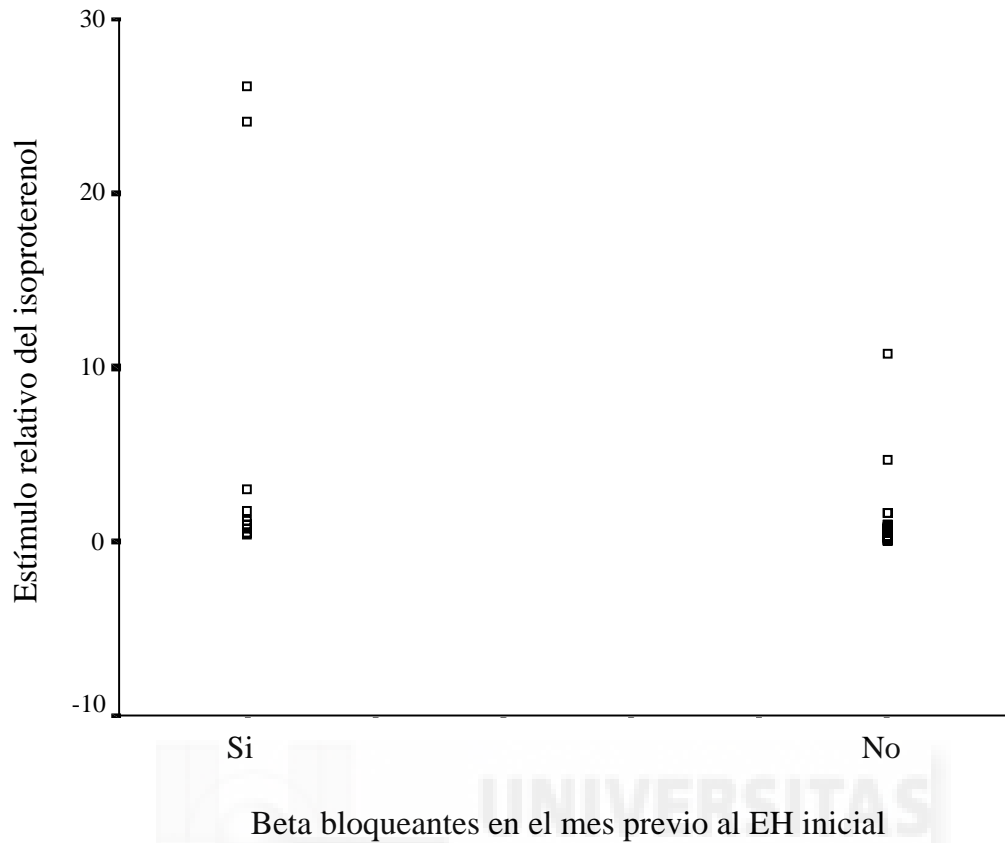


**Figura 68.** Correlación entre el estímulo relativo del isoproterenol en membranas de hematíes y la GPT en los pacientes cirróticos con HTP después de la administración de un bolus iv de propranolol.



**Figura 69.** Correlación entre el estímulo relativo del isoproterenol en membranas de hematíes y el peso de los pacientes cirróticos con HTP después de la administración de un bolus iv de propranolol.

En las 3 correlaciones anteriores se observa que la correlación a expensas de un punto carece de relevancia y por tanto el estímulo relativo del isoproterenol es independiente del peso de los pacientes y de los niveles de GOT y GPT.



**Figura 70.** Comparación entre el estímulo relativo del isoproterenol en membranas de hematíes después de la administración de un bolus iv de propranolol y la toma o no de  $\beta$ -bloqueantes en el mes previo al EH inicial en los pacientes cirróticos con HTP.

Como se puede observar en la representación anterior, la comparación entre el bloqueo relativo del isoproterenol y la toma de  $\beta$ -bloqueantes no es relevante puesto que tiene lugar a expensas de 2-3 puntos.

**3.2.1.3. Análisis de las posibles correlaciones entre la capacidad de bloqueo del propranolol  $10^{-5}$  M (bloqueo relativo del propranolol) y las variables clínicas y/o demográficas de los pacientes cirróticos con HTP después de la administración de un bolus iv de propranolol:**

Hemos evaluado el descenso en la producción de AMPc por parte de la AC en membranas de hematíes después de estimular con isoproterenol  $10^{-4}$  M y bloquear con propranolol  $10^{-5}$  M. Para ello, hemos calculado el número de veces que disminuye la producción de AMPc tras el bloqueo con propranolol  $10^{-5}$  M en relación al estímulo con el isoproterenol  $10^{-4}$  M (bloqueo relativo del propranolol) en membranas de hematíes de pacientes cirróticos con HTP después de la administración de un bolus iv de propranolol. En la tabla 56 y 57 se muestran los resultados de estos análisis.

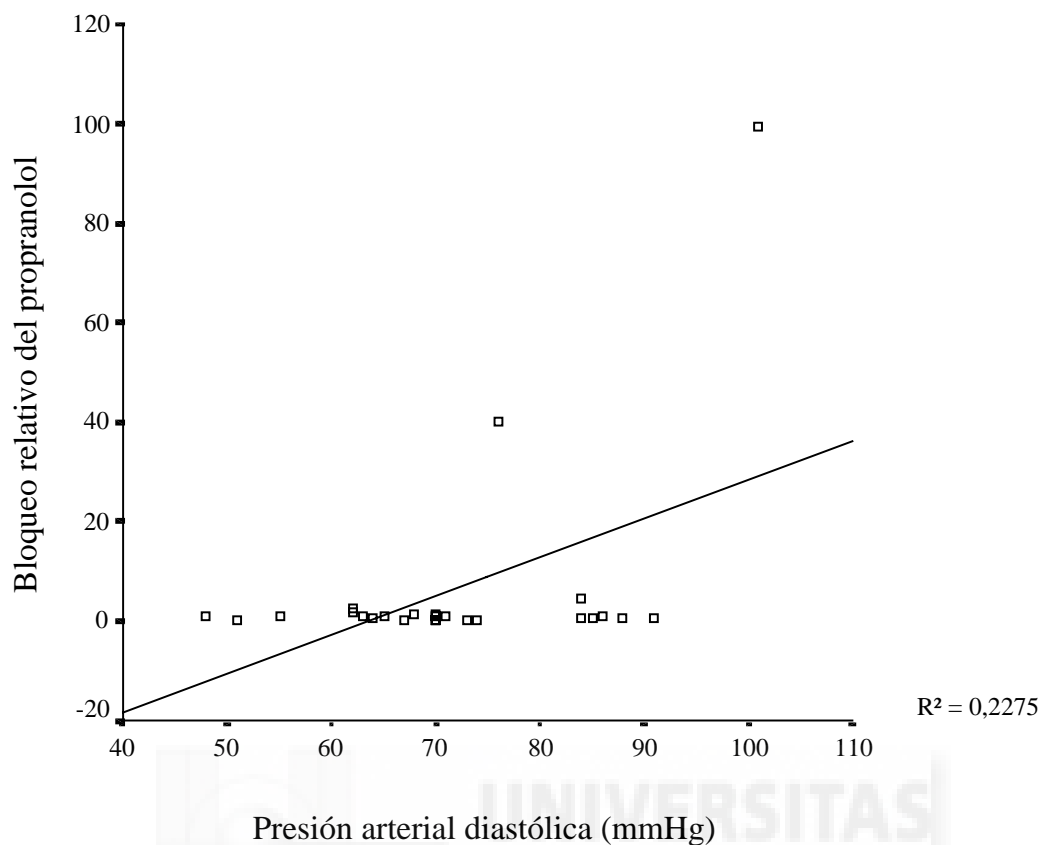
Variable	Coefficiente correlación Pearson	P
Bolsas de sangre transfundidas	0.320	0.401
Edad	-0.036	0.849
Peso	0.131	0.701
Presión enclavada	-0.362	0.054
Presión libre	-0.328	0.082
GPVH	-0.186	0.333
Presión arterial sistólica	0.274	0.186
Presión arterial diastólica	<b>0.477*</b>	<b>0.016*</b>
Presión arterial media	<b>0.421*</b>	<b>0.036*</b>
Frecuencia cardiaca	0.039	0.854
Puntuación Child	<b>-0.588*</b>	<b>0.001*</b>
Leucocitos	-0.053	0.779
Hemoglobina	0.162	0.391
Hematocrito	0.212	0.261
Plaquetas	0.141	0.457
GOT	0.069	0.736
GPT	0.145	0.479
GGT	-0.147	0.483
Fosfatasa alcalina	0.184	0.378
Creatinina	<b>0.715*</b>	<b>0.000*</b>
Glucosa	0.112	0.577
Albúmina	0.068	0.753
Bilirrubina	-0.169	0.408
Índice de Quick	0.071	0.715

**Tabla 56.** Análisis del grado de correlación existente entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes cirróticos con HTP después de la administración de un bolus iv de propranolol.\*  $P < 0.05$ .

Variable		Bloqueo relativo del propranolol ( $\bar{X} \pm Ds$ ) (n)	P
Somatostatina	Simple	6.5 ± 14.8 (7)	1.000
	Doble	1.2 (1)	
Sexo	Masculino	1.9 ± 3.5 (19)	0.085
	Femenino	13.8 ± 30.8 (11)	
Etiología de la cirrosis	Alcohol	7.5 ± 24.6 (16)	0.698
	Virus	5.4 ± 11.6 (12)	
	Otras	0.7 ± 0.4 (2)	
	Alcohol + virus	- (0)	
Consumo activo de alcohol	Si	1.0 ± 0.9 (6)	0.705
	No	7.6 ± 21.3 (24)	
β-bloqueantes en el mes previo	Si	0.7 ± 0.4 (10)	0.074
	No	9.0 ± 23.2 (20)	
Nitritos en el mes previo	Si	0.8 ± 0.4 (3)	0.744
	No	6.9 ± 20.2 (27)	
Furosemida en el mes previo	Si	8.6 ± 17.6 (5)	0.914
	No	5.8 ± 19.8 (25)	
Espironolactona en el mes previo	Si	5.6 ± 13.9 (8)	0.836
	No	6.5 ± 21.1 (22)	
Lactulosa en el mes previo	Si	20.7 ± 27.5 (2)	0.166
	No	5.2 ± 18.7 (28)	
Respuesta estudio hemodinámico	Si	11.5 ± 29.5 (11)	0.057
	No	3.2 ± 9.1 (19)	

**Tabla 57.** Bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas en los pacientes cirróticos con HTP después de la administración de un bolus iv de propranolol.

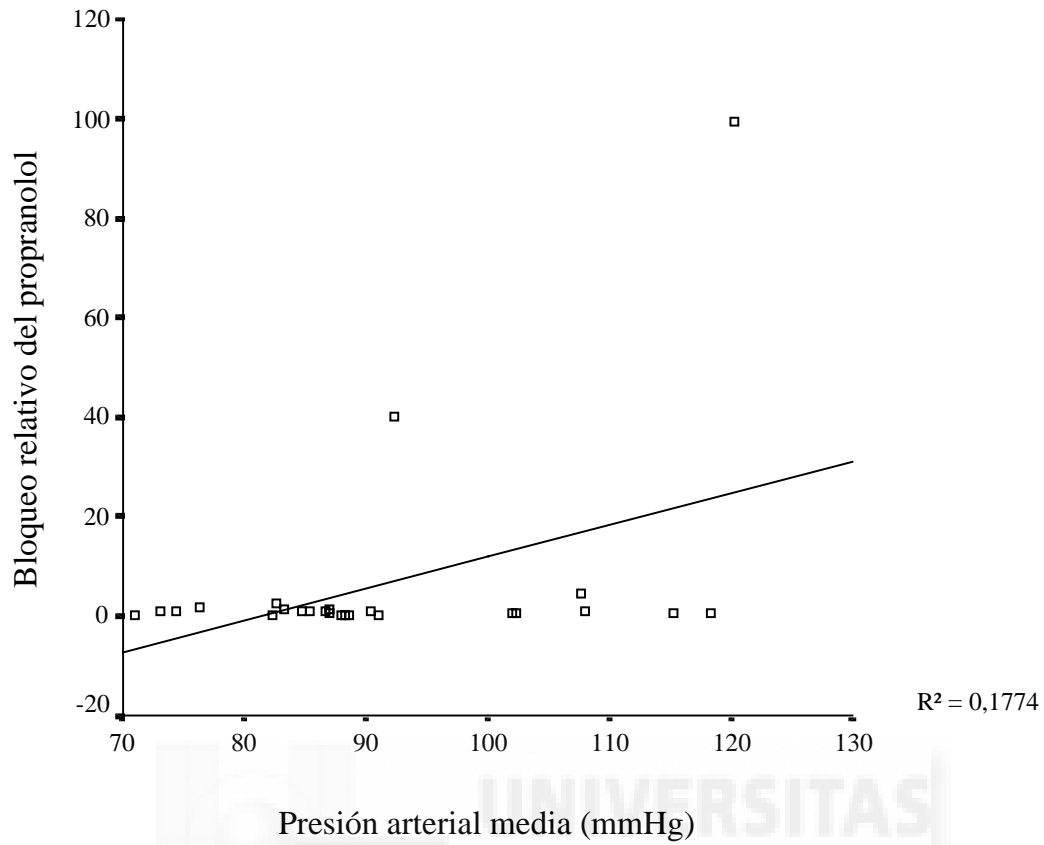
Una vez evaluadas todas las variables, se ha encontrado una correlación significativa entre el bloqueo relativo del propranolol y la presión arterial diastólica, la presión arterial media, la puntuación Child y los niveles de creatinina en los pacientes cirróticos con HTP después de la administración de un bolus iv de propranolol. En las siguientes figuras se recogen dichas correlaciones:



**Figura 71.** Correlación entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y la presión arterial diastólica en los pacientes cirróticos con HTP después de la administración de un bolus iv de propranolol.

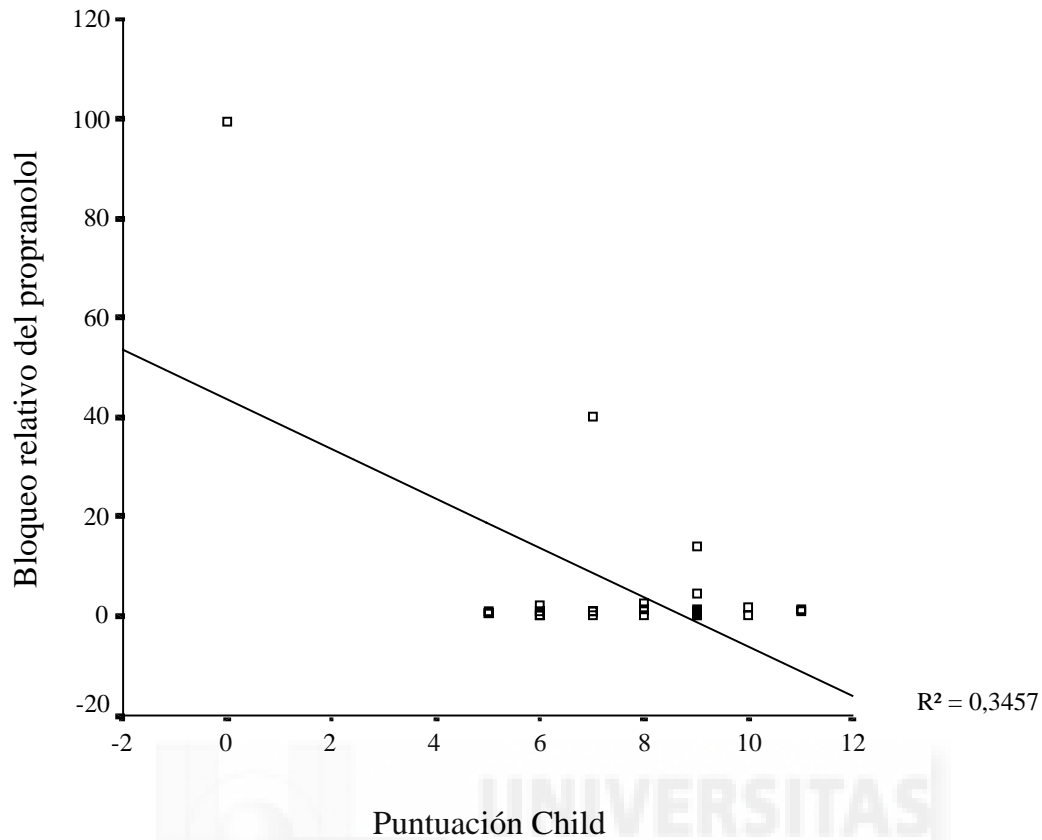
Esta correlación muestra, con la excepción de 2 puntos, que la capacidad de bloqueo por parte del propranolol  $10^{-5}$  M es independiente de los valores de presión arterial diastólica de los pacientes cirróticos.





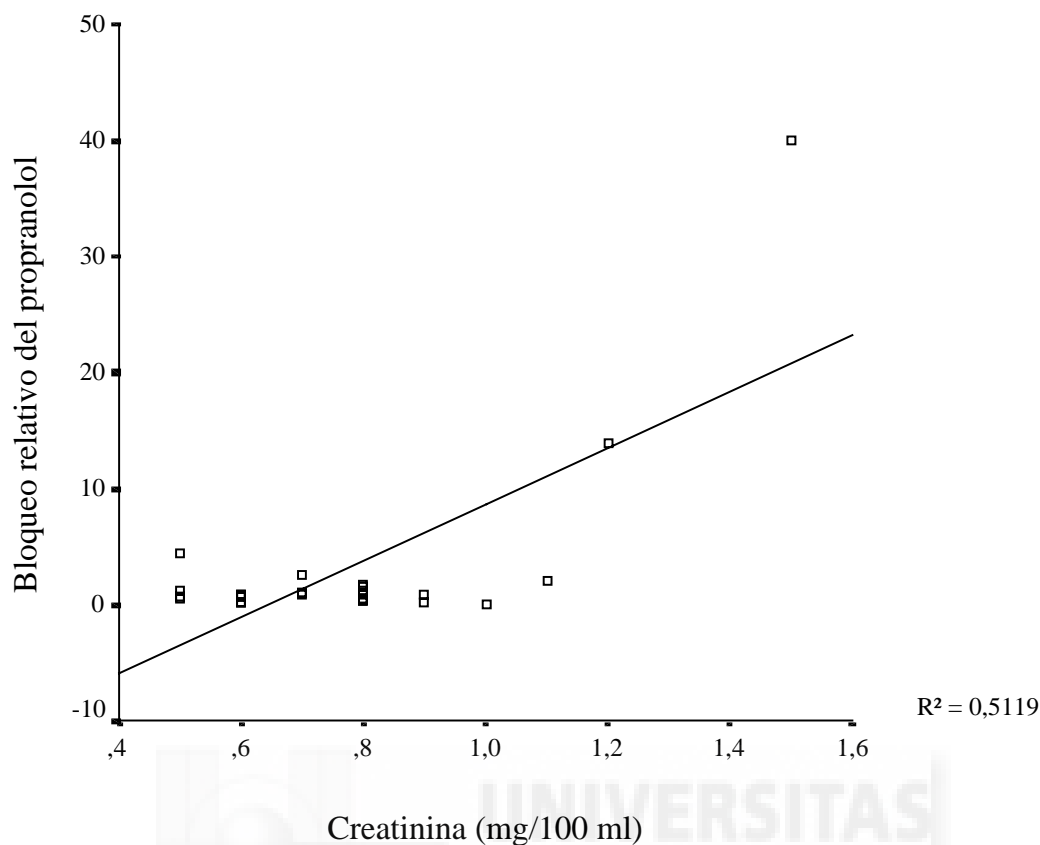
**Figura 72.** Correlación entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y la presión arterial media en los pacientes cirróticos con HTP después de la administración de un bolus iv de propranolol.

Igualmente, la capacidad de bloqueo por parte del propranolol  $10^{-5}$  M es independiente de la presión arterial media.



**Figura 73.** Correlación entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y la puntuación Child en los pacientes cirróticos con HTP después de la administración de un bolus iv de propranolol.

Al igual que sucede con la presión arterial y media, la capacidad de bloqueo por parte del propranolol también es independiente de la puntuación Child de los pacientes cirróticos participantes en el estudio.



**Figura 74.** Correlación entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y los niveles de creatinina en los pacientes cirróticos con HTP después de la administración de un bolus iv de propranolol.

Como en los 3 casos anteriores, la capacidad de bloqueo por parte del propranolol  $10^{-5}$  M es independiente de los niveles de creatinina de los pacientes cirróticos participantes en el estudio después de la administración de un bolus iv de propranolol.

### 3.2.1.4. Análisis de los posibles cambios en las variables hemodinámicas tras la administración del bolus iv de propranolol en los pacientes cirróticos con HTP:

Se han evaluado las posibles correlaciones entre los cambios en las variables hemodinámicas (GPVH, FC, PAS, PAD, PAM, PE y PL), entendidos como la diferencia en los valores de dichas variables entre el EH tras el bolus iv y el inicial, y los incrementos en los valores de AMPc tras someter a las muestras sanguíneas a un estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M en presencia y ausencia de propranolol  $10^{-5}$  M (estímulo absoluto del isoproterenol).

En el caso de los pacientes cirróticos con HTP, no se ha encontrado ninguna correlación significativa entre las variables hemodinámicas y el efecto en la producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M durante el EH inicial ni tras la administración del bolus iv de propranolol, ni con el efecto en la disminución de la producción de AMPc inducido por propranolol  $10^{-5}$  M en presencia de isoproterenol  $10^{-4}$  M durante el EH inicial ni tras la administración del bolus iv de propranolol.

En la tabla 58 se resumen las correlaciones encontradas entre los valores de AMPc y las variables clínicas de los pacientes cirróticos con HTP incluidos en el estudio después de la administración de un bolus iv de propranolol:

	Después de la administración de un bolus iv de propranolol	
	Pacientes cirróticos	Relevancia de la correlación
AMPc sin estímulo	Edad PE PL Espironolactona en el mes previo al EH	Relevante Relevante Relevante Relevante
AMPc tras isoproterenol $10^{-4}$ M	-	-
Incremento en la producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M (Estímulo relativo del isoproterenol)	GOT GPT Peso $\beta$ -bloqueantes en el mes previo	Irrelevante Irrelevante Irrelevante Irrelevante
Descenso en la producción de AMPc inducido por propranolol $10^{-5}$ M en presencia de isoproterenol $10^{-4}$ M (Bloqueo relativo del isoproterenol)	PAD PAM Puntuación Child Creatinina	Irrelevante Irrelevante Irrelevante Irrelevante
Cambios en las variables hemodinámicas	-	-

**Tabla 58.** Cuadro resumen de las correlaciones entre la actividad de la AC en membranas de hematíes y las variables clínicas de los pacientes cirróticos con HTP tras la administración de un bolus iv de propranolol.

### 3.2.2. Pacientes del grupo de profilaxis primaria:

#### 3.2.2.1. Análisis de las posibles correlaciones entre la actividad de la AC y las variables clínicas de los pacientes de profilaxis primaria tras la administración de un bolus iv de propranolol:

##### 3.2.2.1.1. Actividad basal:

Se han evaluado las posibles correlaciones entre las diferentes variables clínicas y la producción de AMPc en las muestras de sangre extraídas tras la administración de un bolus iv de propranolol. Los resultados que se obtuvieron se recogen en las tablas 59 y 60:

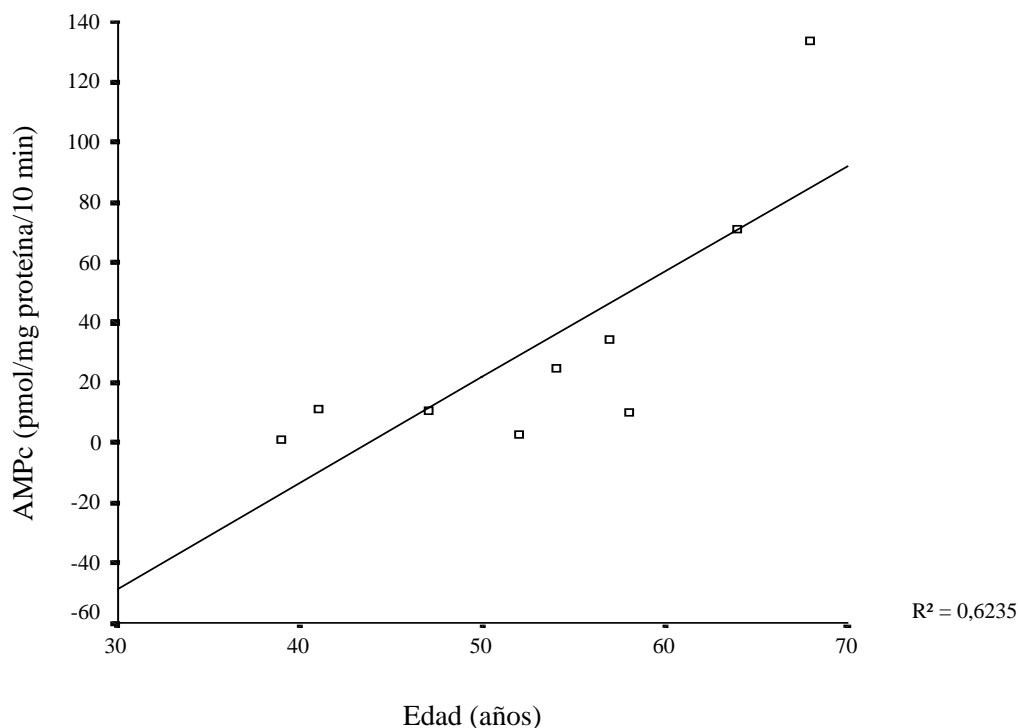
Variable	Coefficiente correlación Pearson	P
Edad	<b>0.790*</b>	<b>0.011*</b>
Peso	-0.924	0.250
Presión enclavada	-0.510	0.161
Presión libre	-0.358	0.344
GPVH	-0.374	0.322
Presión arterial sistólica	0.608	0.082
Presión arterial diastólica	0.647	0.059
Presión arterial media	0.641	0.063
Frecuencia cardíaca	0.462	0.211
Puntuación Child	-0.475	0.196
Leucocitos	-0.065	0.868
Hemoglobina	0.085	0.829
Hematocrito	0.060	0.878
Plaquetas	-0.083	0.831
GOT	-0.298	0.436
GPT	-0.348	0.358
GGT	-0.338	0.374
Fosfatasa alcalina	-0.111	0.776
Creatinina	-0.206	0.594
Glucosa	0.110	0.778
Albúmina	0.397	0.378
Bilirrubina	-0.340	0.370
Quick	<b>0.731*</b>	<b>0.025*</b>

**Tabla 59.** Análisis del grado de correlación existente entre la producción de AMPc basal en membranas de hematíes y las variables clínicas en los pacientes de profilaxis primaria tras la administración de un bolus iv de propranolol. \* P < 0.05.

Variable		AMPc ( $\bar{X} \pm Ds$ ) (n)	P
Sexo	Masculino	15.5 $\pm$ 12.1 (6)	0.381
	Femenino	69.1 $\pm$ 65.6 (3)	
Etiología de la cirrosis	Alcohol	18.3 $\pm$ 11.0 (5)	1.000
	Virus	52.2 $\pm$ 63.4 (4)	
Consumo activo de alcohol	Si	15.6 $\pm$ 8.1 (3)	1.000
	No	42.2 $\pm$ 52.0 (6)	
$\beta$ -bloqueantes en el mes previo	Si	48.9 $\pm$ 73.6 (3)	0.905
	No	25.6 $\pm$ 25.1 (6)	
Furosemida en el mes previo	Si	6.3 $\pm$ 7.1 (2)	0.333
	No	41.1 $\pm$ 46.8 (7)	
Espironolactona en el mes previo	Si	41.1 $\pm$ 42.1 (2)	0.500
	No	31.1 $\pm$ 46.8 (7)	
Respuesta estudio hemodinámico	Si	22.1 $\pm$ 28.9 (5)	0.413
	No	47.5 $\pm$ 58.6 (4)	

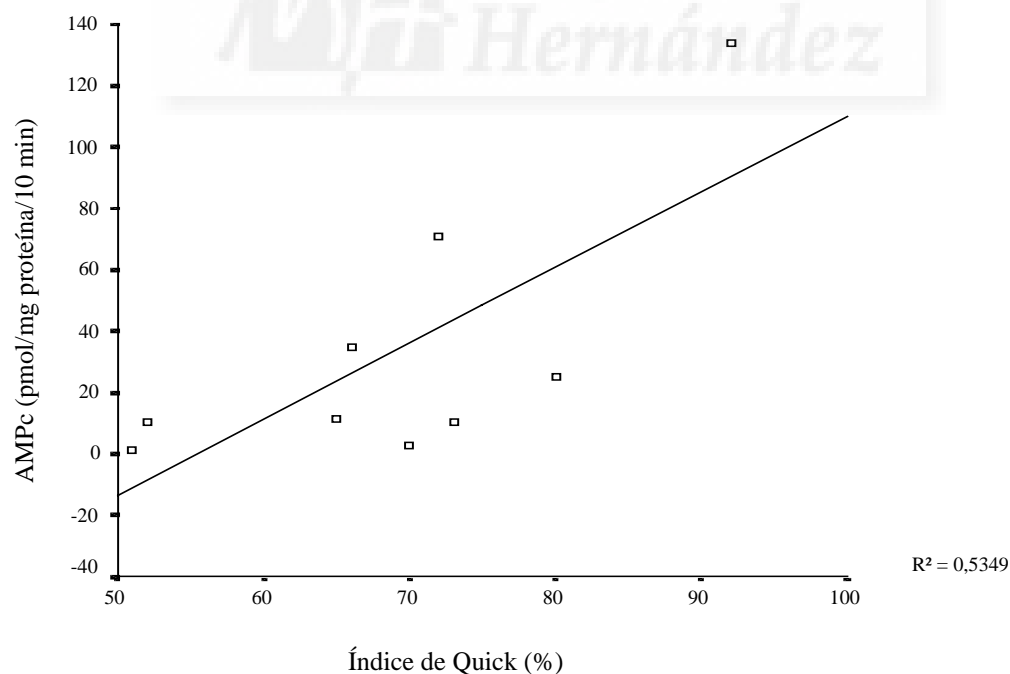
**Tabla 60.** Producción de AMPc basal (  $\bar{X} \pm Ds$ ) en membranas de hematíes en función de las variables clínicas cualitativas en los pacientes de profilaxis primaria tras la administración de un bolus iv de propranolol.

De todas las variables evaluadas, tan sólo se ha encontrado correlación significativa entre la producción de AMPc con la edad y el índice de Quick. En las figuras 75 y 76, se representan cada una de estas variables y su relación con la producción de AMPc.



**Figura 75.** Correlación entre la producción de AMPc en membranas de hematíes y la edad en pacientes de profilaxis primaria tras la administración de un bolus iv de propranolol.

En esta correlación se observa que a medida que aumenta la edad de los pacientes, la producción de AMPc basal se incrementa en muestras extraídas tras la administración de un bolus iv de propranolol.



**Figura 76.** Correlación entre la producción de AMPc en membranas de hematíes y el índice de Quick en pacientes de profilaxis primaria tras la administración de un bolus iv de propranolol.

Los pacientes con un índice de Quick más alto presentan mayor producción basal de AMPc en estas muestras.

3.2.2.1.2. Tras el estímulo de isoproterenol  $10^{-4}$  M:

Se evaluó la correlación entre la producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M y las variables clínicas en muestras extraídas tras la administración de un bolus iv de propranolol. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 61 y 62:

Variable	Coefficiente correlación Pearson	P
Edad	0.439	0.204
Peso	0.176	0.824
Presión enclavada	-0.372	0.290
Presión libre	-0.292	0.413
GPVH	-0.255	0.477
Presión arterial sistólica	0.404	0.247
Presión arterial diastólica	0.475	0.165
Presión arterial media	0.451	0.190
Frecuencia cardíaca	<b>0.675*</b>	<b>0.032*</b>
Puntuación Child	-0.101	0.782
Leucocitos	0.182	0.614
Hemoglobina	0.241	0.503
Hematocrito	0.278	0.436
Plaquetas	0.253	0.481
GOT	-0.073	0.842
GPT	-0.096	0.792
GGT	-0.112	0.759
Fosfatasa alcalina	0.265	0.460
Creatinina	0.227	0.527
Glucosa	0.101	0.782
Albúmina	0.328	0.427
Bilirrubina	0.129	0.723
Quick	<b>0.682*</b>	<b>0.030*</b>

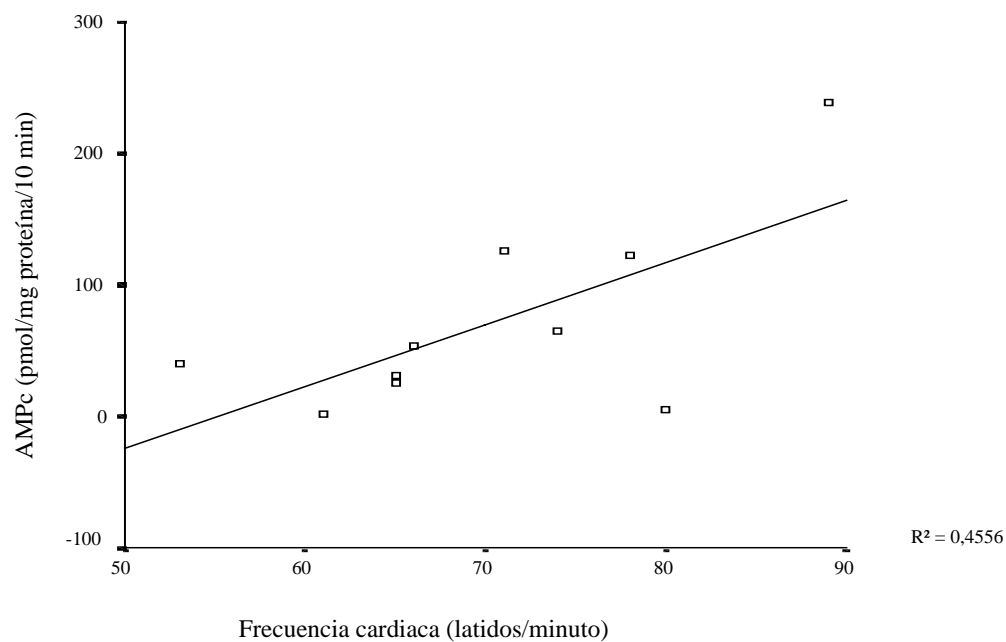
**Tabla 61.** Análisis del grado de correlación existente entre la producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M en membranas de hematíes y las variables clínicas en los pacientes de profilaxis primaria tras la administración de un bolus iv de propranolol. \*  $P < 0.05$ .



Variable		AMPc ( $\bar{X} \pm Ds$ ) (n)	P
Sexo	Masculino	37.6 $\pm$ 44.5 (6)	<b>0.038*</b>
	Femenino	120.9 $\pm$ 84.7 (4)	
Etiología de la cirrosis	Alcohol	58.4 $\pm$ 52.5 (6)	0.762
	Virus	89.7 $\pm$ 103.2 (4)	
Consumo activo de alcohol	Si	73.6 $\pm$ 60.5 (4)	0.762
	No	69.1 $\pm$ 86.1 (6)	
$\beta$ -bloqueantes en el mes previo	Si	115.2 $\pm$ 91.3 (4)	0.114
	No	41.4 $\pm$ 44.7 (6)	
Furosemida en el mes previo	Si	62.2 $\pm$ 86.1 (2)	0.711
	No	73.1 $\pm$ 76.0 (8)	
Espironolactona en el mes previo	Si	100.9 $\pm$ 40.9 (3)	0.183
	No	58.1 $\pm$ 82.5 (7)	
Lactulosa	Si	126.0 (1)	0.400
	No	64.8 $\pm$ 74.7 (9)	
Respuesta estudio hemodinámico	Si	48.6 $\pm$ 45.8 (6)	0.610
	No	104.4 $\pm$ 100.2 (4)	

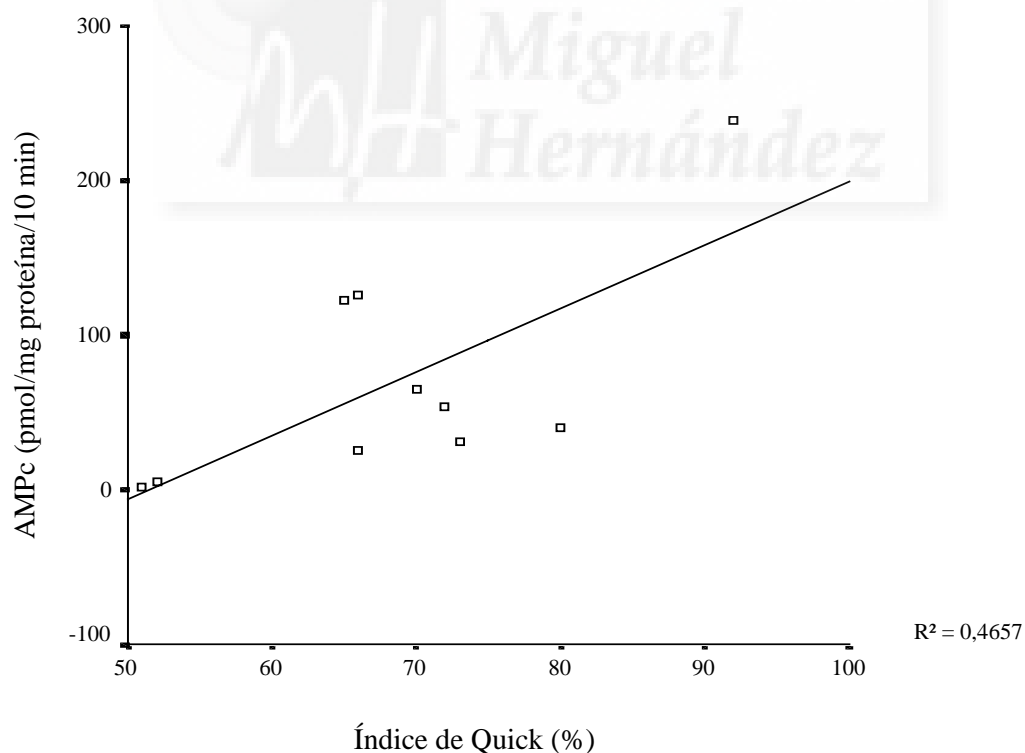
**Tabla 62.** Producción de AMPc (  $\bar{X} \pm Ds$ ) en membranas de hematíes tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M en función de las variables cualitativas clínicas estudiadas en los pacientes de profilaxis primaria tras la administración de un bolus iv de propranolol. \*  $P < 0.05$ .

De todas las variables evaluadas, sólo se ha encontrado correlación significativa entre la producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M después del bolus iv de propranolol con la frecuencia cardiaca, el índice de Quick y el sexo de los pacientes. En las figuras 77 a 79 se representan cada una de estas variables y su relación con la producción de AMPc:



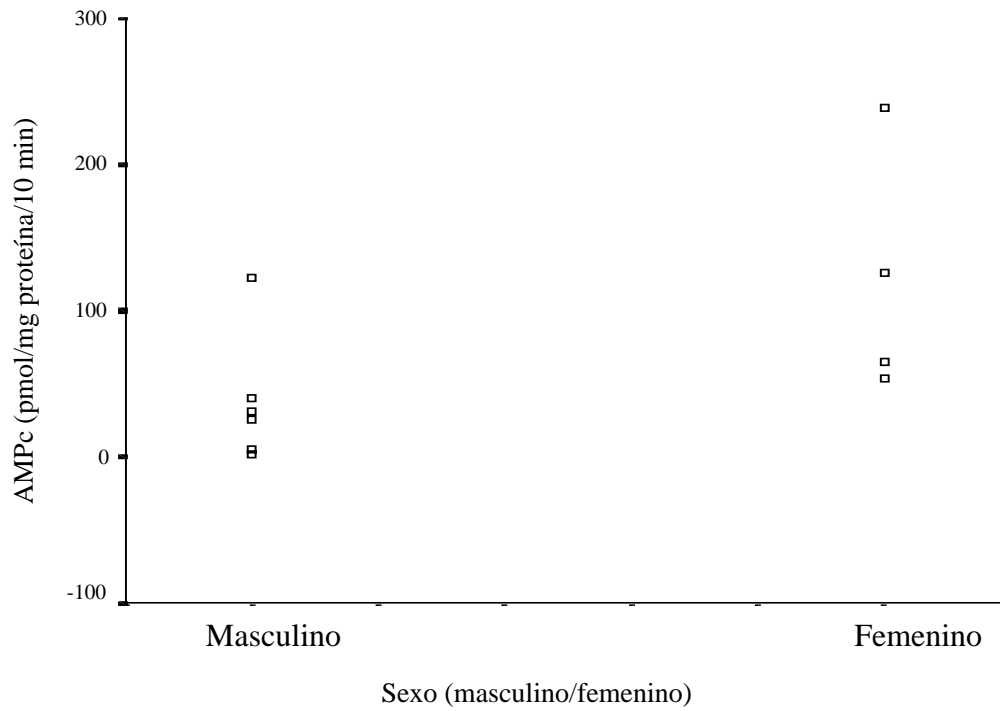
**Figura 77.** Correlación entre la frecuencia cardiaca y la producción de AMPc en membranas de hematíes tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M en pacientes de profilaxis primaria que han recibido un bolus iv de propranolol.

Se observa que en los pacientes con valores de frecuencia cardiaca más bajos, la producción de AMPc en respuesta a isoproterenol  $10^{-4}$  M es también más baja.



**Figura 78.** Correlación entre el índice de Quick y la producción de AMPc en membranas de hematíes tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M en pacientes de profilaxis primaria que han recibido un bolus iv de propranolol.

En los pacientes con índices de Quick más bajos, es menor la producción de AMPc en respuesta a isoproterenol  $10^{-4}$  M.



**Figura 79.** Comparación entre el sexo y la producción de AMPc en membranas de hematíes tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M en pacientes de profilaxis primaria que han recibido un bolus iv de propranolol.

En este caso, la producción de AMPc en las membranas de hematíes tras el estímulo con isoproterenol en los pacientes de profilaxis primaria no depende del sexo.

**3.2.2.2. Análisis de las posibles correlaciones entre la capacidad de respuesta al isoproterenol  $10^{-4}$  M (estímulo relativo del isoproterenol) y las variables clínicas y/o demográficas en los pacientes de profilaxis primaria después de la administración de un bolus iv de propranolol:**

Hemos evaluado el incremento en la producción de AMPc por parte de la AC inducido por isoproterenol  $10^{-4}$  M. Para ello, hemos calculado el número de veces que se incrementa la producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol en relación al valor de AMPc previo, es decir, antes del estímulo beta (estímulo relativo del isoproterenol). En las tablas 63 y 64 se muestran los resultados.

Variable	Coefficiente correlación Pearson	P
Edad	-0.212	0.584
Peso	0.967	0.165
Presión enclavada	-0.096	0.806
Presión libre	-0.047	0.904
GPVH	-0.282	0.462
Presión arterial sistólica	0.266	0.490
Presión arterial diastólica	0.198	0.609
Presión arterial media	0.239	0.535
Frecuencia cardiaca	0.227	0.556
Puntuación Child	-0.102	0.794
Leucocitos	0.126	0.747
Hemoglobina	0.365	0.334
Hematocrito	0.441	0.235
Plaquetas	0.323	0.397
GOT	0.345	0.364
GPT	0.647	0.060
GGT	-0.196	0.614
Fosfatasa alcalina	-0.060	0.877
Creatinina	-0.237	0.540
Glucosa	-0.043	0.912
Albúmina	-0.046	0.922
Bilirrubina	0.129	0.741
Índice de Quick	0.032	0.936

**Tabla 63.** Análisis del grado de correlación existente entre el estímulo relativo del isoproterenol en membranas de hematíes y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes de profilaxis primaria después de la administración de un bolus iv de propranolol.

Variable		Estímulo relativo del isoproterenol ( $\bar{X} \pm Ds$ ) (n)	P
Sexo	Masculino	3.0 ± 4.0 (6)	0.548
	Femenino	8.9 ± 13.2 (3)	
Etiología de la cirrosis	Alcohol	3.3 ± 4.3 (5)	0.730
	Virus	6.9 ± 11.5 (4)	
Consumo activo de alcohol	Si	4.3 ± 5.7 (3)	0.905
	No	5.2 ± 9.3 (6)	
β-bloqueantes en el mes previo	Si	9.7 ± 12.6 (3)	0.095
	No	2.6 ± 4.1 (6)	
Nitritos en el mes previo al estudio	Si	- (0)	-
	No	4.9 ± 7.9 (9)	
Furosemida en el mes previo	Si	5.9 ± 7.0 (2)	0.667
	No	4.7 ± 8.7 (7)	
Espironolactona en el mes previo	Si	5.8 ± 7.1 (2)	0.889
	No	4.7 ± 8.6 (7)	
Lactulosa en el mes previo	Si	- (0)	-
	No	4.9 ± 7.9 (9)	
Respuesta estudio hemodinámico	Si	5.6 ± 10.4 (5)	0.556
	No	4.1 ± 4.6 (4)	

**Tabla 64.** Estímulo relativo del isoproterenol en membranas de hematíes ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas en los pacientes de profilaxis primaria después de la administración de un bolus iv de propranolol.

No se han encontrado correlaciones significativas entre el estímulo relativo del isoproterenol y las variables clínicas evaluadas.

**3.2.2.3. Análisis de las posibles correlaciones entre la capacidad de bloqueo del propranolol  $10^{-5}$  M (bloqueo relativo del propranolol) y las variables clínicas y/o demográficas en los pacientes de profilaxis primaria después de la administración de un bolus iv de propranolol:**

Hemos evaluado el descenso inducido por propranolol  $10^{-5}$  M estimulada por isoproterenol  $10^{-4}$  M. Para ello, hemos calculado el número de veces que disminuye el valor de AMPc tras el bloqueo con propranolol  $10^{-5}$  M en relación al AMPc tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M (bloqueo relativo del propranolol). En la tablas 65 y 66 se muestran los resultados.

Variable	Coefficiente correlación Pearson	P
Edad	-0.370	0.327
Peso	0.235	0.849
Presión enclavada	0.121	0.757
Presión libre	-0.107	0.785
GPVH	0.287	0.454
Presión arterial sistólica	-0.111	0.776
Presión arterial diastólica	-0.401	0.285
Presión arterial media	-0.252	0.513
Frecuencia cardiaca	0.443	0.232
Puntuación Child	0.140	0.719
Leucocitos	0.382	0.310
Hemoglobina	-0.663	0.052
Hematocrito	-0.580	0.102
Plaquetas	-0.141	0.717
GOT	-0.110	0.778
GPT	-0.413	0.269
GGT	-0.274	0.475
Fosfatasa alcalina	-0.488	0.183
Creatinina	0.212	0.585
Glucosa	-0.426	0.252
Albúmina	0.284	0.537
Bilirrubina	0.182	0.639
Índice de Quick	-0.621	0.074

**Tabla 65.** Análisis del grado de correlación existente entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y las variables clínicas en los pacientes de profilaxis primaria después de la administración de un bolus iv de propranolol.

Variable		Bloqueo relativo del propranolol ( $\bar{X} \pm Ds$ ) (n)	P
Sexo	Masculino	0.9 $\pm$ 0.9 (6)	0.905
	Femenino	0.8 $\pm$ 0.1 (3)	
Etiología de la cirrosis	Alcohol	0.9 $\pm$ 1.0 (5)	0.413
	Virus	0.8 $\pm$ 0.2 (4)	
Consumo activo de alcohol	Si	1.2 $\pm$ 1.3 (3)	0.714
	No	0.6 $\pm$ 0.3 (6)	
$\beta$ -bloqueantes en el mes previo	Si	0.5 $\pm$ 0.4 (3)	0.262
	No	1.0 $\pm$ 0.8 (6)	
Nitritos en el mes previo	Si	- (0)	-
	No	0.8 $\pm$ 0.7 (9)	
Furosemida en el mes previo	Si	0.9 $\pm$ 0.1 (2)	0.333
	No	0.8 $\pm$ 0.8 (7)	
Espironolactona en el mes previo	Si	0.9 $\pm$ 0.0 (2)	0.500
	No	0.8 $\pm$ 0.9 (7)	
Lactulosa en el mes previo	Si	- (0)	-
	No	0.8 $\pm$ 0.7 (9)	
Respuesta estudio hemodinámico	Si	1.1 $\pm$ 0.9 (5)	0.190
	No	0.5 $\pm$ 0.3 (4)	
Estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M	Si	0.5 $\pm$ 0.4 (5)	0.111
	No	1.3 $\pm$ 0.9 (4)	

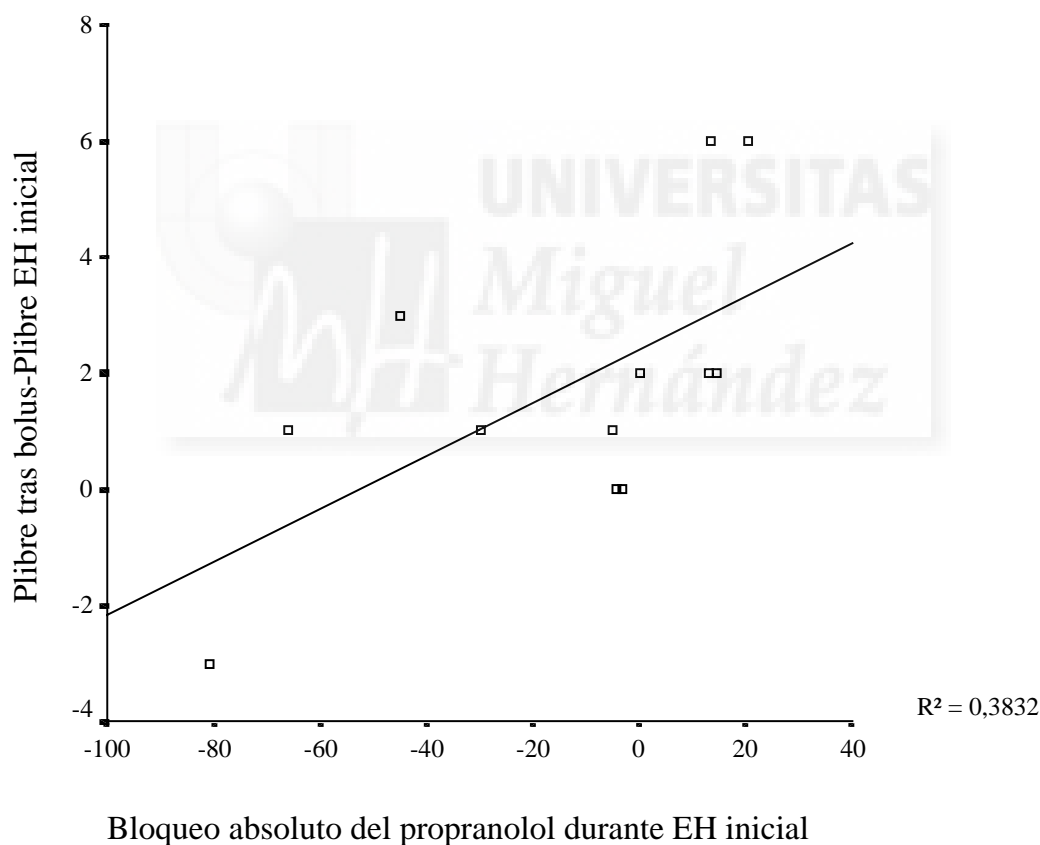
**Tabla 66.** Bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas en los pacientes de profilaxis primaria después del bolus iv de propranolol.

No se ha encontrado ninguna correlación significativa entre el bloqueo relativo del propranolol y las diferentes variables clínicas evaluadas.

### 3.2.2.4. Análisis de los posibles cambios en las variables hemodinámicas tras la administración de un bolus iv de propranolol en los pacientes de profilaxis primaria:

Se han evaluado las posibles correlaciones entre los cambios inducidos por la administración de propranolol en las variables hemodinámicas (GPVH, FC, PAS, PAD, PAM, PE y PL), entendidos como la diferencia en los valores de dichas variables antes y tras la administración de un bolus iv de propranolol y los valores de AMPc sin y tras estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M.

En el caso de los pacientes del subgrupo de profilaxis primaria, no se ha encontrado ninguna correlación significativa entre las variables hemodinámicas y el efecto del isoproterenol ni durante el EH inicial ni tras la administración del bolus iv de propranolol. Tampoco existe correlación significativa entre la producción de AMPc inducido por el agonista isoproterenol  $10^{-4}$  M en presencia de propranolol  $10^{-5}$  M. Existe una correlación significativa entre la diferencia en las presiones libres cuantificadas durante la medida del GPVH antes y después de la administración del bolus iv de propranolol y la disminución en la producción de AMPc inducido por propranolol durante el EH inicial (Coeficiente de correlación de Pearson: 0.619;  $P = 0.032$ ). En la figura 80 se representa dicha correlación.



**Figura 80.** Correlación entre las presiones libres tras la administración de un bolus iv de propranolol y el EH inicial, y el descenso en la producción de AMPc en membranas de hematíes inducido por propranolol  $10^{-5}$  M (bloqueo absoluto del propranolol) durante el EH inicial en los pacientes de profilaxis primaria.

En la tabla 67 se resumen las correlaciones encontradas entre los valores de AMPc y las variables clínicas en los pacientes de profilaxis primaria incluidos en el estudio tras la administración del bolus iv de propranolol.



	Tras la administración de un bolus iv de propranolol	
	Profilaxis Primaria	Relevancia de la correlación
AMPc sin estímulo	Edad, Índice de Quick	Relevante Relevante
AMPc tras isoproterenol $10^{-4}$ M	FC, Índice de Quick, Sexo	Relevante Relevante Relevante
Incremento en la producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M	-	-
Descenso en la producción de AMPc inducido por propranolol $10^{-5}$ M en presencia de isoproterenol $10^{-4}$ M	-	-
Cambios en las variables hemodinámicas	Cambios en la P. libre y el descenso en la producción de AMPc inducido por propranolol durante el EH inicial (bloqueo absoluto del propranolol)	Relevante

**Tabla 67.** Cuadro resumen de las correlaciones entre la actividad de la AC y las variables clínicas en los pacientes de profilaxis primaria incluidos en el estudio tras la administración del bolus iv de propranolol.

### 3.2.3. Pacientes del grupo de profilaxis secundaria:

#### 3.2.3.1. Análisis de las posibles correlaciones entre la actividad de la AC y las variables clínicas de los pacientes de profilaxis secundaria tras la administración de un bolus iv de propranolol:

##### 3.2.3.1.1. Actividad basal:

Al igual que con los pacientes de profilaxis primaria, se han buscado posibles correlaciones entre las variables clínicas y los niveles de AMPc en membranas de hematíes antes del estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M evaluados tras la administración del bolus iv de propranolol en los pacientes de profilaxis secundaria. Los resultados obtenidos se recogen en las tablas 68 y 69:

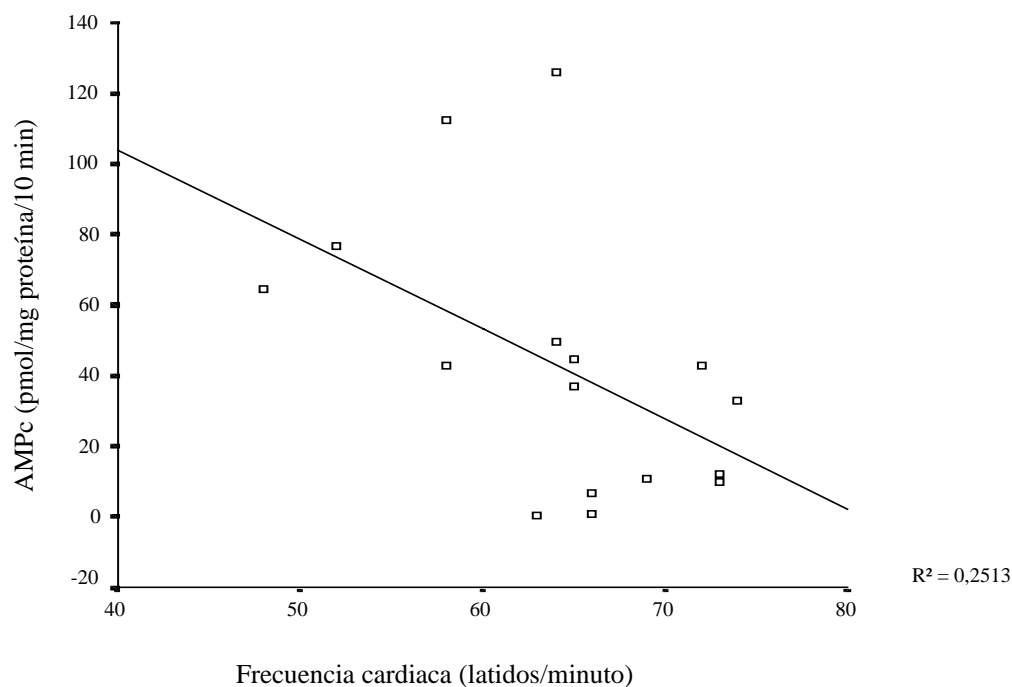
Variable	Coefficiente correlación Pearson	P
Bolsas sangre transfundidas	-0.464	0.208
Edad	0.417	0.060
Peso	0.069	0.871
Presión enclavada	<b>-0.461*</b>	<b>0.041*</b>
Presión libre	-0.414	0.070
GPVH	-0.257	0.275
Presión arterial sistólica	-0.382	0.145
Presión arterial diastólica	-0.041	0.879
Presión arterial media	-0.186	0.492
Frecuencia cardiaca	<b>-0.501*</b>	<b>0.048*</b>
Puntuación Child	-0.064	0.787
Leucocitos	0.069	0.766
Hemoglobina	-0.080	0.730
Hematocrito	-0.078	0.736
Plaquetas	-0.220	0.337
GOT	-0.345	0.176
GPT	0.071	0.787
GGT	-0.094	0.730
Fosfatasa alcalina	<b>-0.591*</b>	<b>0.016*</b>
Creatinina	0.002	0.995
Glucosa	0.330	0.181
Albúmina	-0.241	0.351
Bilirrubina	0.028	0.916
Quick	-0.195	0.409

**Tabla 68.** Análisis del grado de correlación entre la producción de AMPc basal y/o antes del estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M en membranas de hematíes y las variables clínicas cuantitativas estudiadas en los pacientes de profilaxis secundaria tras la administración de un bolus iv de propranolol. \* P < 0.05.

Variable		AMPc ( $\bar{X} \pm Ds$ ) (n)	P
Somatostatina	Simple	39.7 $\pm$ 38.2 (7)	1.000
	Doble	36.9 (1)	
Sexo	Masculino	38.1 $\pm$ 43.5 (13)	0.414
	Femenino	40.4 $\pm$ 25.5 (8)	
Etiología de la cirrosis	Alcohol	38.1 $\pm$ 36.6 (11)	0.600
	Virus	44.5 $\pm$ 41.6 (8)	
Consumo activo de alcohol	Si	33.0 $\pm$ 23.1 (3)	1.000
	No	40.0 $\pm$ 39.1 (18)	
$\beta$ -bloqueantes en el mes previo	Si	33.4 $\pm$ 41.8 (7)	0.360
	No	41.7 $\pm$ 35.5 (14)	
Nitritos en el mes previo	Si	53.8 $\pm$ 52.1 (3)	0.534
	No	36.5 $\pm$ 35.2 (18)	
Furosemida en el mes previo	Si	74.5 $\pm$ 47.4 (3)	0.125
	No	33.1 $\pm$ 32.8 (18)	
Espironolactona en el mes previo	Si	64.2 $\pm$ 46.0 (6)	0.080
	No	28.9 $\pm$ 28.5 (15)	
Lactulosa en el mes previo	Si	35.0 $\pm$ 2.8 (2)	0.952
	No	39.4 $\pm$ 38.9 (19)	
Respuesta estudio hemodinámico	Si	39.2 $\pm$ 29.1 (6)	0.569
	No	38.9 $\pm$ 40.5 (15)	

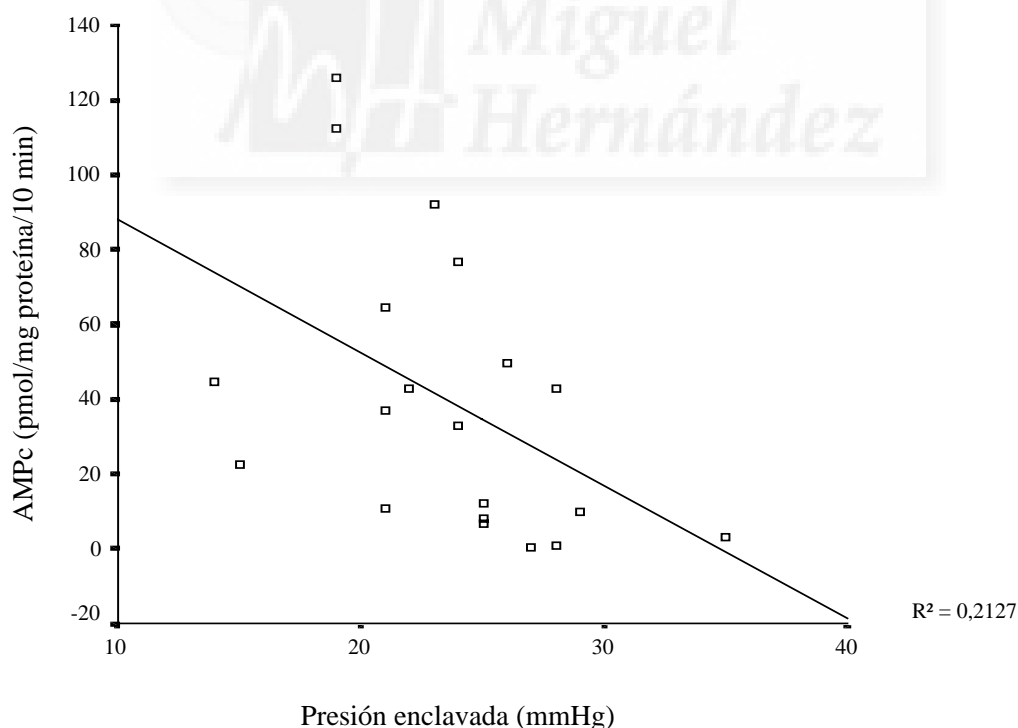
**Tabla 69.** Producción de AMPc basal (  $\bar{X} \pm Ds$ ) en membranas de hematíes en función de las variables clínicas cualitativas estudiadas en los pacientes de profilaxis secundaria tras la administración de un bolus iv de propranolol.

Se ha encontrado correlación significativa entre los valores de AMPc basal, medidos en hematíes de muestras extraídas tras la administración del propranolol iv, con la presión enclavada, la frecuencia cardíaca y la fosfatasa alcalina, en pacientes de profilaxis secundaria. En las figuras 81 a 83, se representan cada una de estas variables y su relación con la producción de AMPc basal:



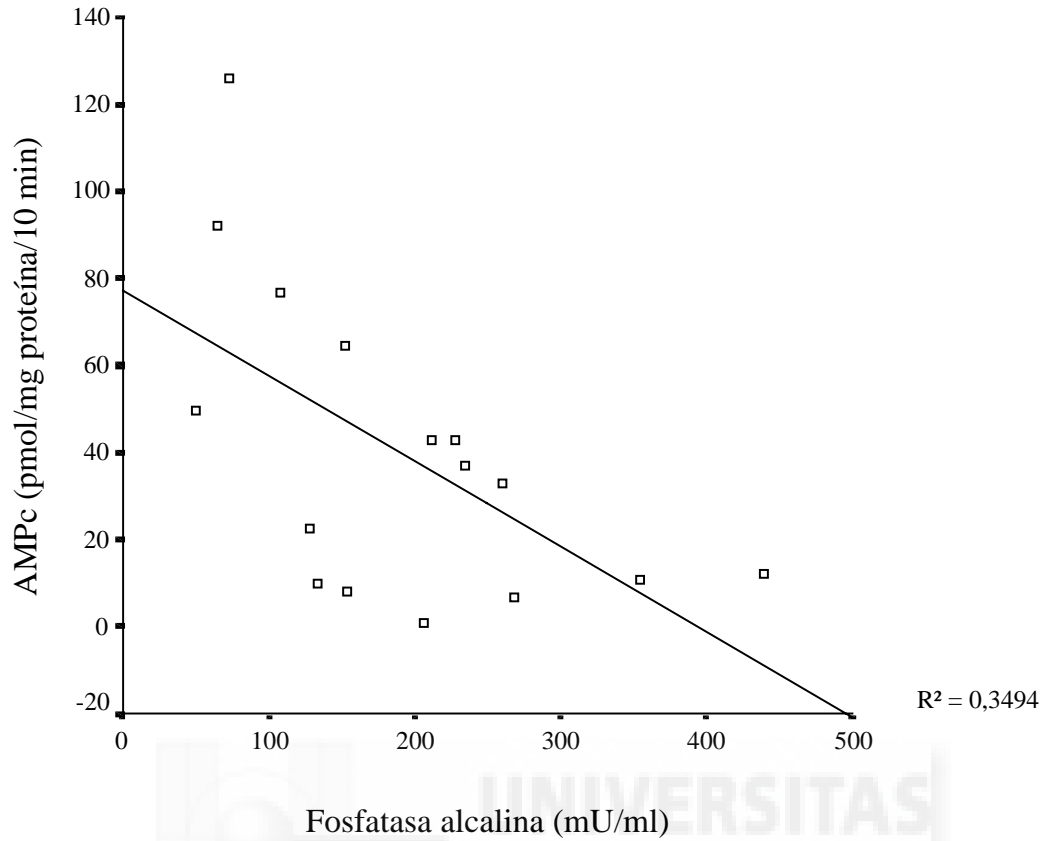
**Figura 81.** Correlación entre la actividad de la AC en membranas de hematíes y la frecuencia cardiaca en pacientes de profilaxis secundaria tras la administración de un bolus iv de propranolol.

De esta representación se desprende que aquellos pacientes con frecuencias cardiacas más bajas, producen niveles más elevados de AMPc en condiciones basales.



**Figura 82.** Correlación entre la actividad de la AC en membranas de hematíes y la presión enclavada en los pacientes de profilaxis secundaria tras la administración de un bolus iv de propranolol.

En esta correlación se observa que cuanto menor es la presión enclavada de los pacientes, más elevada es la producción basal de AMPc en membranas de hematíes.



**Figura 83.** Correlación entre la actividad de la AC en membranas de hematíes y la concentración de fosfatasa alcalina en pacientes de profilaxis secundaria tras la administración de un bolus iv de propranolol.

De esta correlación se desprende que aquellos pacientes con niveles de fosfatasa alcalina bajos presentan una mayor producción basal de AMPc.

### 3.2.3.1.2. Tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M:

Se ha buscado la posible correlación entre las variables clínicas y los niveles de AMPc tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M en muestras obtenidas después de la administración de un bolus iv de propranolol. Los resultados obtenidos se recogen en las tablas 70 y 71:

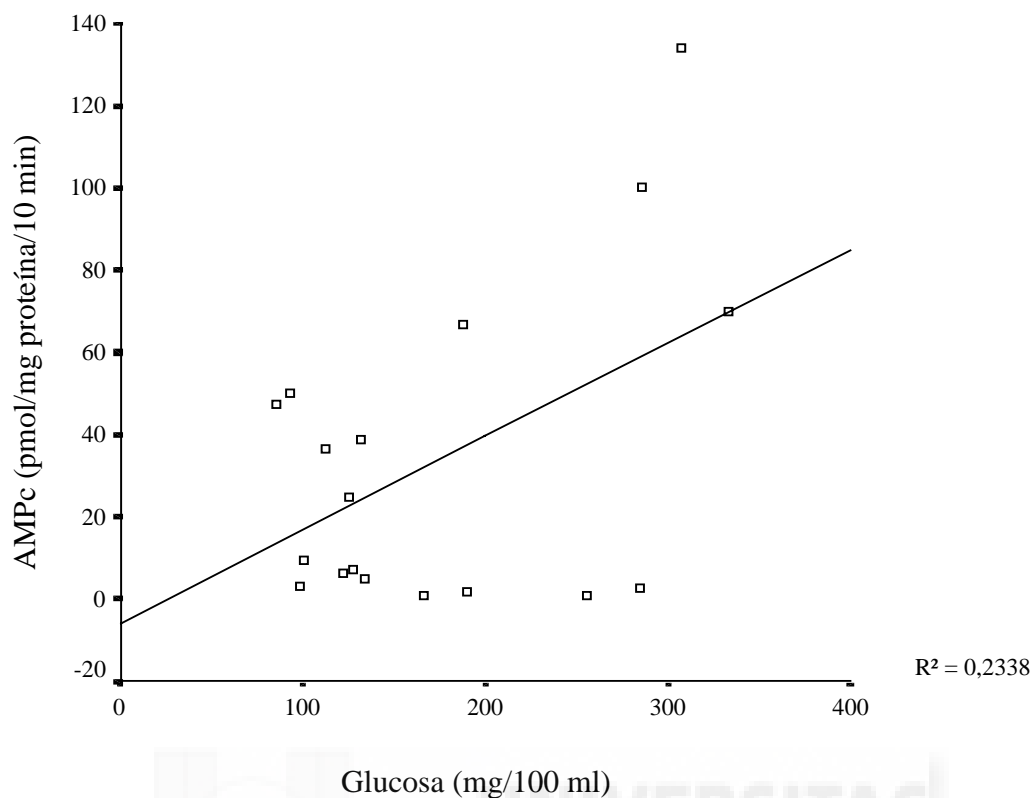
Variable	Coefficiente correlación Pearson	P
Bolsas sangre transfundidas	-0.420	0.261
Edad	0.265	0.246
Peso	0.136	0.748
Presión enclavada	-0.307	0.188
Presión libre	-0.273	0.245
GPVH	-0.172	0.467
Presión arterial sistólica	-0.361	0.170
Presión arterial diastólica	-0.188	0.487
Presión arterial media	-0.279	0.294
Frecuencia cardiaca	-0.488	0.055
Puntuación Child	0.148	0.532
Leucocitos	0.081	0.727
Hemoglobina	-0.218	0.343
Hematocrito	-0.275	0.227
Plaquetas	-0.031	0.895
GOT	-0.374	0.139
GPT	0.082	0.755
GGT	-0.184	0.496
Fosfatasa alcalina	<b>-0.564*</b>	<b>0.023*</b>
Creatinina	-0.181	0.473
Glucosa	<b>0.483*</b>	<b>0.042*</b>
Albúmina	0.388	0.124
Bilirrubina	-0.147	0.573
Quick	-0.268	0.253

**Tabla 70.** Análisis del grado de correlación entre la producción de AMPc en membranas de hematíes tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M en función de las variables clínicas cuantitativas estudiadas en los pacientes de profilaxis secundaria tras la administración de un bolus iv de propranolol. \* P < 0.05.

Variable		AMPc ( $\bar{X} \pm Ds$ ) (n)	P
Somatostatina	Simple	23.5 $\pm$ 25.6 (7)	0.750
	Doble	36.4 (1)	
Sexo	Masculino	32.6 $\pm$ 42.7 (13)	0.595
	Femenino	25.0 $\pm$ 27.4 (8)	
Etiología de la cirrosis	Alcohol	32.5 $\pm$ 40.2 (11)	0.492
	Virus	24.5 $\pm$ 34.9 (8)	
Consumo activo de alcohol	Si	18.5 $\pm$ 24.9 (3)	0.887
	No	31.6 $\pm$ 39.0 (18)	
$\beta$ -bloqueantes en el mes previo	Si	31.9 $\pm$ 46.8 (7)	0.913
	No	28.6 $\pm$ 33.2 (14)	
Nitritos en el mes previo	Si	60.0 $\pm$ 65.6 (3)	0.221
	No	24.7 $\pm$ 30.4 (18)	
Furosemida en el mes previo	Si	42.3 $\pm$ 51.7 (3)	0.740
	No	27.6 $\pm$ 35.6 (18)	
Espironolactona en el mes previo	Si	51.2 $\pm$ 53.7 (6)	0.205
	No	21.2 $\pm$ 25.6 (15)	
Lactulosa en el mes previo	Si	18.9 $\pm$ 24.7 (2)	0.610
	No	30.9 $\pm$ 38.5 (19)	
Respuesta estudio hemodinámico	Si	25.1 $\pm$ 33.6 (6)	0.677
	No	31.6 $\pm$ 39.3 (15)	

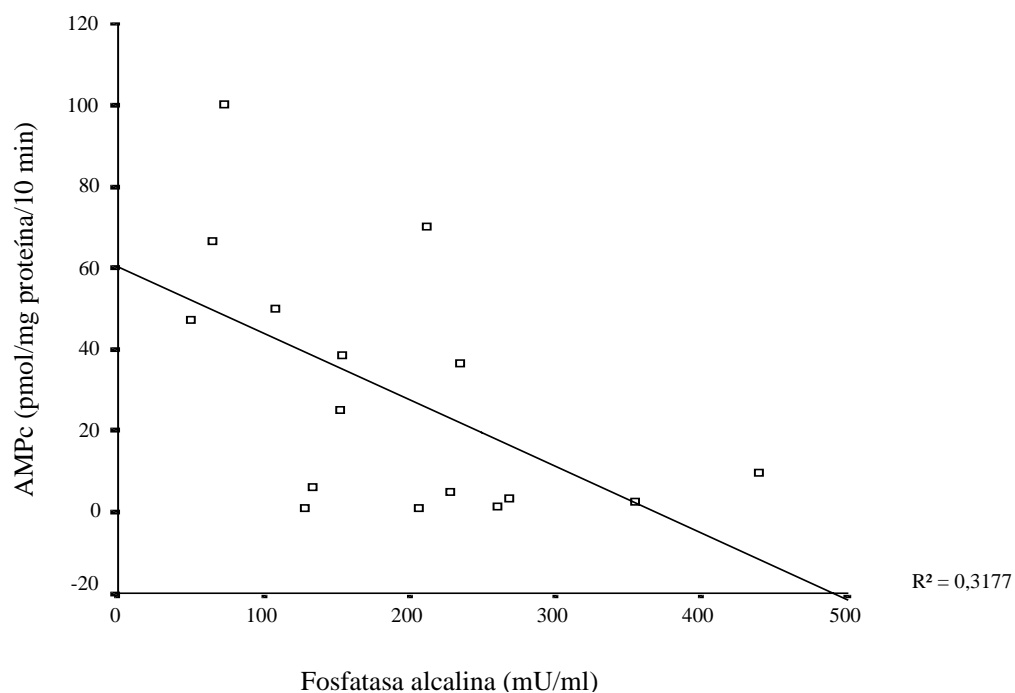
**Tabla 71.** Producción de AMPc (  $\bar{X} \pm Ds$ ) en membranas de hematíes tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M en función de las variables cualitativas clínicas estudiadas en los pacientes de profilaxis secundaria tras la administración de un bolus iv de propranolol.

Sólo se ha encontrado correlación entre el AMPc producido tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M con la fosfatasa alcalina y la glucosa. Dichas correlaciones se representan en las figuras 84 y 85:



**Figura 84.** Correlación entre la actividad de la AC en membranas de hematíes estimulada por isoproterenol  $10^{-4}$  M y los niveles plasmáticos de glucosa en pacientes de profilaxis secundaria tras la administración de un bolus iv de propranolol.

Se puede observar que a medida que aumentan los niveles de glucosa en los pacientes, aumenta de forma paralela la producción de AMPc en respuesta a isoproterenol  $10^{-4}$  M mientras que ocurre lo contrario con los niveles de fosfatasa alcalina (figura 70).



**Figura 85.** Correlación entre la actividad de la AC en membranas de hematíes estimulada por isoproterenol  $10^{-4}$  M y los niveles plasmáticos de fosfatasa alcalina en pacientes de profilaxis secundaria tras la administración de un bolus iv de propranolol.



**3.2.3.2. Análisis de las posibles correlaciones entre la capacidad de respuesta de la AC al isoproterenol  $10^{-4}$  M (estímulo relativo del isoproterenol) y las variables clínicas y/o demográficas en los pacientes de profilaxis secundaria :**

Hemos evaluado el incremento en la producción de AMPc por parte de la AC después del estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M. Para ello, hemos calculado el número de veces que se incrementa la producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol en relación al valor de AMPc previo, es decir, antes del estímulo beta (estímulo relativo del isoproterenol). En la tablas 72 y 73 se muestran los resultados.

Variable	Coefficiente correlación Pearson	P
Bolsas de sangre transfundidas	-0.215	0.578
Edad	-0.173	0.454
Peso	-0.031	0.942
Presión enclavada	0.184	0.436
Presión libre	0.081	0.733
GPVH	0.166	0.485
Presión arterial sistólica	-0.300	0.259
Presión arterial diastólica	-0.397	0.128
Presión arterial media	-0.401	0.123
Frecuencia cardiaca	-0.072	0.791
Puntuación Child	0.076	0.751
Leucocitos	-0.093	0.687
Hemoglobina	-0.036	0.877
Hematocrito	0.004	0.987
Plaquetas	0.199	0.388
GOT	-0.011	0.967
GPT	-0.009	0.973
GGT	-0.052	0.848
Fosfatasa alcalina	-0.139	0.609
Creatinina	-0.213	0.395
Glucosa	0.038	0.879
Albúmina	-0.238	0.358
Bilirrubina	-0.270	0.295
Índice de Quick	-0.047	0.843

**Tabla 72.** Análisis del grado de correlación existente entre el estímulo relativo del isoproterenol en membranas de hematíes y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes de profilaxis secundaria después de recibir un bolus iv de propranolol.

Variable		Estímulo relativo del isoproterenol ( $\bar{X} \pm Ds$ ) (n)	P
Somatostatina	Simple	4.2 ± 9.7 (7)	0.750
	Doble	1.0 (1)	
Sexo	Masculino	2.9 ± 7.1 (13)	0.547
	Femenino	0.6 ± 0.5 (8)	
Etiología de la cirrosis	Alcohol	3.3 ± 7.7 (11)	0.177
	Virus	0.4 ± 0.3 (8)	
	Otras	1.3 ± 0.4 (2)	
	Alcohol + virus	- (0)	
Consumo activo de alcohol	Si	0.5 ± 0.4 (3)	0.669
	No	2.3 ± 6.0 (18)	
β-bloqueantes en el mes previo	Si	4.4 ± 9.6 (7)	0.079
	No	0.8 ± 1.2 (14)	
Nitritos en el mes previo al estudio	Si	1.0 ± 0.2 (3)	0.185
	No	2.2 ± 6.1 (18)	
Furosemida en el mes previo	Si	0.4 ± 0.4 (3)	0.356
	No	2.3 ± 6.0 (18)	
Espironolactona en el mes previo	Si	0.7 ± 0.4 (6)	0.791
	No	2.5 ± 6.6 (15)	
Lactulosa en el mes previo	Si	0.5 ± 0.7 (2)	0.686
	No	2.2 ± 5.9 (19)	
Respuesta estudio hemodinámico	Si	0.5 ± 0.6 (6)	0.132
	No	2.6 ± 6.6 (15)	

**Tabla 73.** Estímulo relativo del isoproterenol ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas en las membranas de hematíes de pacientes de profilaxis secundaria después de la administración de un bolus iv de propranolol. \* P < 0.05.

De todas las variables evaluadas, no se ha encontrado ninguna correlación significativa con el incremento en la producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M.

**3.2.3.3. Análisis de las posibles correlaciones entre la capacidad de bloqueo del propranolol  $10^{-5}$  M (bloqueo relativo del propranolol) y las variables clínicas y/o demográficas en las membranas de hematíes de muestras extraídas después de la administración de un bolus iv de propranolol en los pacientes de profilaxis secundaria:**

Hemos evaluado el descenso en la producción de AMPc por parte de la AC después de estimular con isoproterenol  $10^{-4}$  M y bloquear con propranolol  $10^{-5}$  M. Para ello, hemos calculado el número de veces que disminuye el valor de AMPc tras el bloqueo con propranolol  $10^{-5}$  M en relación al AMPc tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M (bloqueo relativo del propranolol). En las siguientes tablas 74 y 75 se muestran los resultados de estos análisis.

Variable	Coefficiente correlación Pearson	P
Bolsas de sangre transfundidas	0.320	0.401
Edad	-0.105	0.650
Peso	0.282	0.499
Presión enclavada	<b>-0.444*</b>	<b>0.050*</b>
Presión libre	-0.349	0.132
GPVH	-0.285	0.224
Presión arterial sistólica	<b>0.508*</b>	<b>0.044*</b>
Presión arterial diastólica	<b>0.664*</b>	<b>0.005*</b>
Presión arterial media	<b>0.674*</b>	<b>0.004*</b>
Frecuencia cardiaca	0.151	0.576
Puntuación Child	<b>-0.724*</b>	<b>0.000*</b>
Leucocitos	-0.054	0.815
Hemoglobina	0.329	0.145
Hematocrito	0.386	0.084
Plaquetas	0.194	0.399
GOT	0.323	0.206
GPT	0.472	0.056
GGT	-0.152	0.574
Fosfatasa alcalina	0.137	0.613
Creatinina	<b>0.736*</b>	<b>0.000*</b>
Glucosa	0.049	0.848
Albúmina	0.044	0.867
Bilirrubina	-0.230	0.374
Índice de Quick	0.112	0.637

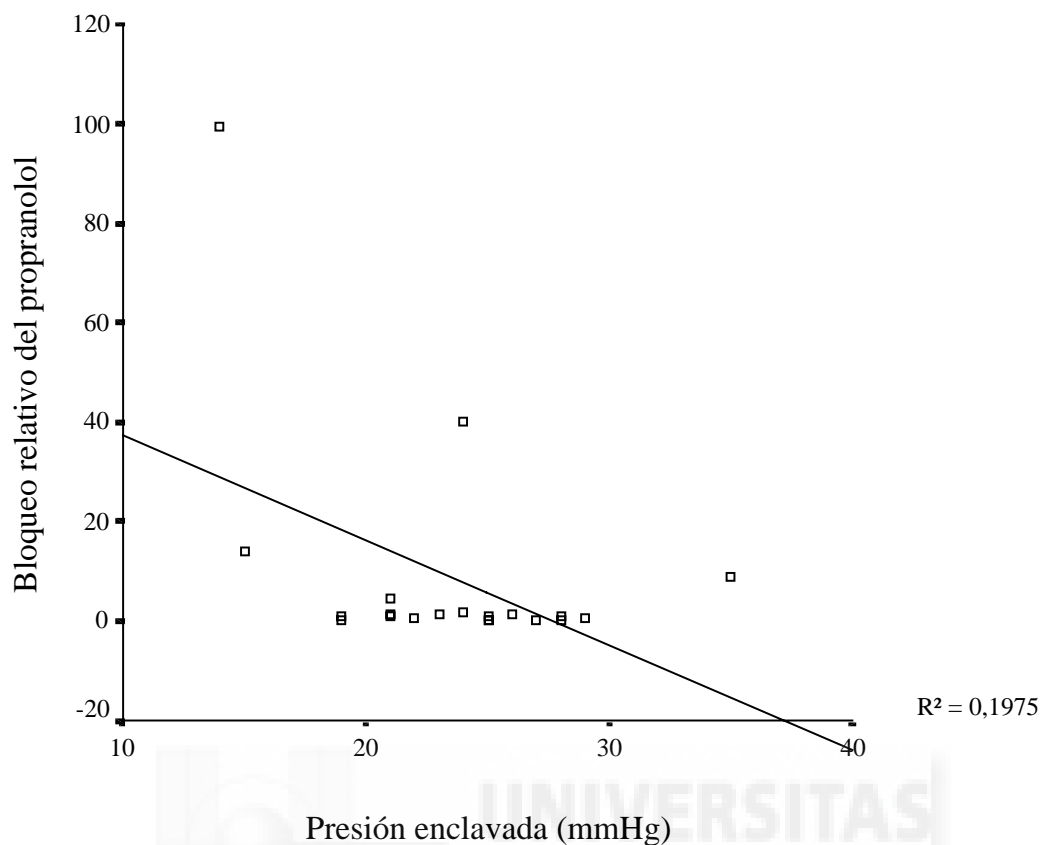
**Tabla 74.** Análisis del grado de correlación existente entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes de profilaxis secundaria después de la administración de un bolus iv de propranolol.\*  $P \leq 0.05$ .

Variable		Bloqueo relativo del propranolol ( $\bar{X} \pm Ds$ ) (n)	P
Somatostatina	Simple	6.5 ± 14.8 (7)	1.000
	Doble	1.2 (1)	
Sexo	Masculino	2.3 ± 4.2 (13)	0.064
	Femenino	18.7 ± 35.4 (8)	
Etiología de la cirrosis	Alcohol	10.6 ± 29.6 (11)	0.778
	Virus	7.7 ± 13.9 (8)	
	Otras	0.7 ± 0.4 (2)	
	Alcohol + virus	- (0)	
Consumo activo de alcohol	Si	0.8 ± 0.6 (3)	0.471
	No	9.9 ± 24.4 (18)	
β-bloqueantes en el mes previo	Si	0.7 ± 0.4 (7)	0.149
	No	12.5 ± 27.2 (14)	
Nitritos en el mes previo	Si	0.8 ± 0.4 (3)	0.534
	No	9.9 ± 24.4 (18)	
Furosemina en el mes previo	Si	13.7 ± 22.9 (3)	0.887
	No	7.7 ± 23.2 (18)	
Espironolactona en el mes previo	Si	7.2 ± 16.1 (6)	0.519
	No	9.1 ± 25.3 (15)	
Lactulosa en el mes previo	Si	20.6 ± 27.5 (2)	0.286
	No	7.3 ± 22.6 (19)	
Respuesta estudio hemodinámico	Si	20.3 ± 39.2 (6)	<b>0.045*</b>
	No	3.9 ± 10.2 (15)	

**Tabla 75.** Bloqueo relativo del propranolol ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en membranas de hematíes en función de las variables clínicas cualitativas en los pacientes de profilaxis secundaria después de la administración de un bolus iv de propranolol.\* P < 0.05.

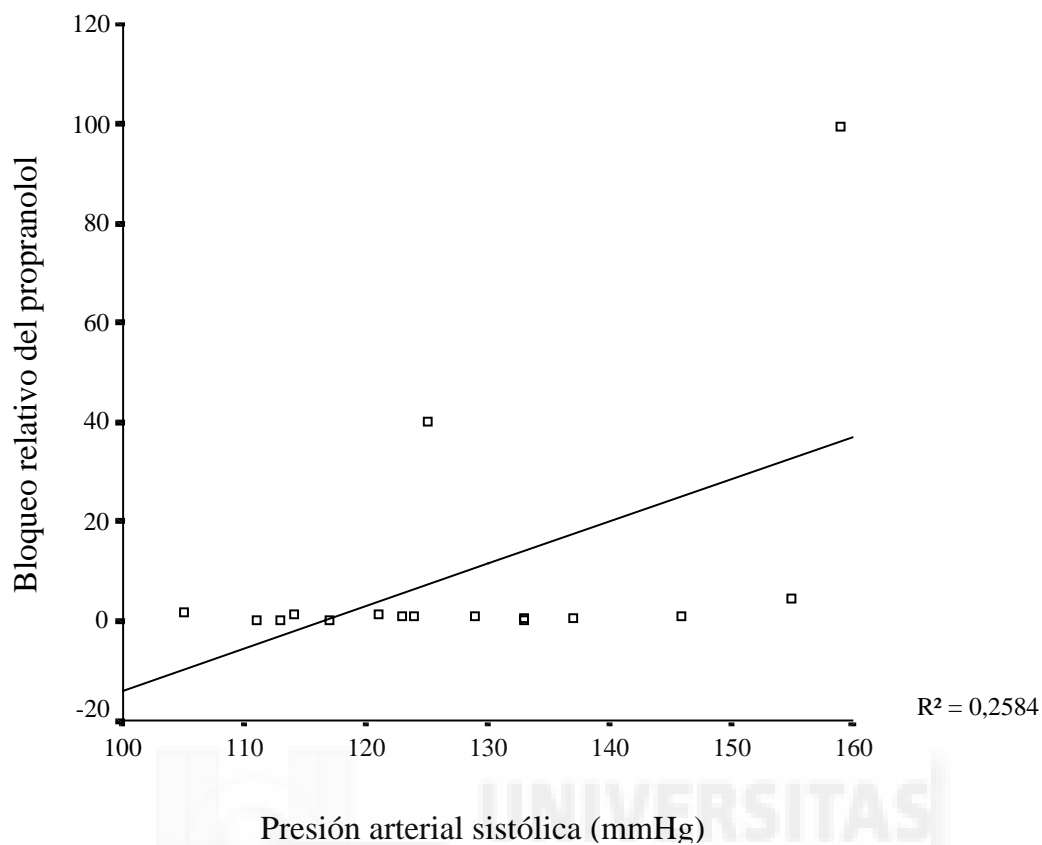
De todas las variables evaluadas, se ha encontrado una correlación significativa entre el bloqueo relativo del propranolol y la presión enclavada, la presión arterial sistólica, la presión arterial diastólica, la presión arterial media, puntuación de Child, creatinina, respuesta al estudio hemodinámico.

En las figuras 86 a 92, se representan estas variables y su relación con el descenso en la producción de AMPc en presencia de propranolol  $10^{-5}$  M.



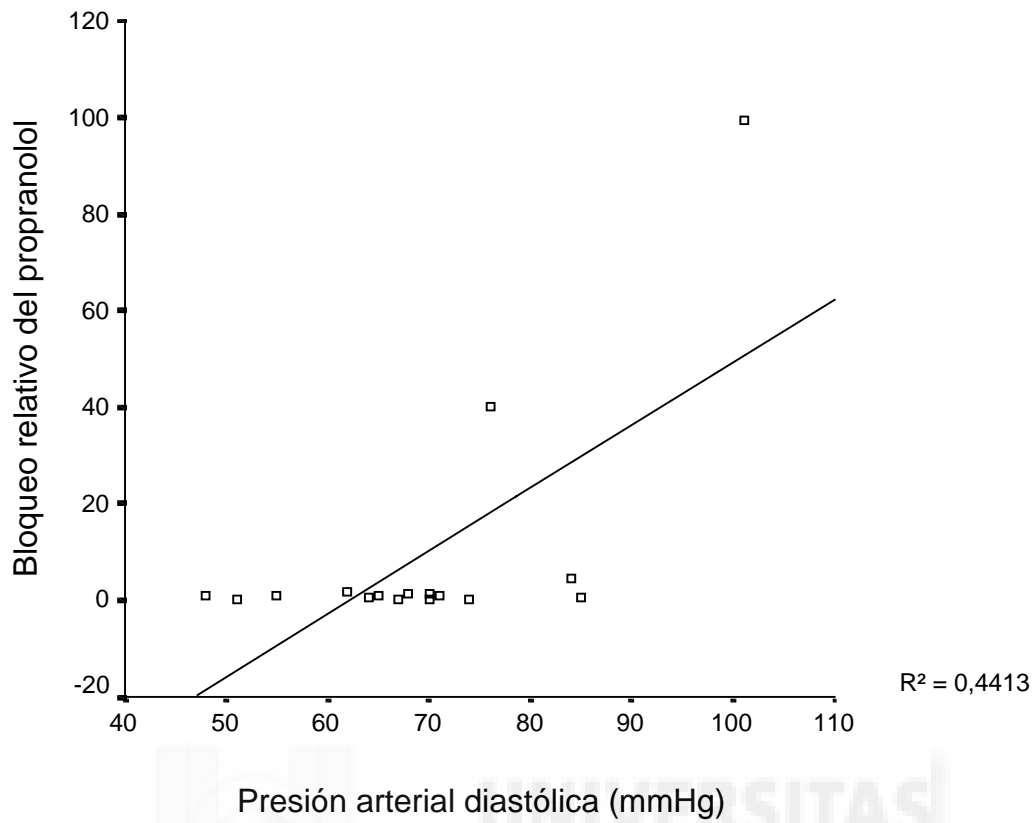
**Figura 86.** Correlación entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y la presión enclavada en pacientes de profilaxis secundaria tras la administración de un bolus iv de propranolol.

Esta correlación muestra, con la excepción de 3 puntos, que la capacidad de bloqueo por parte del propranolol  $10^{-5}$  M es independiente de los valores de presión enclavada alcanzados dentro del hígado.



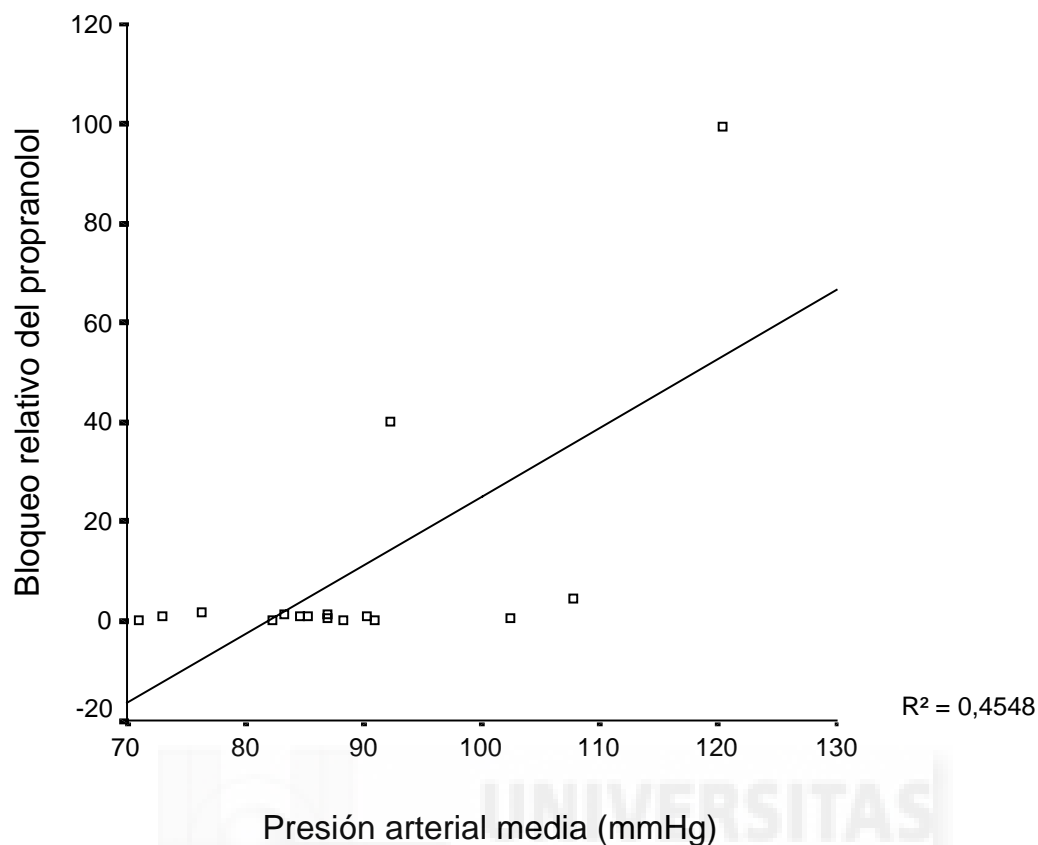
**Figura 87.** Correlación entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y la presión arterial sistólica en pacientes de profilaxis secundaria tras la administración de un bolus iv de propranolol.

Igualmente, la capacidad de bloqueo por parte del propranolol  $10^{-5}$  M es independiente de los valores de presión arterial sistólica.



**Figura 88.** Correlación entre el bloqueo relativo del propranolol y la presión arterial diastólica en pacientes de profilaxis secundaria tras la administración de un bolus iv de propranolol.

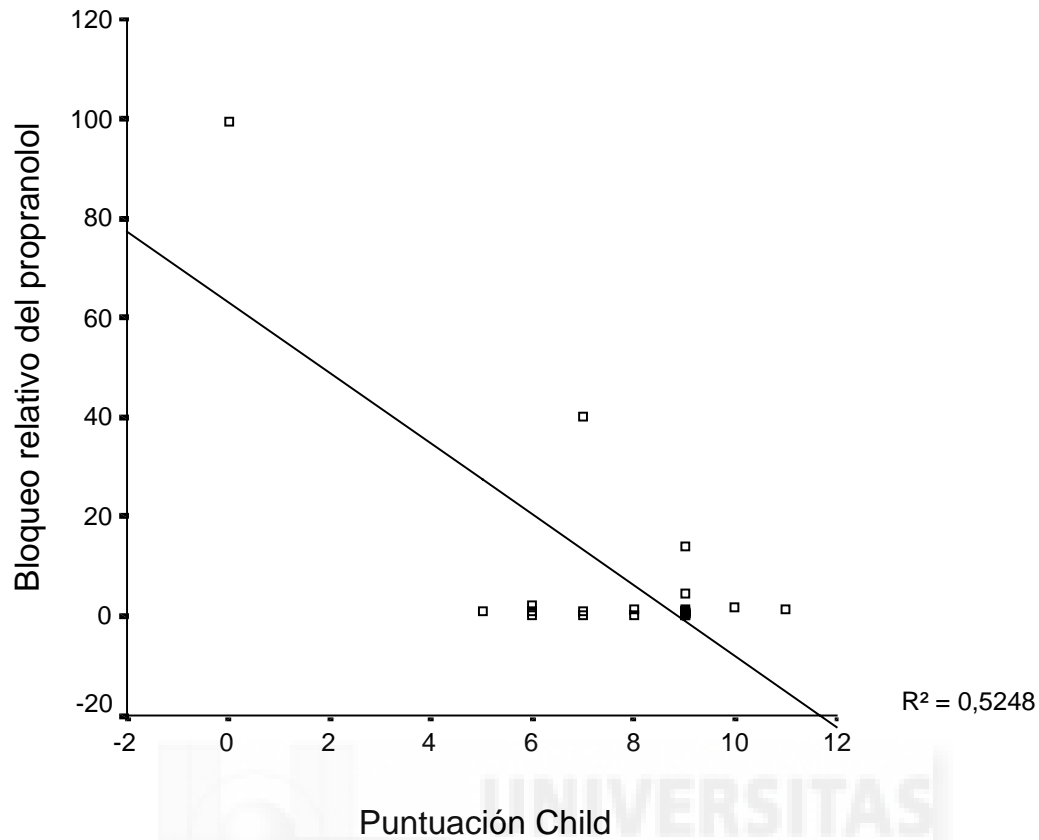
De la misma manera que en los 2 casos anteriores, con la excepción de 2 valores, la capacidad de bloqueo por parte del propranolol es independiente de los niveles de presión arterial diastólica.



**Figura 89.** Correlación entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y la presión arterial media en pacientes de profilaxis secundaria tras la administración de un bolus iv de propranolol.

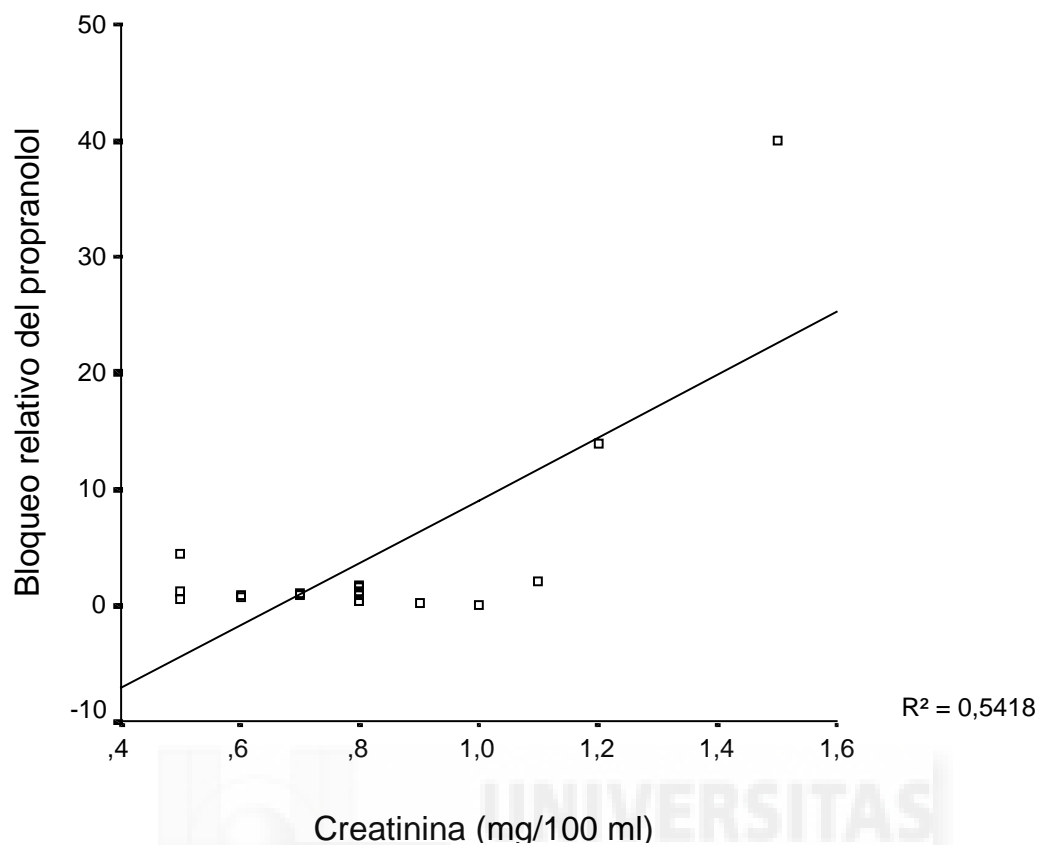
Al igual que en los casos anteriores, la capacidad de bloqueo del estímulo de la AC inducido por isoproterenol  $10^{-4}$  M en membranas de hematíes es independiente de los valores de presión arterial media.





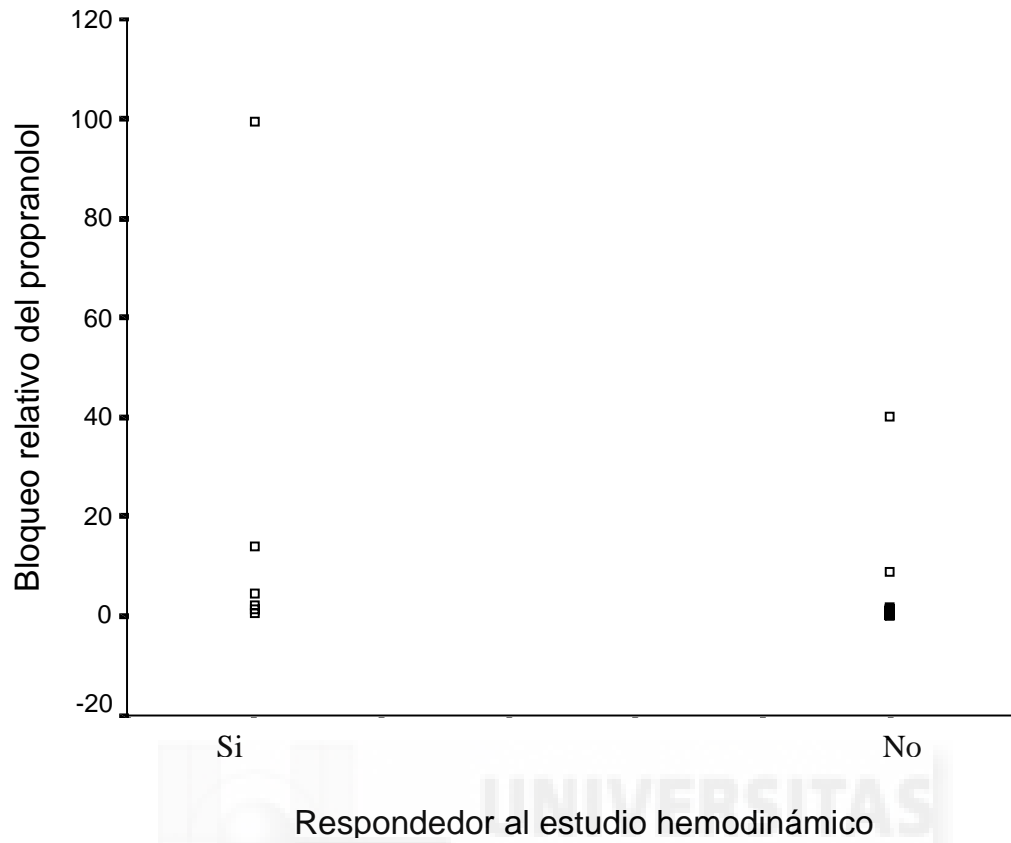
**Figura 90.** Correlación entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y la puntuación Child en pacientes de profilaxis secundaria tras la administración de un bolus iv de propranolol.

Igualmente, la puntuación de Child no influye sobre la capacidad de respuesta del propranolol  $10^{-5}$  M.



**Figura 91.** Correlación entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y los niveles plasmáticos de creatinina en pacientes de profilaxis secundaria tras la administración de un bolus iv de propranolol.

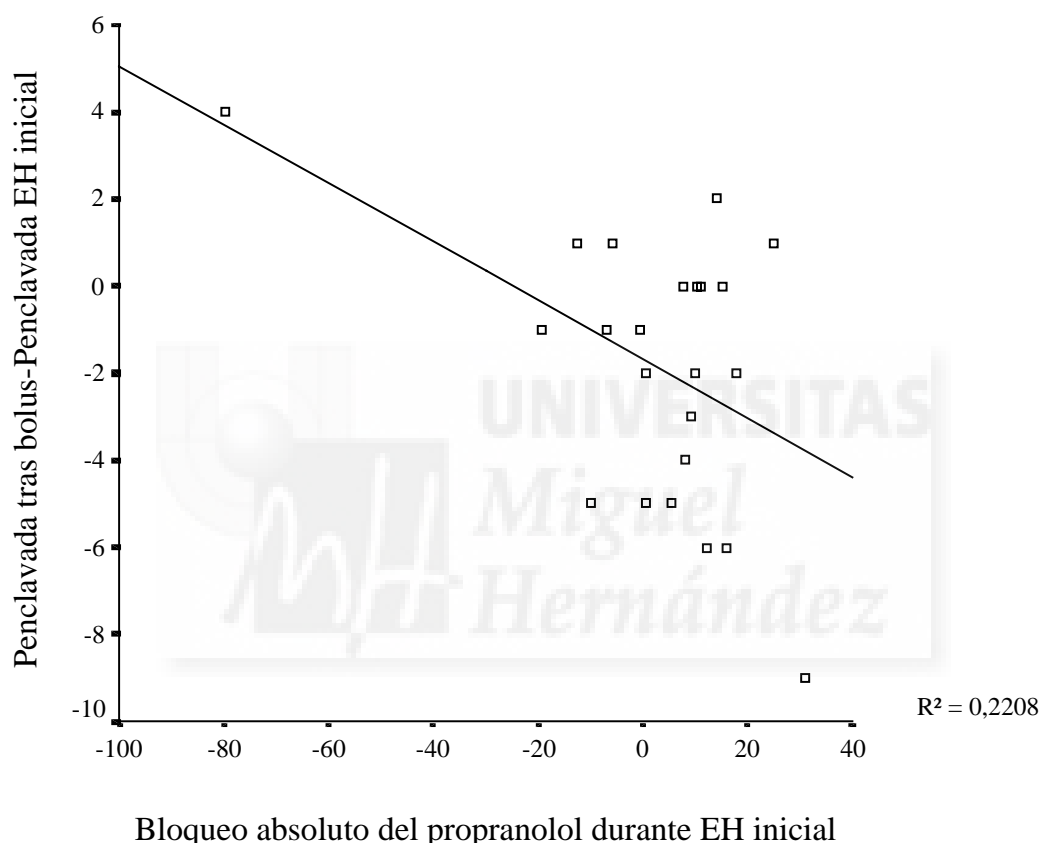
Al igual que en las correlaciones anteriores, los niveles de creatinina no parecen influir sobre la capacidad de bloqueo por parte del propranolol  $10^{-5}$  M.



**Figura 92.** Comparación entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y la respuesta al EH en pacientes de profilaxis secundaria tras la administración de un bolus iv de propranolol.

### 3.2.3.4. Análisis de los posibles cambios en las variables hemodinámicas tras la administración de un bolus iv de propranolol en los pacientes de profilaxis secundaria:

En el caso de los pacientes del subgrupo de profilaxis secundaria sólo existe una correlación significativa entre la diferencia en las presiones enclavadas cuantificadas durante la medida del GPVH, antes y después de la administración del bolus iv de propranolol, y la disminución en la producción de AMPc en las membranas de hematíes en presencia de propranolol  $10^{-5}$  M durante el EH inicial (Coeficiente de correlación de Pearson: 0.619;  $P = 0.032$ ). En la figura 93 se representa dicha correlación.



**Figura 93.** Correlación entre las presiones enclavadas tras la administración de un bolus iv de propranolol y el EH inicial, y el descenso en la producción de AMPc en membranas de hematíes inducido por propranolol  $10^{-5}$  M (bloqueo absoluto del propranolol) en los pacientes de profilaxis secundaria.

En la tabla 76 se resumen las correlaciones encontradas entre los valores de AMPc y las variables clínicas en los pacientes de profilaxis secundaria incluidos en el estudio tras la administración del bolus iv de propranolol.

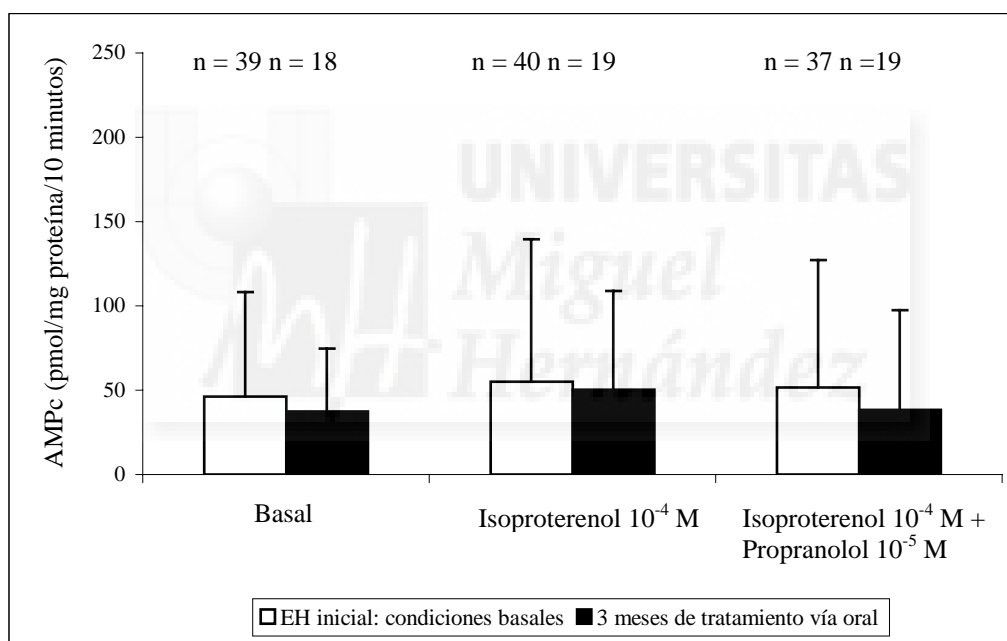
	Tras la administración de un bolus iv de propranolol	
	Profilaxis Secundaria	Relevancia de la correlación
AMPc sin estímulo	PE, FC, Fosfatasa alcalina	Relevante Relevante Relevante
AMPc tras isoproterenol $10^{-4}$ M	Fosfatasa alcalina, Glucosa	Relevante Relevante
Incremento en la producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M	-	-
Descenso en la producción de AMPc inducido por propranolol $10^{-5}$ M en presencia de isoproterenol $10^{-4}$ M	PE PAS PAD PAM Puntuación Child Creatinina Respuesta al EH	Relevante Irrelevante Relevante Irrelevante Irrelevante Irrelevante Irrelevante
Cambios en las variables hemodinámicas	Cambios en la PE y el descenso en la producción de AMPc inducido por propranolol durante el EH inicial (bloqueo absoluto del propranolol)	Irrelevante

**Tabla 76.** Cuadro resumen de las correlaciones entre la actividad de la AC en membranas de hematíes y las variables clínicas en los pacientes de profilaxis secundaria incluidos en el estudio tras la administración de un bolus iv de propranolol.

#### 4. ACTIVIDAD DEL SISTEMA DE LA AC EN MEMBRANAS DE HEMATÍES EN LOS PACIENTES CIRRÓTICOS CON HTP TRAS 3 MESES DE TRATAMIENTO CON PROPRANOLOL ORAL:

##### 4.1. VALORACIÓN DE TODOS LOS PACIENTES CIRRÓTICOS:

En el conjunto de pacientes cirróticos estudiados la actividad basal de la AC en membranas de hematíes tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral fue de  $37.5 \pm 37.3$  pmol AMPc/mg proteína/10 minutos incubación. Esta actividad se incrementó a  $50.2 \pm 58.7$  pmol AMPc/mg proteína/10 minutos incubación tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M, y se redujo a  $38.3 \pm 59.1$  pmol AMPc/mg proteína/10 minutos incubación cuando el propranolol  $10^{-5}$  M estuvo presente. Estos valores no fueron significativamente diferentes de los obtenidos en el estudio inicial.



**Figura 94.** Valores medios de AMPc en membranas de hematíes durante el EH inicial y tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral en los pacientes cirróticos con HTP.

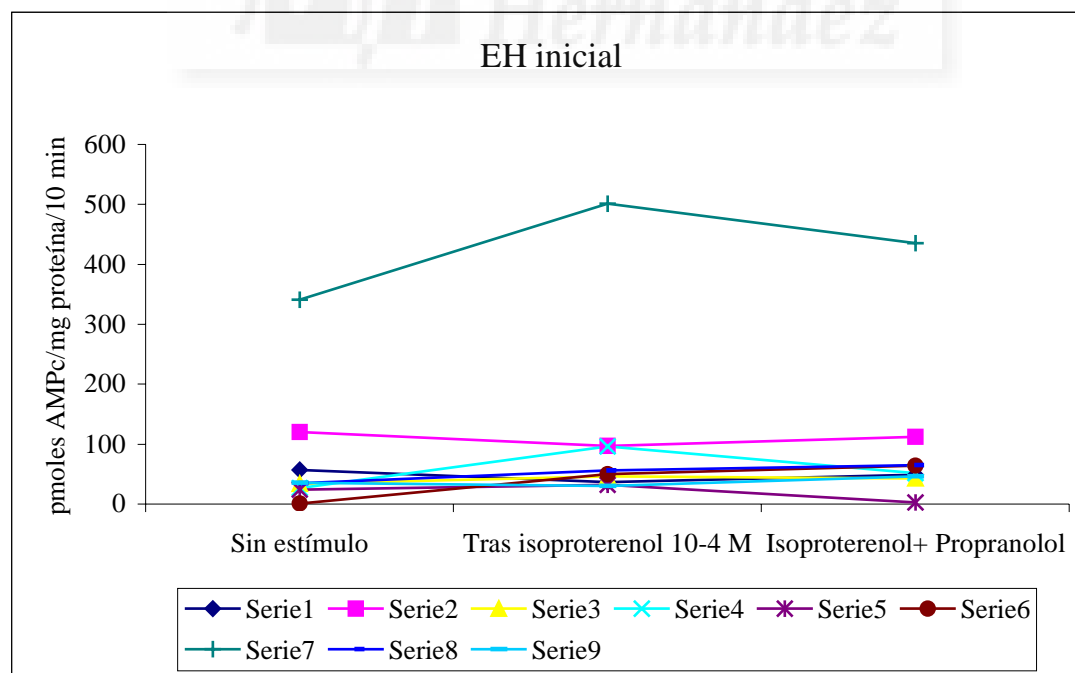
Para los pacientes cirróticos con HTP se calcularon, los valores del estímulo absoluto y relativo del isoproterenol  $10^{-4}$  M y el bloqueo relativo y absoluto del propranolol  $10^{-5}$  M tras 3 meses de tratamiento con propranolol. Los resultados se recogen en la tabla 77 y también se indican los resultados obtenidos antes de la administración iv de propranolol con el fin de facilitar la comparación:

	EH inicial	Tras 3 meses de tratamiento con propranolol
	Pacientes con HTP	Pacientes con HTP
Estímulo relativo del isoproterenol $10^{-4}$ M	$1.36 \pm 7.40$ (39)	$0.95 \pm 2.64$ (18)
Bloqueo relativo del propranolol $10^{-5}$ M	$1.31 \pm 4.04$ (37)	$0.10 \pm 1.52$ (18)
Estímulo absoluto del isoproterenol $10^{-4}$ M	$10.03 \pm 38.30$ (39)	$10.94 \pm 32.37$ (18)
Bloqueo absoluto del propranolol $10^{-5}$ M	$-3.22 \pm 26.28$ (37)	$-9.93 \pm 41.58$ (18)

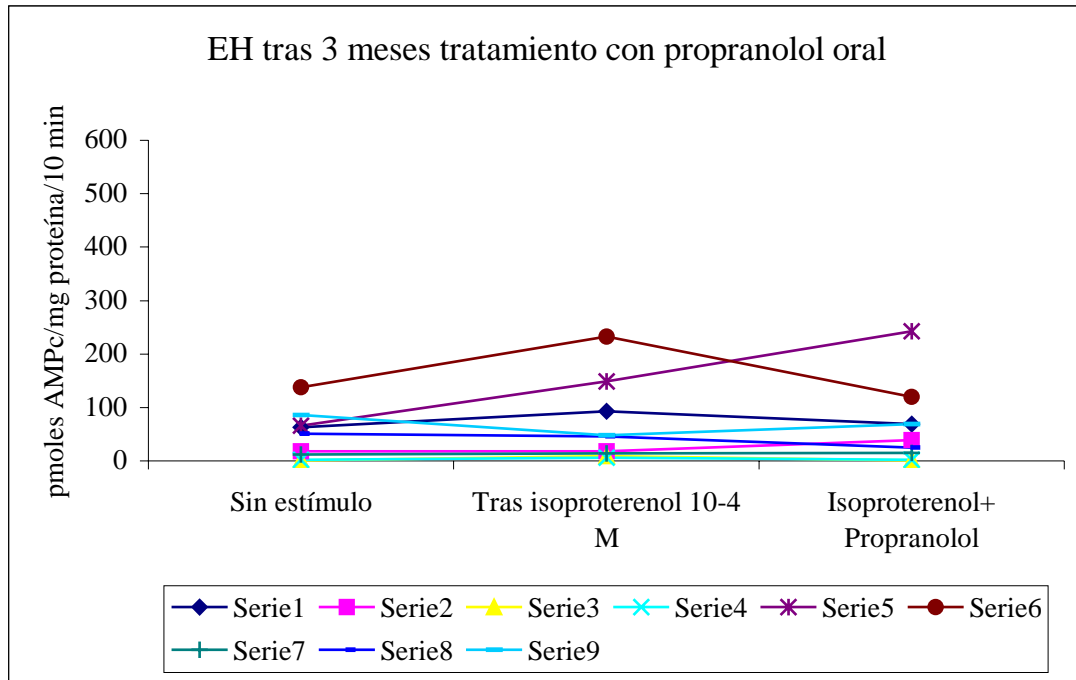
**Tabla 77.**  $\bar{X} \pm Ds$  (n) del estímulo relativo y absoluto para el isoproterenol y el bloqueo relativo y absoluto para propranolol en membranas de hematíes de pacientes cirróticos con HTP tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral y durante el EH inicial. Tanto el estímulo relativo del isoproterenol como el bloqueo relativo del propranolol se expresan en tanto por 1 mientras que el estímulo absoluto del isoproterenol y el bloqueo absoluto del propranolol se expresan en pmol AMPc/mg proteína/10 min.

No se han encontrado diferencias significativas en los valores de las variables anteriores durante el EH inicial y después de 3 meses de tratamiento continuado con propranolol en las membranas de hematíes de los pacientes cirróticos con HTP.

De manera paralela se realizó un análisis individualizado de los pacientes cirróticos participantes tanto en el EH inicial así como tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral (n = 9). En dicho análisis se calcularon los valores medios de AMPc en condiciones basales, tras un estímulo con isoproterenol y también en presencia de propranolol. No se encontraron diferencias significativas en estas variables entre los 2 estudios. En las figuras 95 y 96 se muestran los valores individualizados de AMPc para cada uno de los estudios hemodinámicos.



**Figura 95.** Representación de los valores individuales de AMPc de los pacientes cirróticos medidos en membranas de hematíes en condiciones basales (sin estímulo), tras un estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M y en presencia de propranolol durante el EH inicial. Cada una de las series corresponde a un paciente.



**Figura 96.** Representación de los valores individuales de AMPc de los pacientes cirróticos medidos en membranas de hematíes en condiciones basales (sin estímulo), tras un estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M y en presencia de propranolol después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral. Cada una de las series corresponde a un paciente.



#### 4.1.1. Análisis de las posibles correlaciones entre las variables clínicas y la producción basal de AMPc en membranas de hematíes de los pacientes cirróticos con HTP tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral:

##### 4.1.1.1. Actividad basal:

Se ha evaluado la existencia de posibles correlaciones entre las diferentes variables clínicas y los valores de AMPc basales en membranas de hematíes medidos tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral en los pacientes cirróticos. Los datos obtenidos se recogen en las tablas 78 y 79.

Variable	Coefficiente correlación Pearson	P
Edad	-0.032	0.898
Peso	-0.185	0.566
Presión enclavada	0.243	0.424
Presión libre	-0.282	0.351
GPVH	0.312	0.291
Presión arterial sistólica	-0.317	0.291
Presión arterial diastólica	-0.366	0.219
Presión arterial media	-0.417	0.157
Frecuencia cardiaca	0.217	0.476
Puntuación Child	0.063	0.804
Leucocitos	0.185	0.463
Hemoglobina	0.146	0.563
Hematocrito	0.126	0.618
Plaquetas	-0.039	0.877
GOT	-0.056	0.826
GPT	0.026	0.918
GGT	0.129	0.610
Fosfatasa alcalina	-0.084	0.748
Creatinina	0.036	0.886
Glucosa	-0.029	0.909
Albúmina	-0.182	0.534
Bilirrubina	0.399	0.101
Índice de Quick	0.027	0.916

**Tabla 78.** Análisis del grado de correlación existente entre las variables clínicas cuantitativas y la producción de AMPc en membranas de hematíes de los pacientes cirróticos con HTP tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral.

Variable		AMPc ( $\bar{X} \pm Ds$ ) (n)	P
Sexo	Masculino	39.6 $\pm$ 41.6 (12)	1.000
	Femenino	33.4 $\pm$ 29.9 (6)	
Etiología de la cirrosis	Alcohol	41.3 $\pm$ 45.2 (8)	0.536
	Virus	47.01 $\pm$ 30.1 (7)	
	Otras	5.2 $\pm$ 4.0 (3)	
	Alcohol + virus	(0)	
Consumo activo de alcohol	Si	83.9 $\pm$ 75.7 (2)	0.261
	No	31.7 $\pm$ 29.5 (16)	
$\beta$ -bloqueantes en el mes previo	Si	27.6 $\pm$ 23.7 (8)	0.633
	No	45.4 $\pm$ 45.1 (10)	
Nitritos en el mes previo	Si	18.4 (1)	0.889
	No	38.6 $\pm$ 38.1 (17)	
Furosemida en el mes previo	Si	20.0 (1)	1.000
	No	38.5 $\pm$ 38.2 (17)	
Espironolactona en el mes previo	Si	18.4 $\pm$ 20.2 (5)	0.246
	No	44.9 $\pm$ 40.3 (13)	
Lactulosa en el mes previo	Si	19.2 $\pm$ 1.1 (2)	0.837
	No	39.8 $\pm$ 39.1 (16)	
Respuesta estudio hemodinámico	Si	29.6 $\pm$ 32.8 (6)	0.445
	No	41.9 $\pm$ 45.6 (7)	
Somatostatina	Simple	36.3 $\pm$ 39.0 (4)	0.800
	Doble	34.6 $\pm$ 22.9 (2)	
Transfusión	Si	21.7 $\pm$ 17.2 (6)	0.494
	No	45.4 $\pm$ 42.6 (12)	

**Tabla 79.** Producción de AMPc (  $\bar{X} \pm Ds$ ) en membranas de hematíes en función de las variables clínicas cualitativas evaluadas en los pacientes cirróticos tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral.

Una vez evaluada todas las variables clínicas, no se ha encontrado ninguna correlación con los niveles de AMPc medidos en las membranas de hematíes.

#### 4.1.1.2. Tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M:

También se ha evaluado la existencia de correlaciones entre las diferentes variables clínicas y los valores de AMPc en membranas de hematíes tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral. Los resultados obtenidos se recogen en la tablas siguientes:

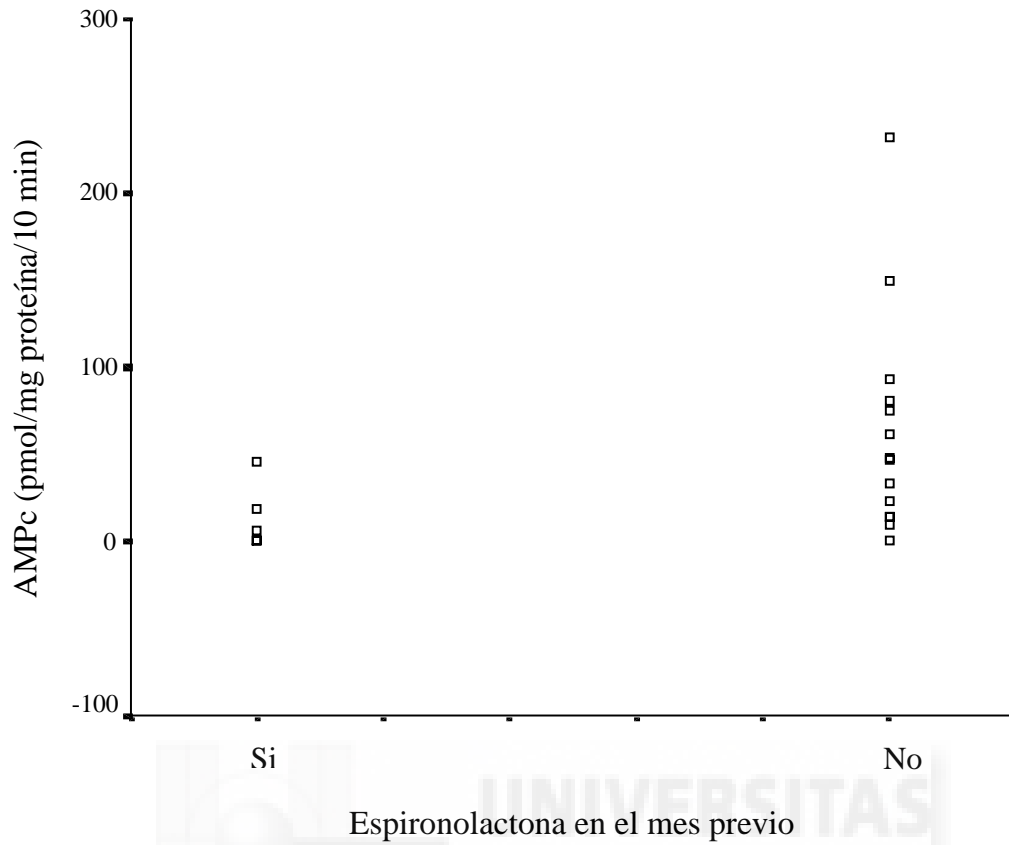
Variable	Coefficiente correlación Pearson	P
Edad	-0.112	0.648
Peso	-0.313	0.323
Presión enclavada	0.395	0.162
Presión libre	-0.173	0.554
GPVH	0.377	0.184
Presión arterial sistólica	-0.178	0.543
Presión arterial diastólica	-0.039	0.896
Presión arterial media	-0.136	0.643
Frecuencia cardiaca	0.246	0.396
Puntuación Child	0.015	0.950
Leucocitos	0.176	0.471
Hemoglobina	0.241	0.320
Hematocrito	0.244	0.314
Plaquetas	-0.002	0.994
GOT	-0.033	0.894
GPT	0.111	0.652
GGT	0.190	0.435
Fosfatasa alcalina	-0.059	0.815
Creatinina	0.106	0.665
Glucosa	-0.102	0.676
Albúmina	-0.249	0.371
Bilirrubina	0.380	0.108
Índice de Quick	0.036	0.883

**Tabla 80.** Análisis del grado de correlación existente entre la producción de AMPc en membranas de hematíes tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M y las variables clínicas en los pacientes cirróticos con HTP tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral.

Variable		AMPc ( $\bar{X} \pm Ds$ ) (n)	P
Sexo	Masculino	48.5 $\pm$ 61.8 (13)	0.831
	Femenino	53.7 $\pm$ 56.8 (6)	
Etiología de la cirrosis	Alcohol	53.9 $\pm$ 77.2 (8)	0.382
	Virus	60.5 $\pm$ 46.2 (8)	
	Otras	12.6 $\pm$ 11.1 (3)	
	Alcohol + virus	- (0)	
Consumo activo de alcohol	Si	132.5 $\pm$ 141.0 (2)	0.292
	No	40.5 $\pm$ 41.1 (17)	
$\beta$ -bloqueantes en el mes previo	Si	39.9 $\pm$ 50.9 (8)	0.442
	No	57.6 $\pm$ 65.2 (11)	
Nitritos en el mes previo	Si	18.4 (1)	0.842
	No	51.9 $\pm$ 59.9 (18)	
Furosemida en el mes previo	Si	0.8 (1)	0.211
	No	52.9 $\pm$ 59.2 (18)	
Espironolactona en el mes previo	Si	14.5 $\pm$ 19.1 (5)	<b>0.044*</b>
	No	62.9 $\pm$ 63.2 (14)	
Lactulosa en el mes previo	Si	9.6 $\pm$ 12.5 (2)	0.234
	No	54.9 $\pm$ 60.3 (17)	
Respuesta estudio hemodinámico	Si	31.4 $\pm$ 27.3 (6)	0.755
	No	56.7 $\pm$ 75.4 (8)	
Somatostatina	Simple	27.3 $\pm$ 23.8 (4)	1.000
	Doble	32.3 $\pm$ 19.6 (2)	
Transfusión	Si	27.6 $\pm$ 28.6 (7)	0.196
	No	63.3 $\pm$ 68.4 (12)	

**Tabla 81.** Producción de AMPc (  $\bar{X} \pm Ds$ ) en membranas de hematíes tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M en función de las variables clínicas cualitativas de los pacientes cirróticos tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral.\* P < 0.05.

Sólo se ha encontrado una correlación significativa entre el AMPc en membranas de hematíes y la toma o no de espironolactona en el mes previo al EH inicial. La representación gráfica de la misma se muestra en la figura 97:



**Figura 97.** Comparación entre la producción de AMPc en membranas de hematíes tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral y la toma o no de espironolactona en el mes previo al EH inicial.

En este caso, los pacientes que estaban tomando espironolactona en el mes previo poseen unos niveles de AMPc más bajos que los que no lo estaban tomando.

**4.1.2. Análisis de las posibles correlaciones entre la capacidad de respuesta al isoproterenol  $10^{-4}$  M (estímulo relativo del isoproterenol) y las variables clínicas y/o demográficas en los pacientes cirróticos con HTP tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral:**

Hemos analizado la existencia de posibles correlaciones entre diversas características de los pacientes y el incremento en la producción de AMPc sobre la actividad basal de la AC después de estimular con isoproterenol  $10^{-4}$  M. Para ello, hemos calculado el número de veces que se incrementa la producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol en relación al valor de AMPc previo, es decir, antes del estímulo beta (estímulo relativo del isoproterenol  $10^{-4}$  M). En las tablas 82 y 83 se muestran los resultados.

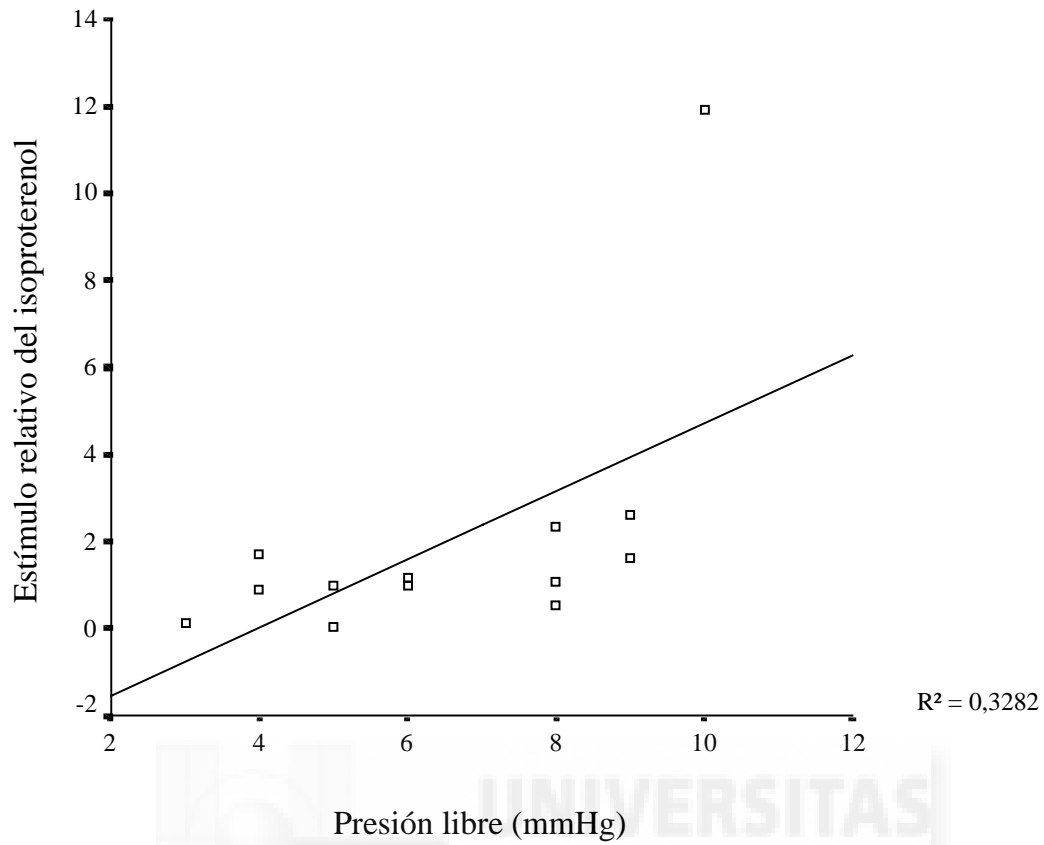
Variable	Coefficiente correlación Pearson	P
Bolsas de sangre	-0.155	0.769
Edad	0.053	0.836
Peso	-0.165	0.609
Presión enclavada	-0.011	0.971
Presión libre	<b>0.573*</b>	<b>0.041*</b>
GPVH	-0.269	0.374
Presión arterial sistólica	0.347	0.245
Presión arterial diastólica	0.529	0.063
Presión arterial media	0.529	0.063
Frecuencia cardiaca	0.042	0.892

**Tabla 82.** Análisis del grado de correlación existente entre el estímulo relativo del isoproterenol en membranas de hematíes y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes cirróticos con HTP después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral. \*  $P < 0.05$ .

Variable		Estímulo relativo del isoproterenol ( $\bar{X} \pm Ds$ ) (n)	P
Somatostatina	Simple	1.0 $\pm$ 1.0 (4)	0.800
	Doble	1.0 $\pm$ 0.1 (2)	
Sexo	Masculino	2.0 $\pm$ 3.2 (12)	0.180
	Femenino	1.9 $\pm$ 1.0 (6)	
Etiología de la cirrosis	Alcohol	2.3 $\pm$ 3.9 (8)	0.694
	Virus	1.5 $\pm$ 1.0 (7)	
	Otras	2.0 $\pm$ 0.9 (3)	
	Alcohol + virus	- (0)	
Consumo activo de alcohol	Si	1.4 $\pm$ 0.4 (2)	0.732
	No	2.0 $\pm$ 2.8 (16)	
$\beta$ -bloqueantes en el mes previo	Si	1.3 $\pm$ 0.8 (8)	0.762
	No	2.5 $\pm$ 3.5 (10)	
Nitritos en el mes previo	Si	1 (1)	0.778
	No	2.0 $\pm$ 2.7 (17)	
Furosemida en el mes previo	Si	0.04 (1)	0.111
	No	2.1 $\pm$ 2.7 (17)	
Espironolactona en el mes previo	Si	1.3 $\pm$ 1.3 (5)	0.387
	No	2.2 $\pm$ 3.0 (13)	
Lactulosa en el mes previo	Si	0.5 $\pm$ 0.7 (2)	0.157
	No	2.1 $\pm$ 2.7 (16)	
Respuesta estudio hemodinámico	Si	3.0 $\pm$ 4.5 (6)	0.628
	No	1.2 $\pm$ 0.7 (7)	

**Tabla 83.** Estímulo relativo del isoproterenol ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas en los pacientes cirróticos con HTP después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral. \* P < 0.05.

Cuando se evaluaron todas las variables, sólo se encontraron diferencias significativas entre el estímulo relativo del isoproterenol y la presión libre en los pacientes cirróticos con HTP después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral. En la siguiente figura se recoge dicha correlación.



**Figura 98.** Correlación entre el estímulo relativo del isoproterenol en membranas de hematíes de pacientes cirróticos con HTP y la presión libre después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral.

Como se puede observar en la figura, el estímulo relativo del isoproterenol es independiente de los valores de presión libre.



**4.1.3. Análisis de las posibles correlaciones entre la capacidad de bloqueo del propranolol  $10^{-5}$  M (bloqueo relativo del propranolol) y las variables clínicas y/o demográficas en los pacientes cirróticos con HTP tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral:**

Hemos evaluado el descenso en la producción de AMPc por parte de la AC en membranas de hematíes después de estimular con isoproterenol  $10^{-4}$  M y bloquear con propranolol  $10^{-5}$  M. Para ello, hemos calculado el número de veces que disminuye la producción de AMPc tras el bloqueo con propranolol  $10^{-5}$  M en relación al estímulo con el isoproterenol  $10^{-4}$  M (bloqueo relativo del propranolol) en membranas de hematíes de pacientes cirróticos con HTP. En la tabla 84 y 85 se muestran los resultados de estos análisis.

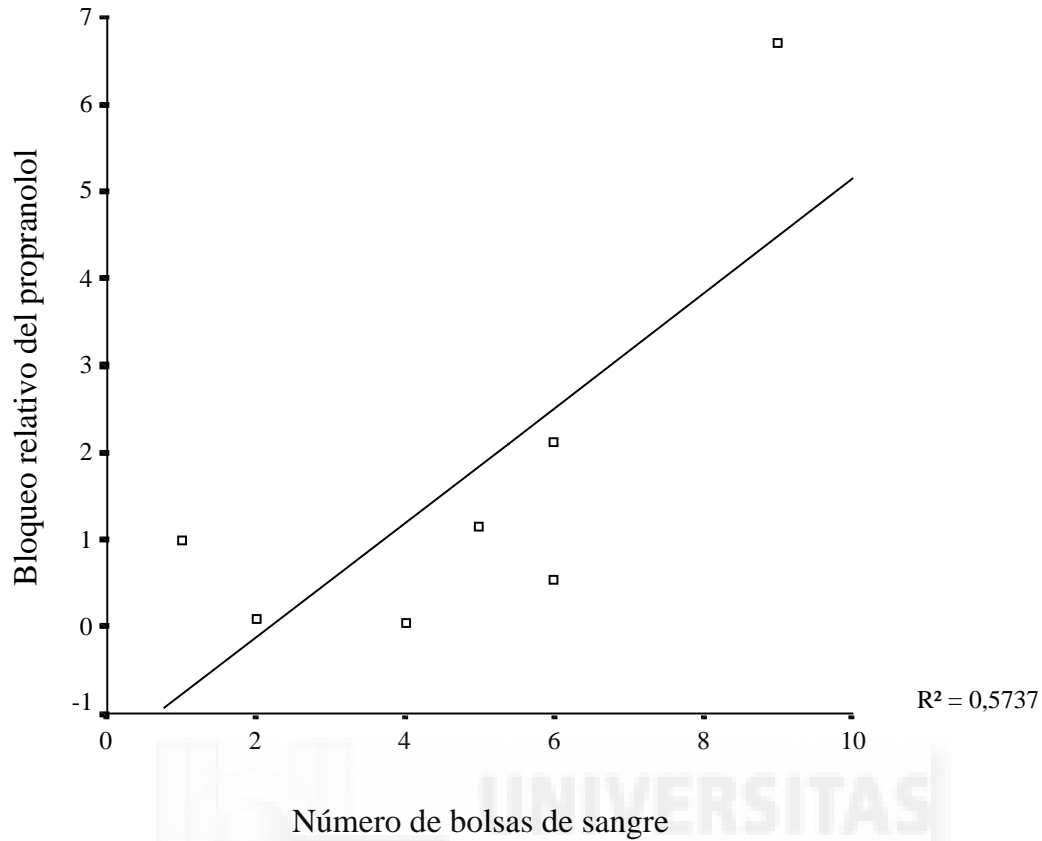
Variable	Coefficiente correlación Pearson	P
Bolsas de sangre	<b>0.757*</b>	<b>0.049*</b>
Edad	0.071	0.778
Peso	0.526	0.097
Presión enclavada	-0.042	0.892
Presión libre	-0.350	0.241
GPVH	0.151	0.623
Presión arterial sistólica	-0.199	0.515
Presión arterial diastólica	-0.146	0.633
Presión arterial media	-0.208	0.496
Frecuencia cardiaca	-0.068	0.824

**Tabla 84.** Análisis del grado de correlación existente entre el bloqueo relativo del propranolol y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes cirróticos con HTP después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral. \*  $P < 0.05$ .

Variable		Bloqueo relativo del propranolol ( $\bar{X} \pm Ds$ ) (n)	P
Somatostatina	Simple	0.8 ± 0.7 (3)	0.800
	Doble	1.3 ± 1.1 (2)	
Sexo	Masculino	1.3 ± 1.8 (12)	0.682
	Femenino	0.7 ± 0.6 (6)	
Etiología de la cirrosis	Alcohol	1.6 ± 2.1 (8)	0.779
	Virus	0.8 ± 0.6 (7)	
	Otras	0.4 ± 0.5 (3)	
	Alcohol + virus	- (0)	-
Consumo activo de alcohol	Si	0.8 ± 0.4 (2)	0.837
	No	1.1 ± 1.6 (16)	
β-bloqueantes en el mes previo	Si	1.7 ± 2.1 (8)	0.203
	No	0.6 ± 0.5 (10)	
Nitritos en el mes previo	Si	2.1 (1)	0.222
	No	1.0 ± 1.5 (17)	
Furosemida en el mes previo	Si	6.7 (1)	0.111
	No	0.8 ± 0.6 (17)	
Espironolactona en el mes previo	Si	2.1 ± 2.7 (5)	0.246
	No	0.7 ± 0.5 (13)	
Lactulosa en el mes previo	Si	4.4 ± 3.3 (2)	<b>0.013*</b>
	No	0.7 ± 0.5 (16)	
Respuesta estudio hemodinámico	Si	0.7 ± 0.6 (6)	0.836
	No	1.6 ± 2.4 (7)	

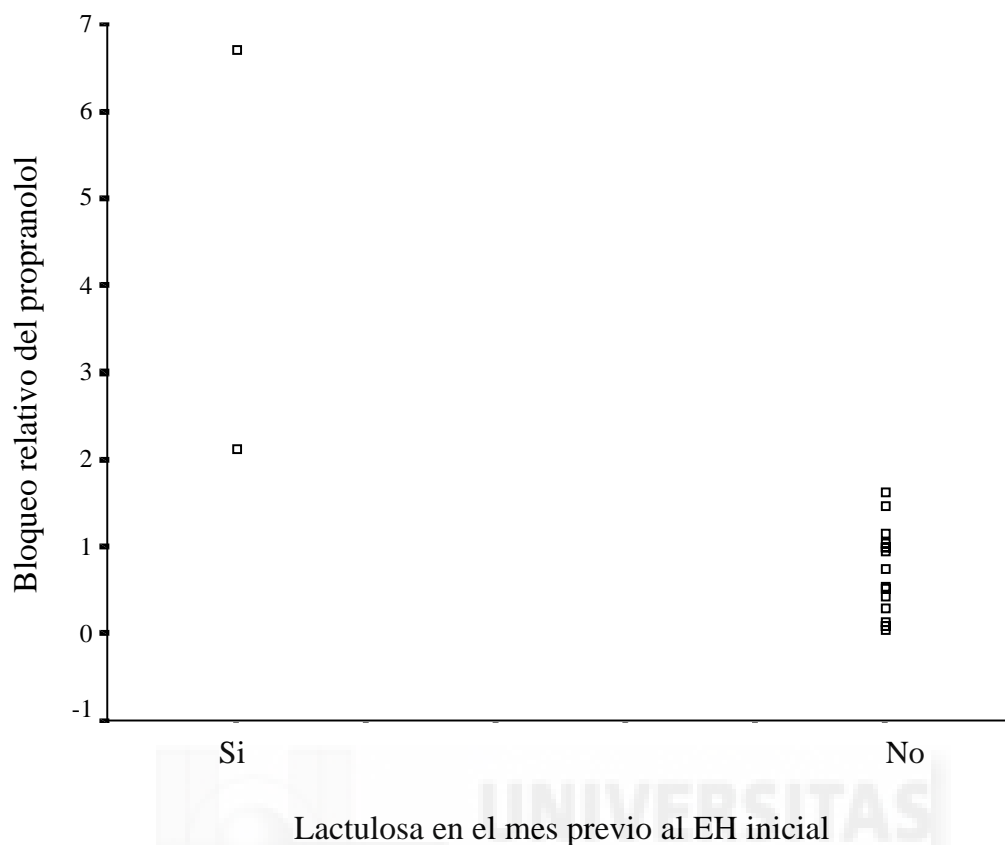
**Tabla 85.** Bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas en los pacientes cirróticos con HTP tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral.  
\*P < 0.05.

Una vez evaluadas todas las variables, sólo se encontraron correlaciones significativas en los pacientes cirróticos tras 3 meses de tratamiento con propranolol entre el bloqueo relativo del propranolol y el número de bolsas de sangre que se les transfunden a los pacientes durante el episodio de sangrado y la toma o no de lactulosa en el mes previo al EH inicial. En las figuras 99 y 100 se representan dichas correlaciones:



**Figura 99.** Correlación entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes de pacientes cirróticos con HTP tras 3 meses de tratamiento con propranolol y el número de bolsas de sangre que se transfundieron a los pacientes durante el episodio de sangrado.

Como se puede observar en la representación, el bloqueo relativo del propranolol es independiente del número de bolsas de sangre que se transfundieron a los pacientes durante el episodio de sangrado.



**Figura 100.** Comparación entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes de pacientes cirróticos con HTP tras 3 meses de tratamiento con propranolol y la toma o no de lactulosa antes del EH inicial.

Como se aprecia en la representación, aunque el bloqueo relativo del propranolol es dependiente de la toma de lactulosa, los datos son de baja relevancia dado el escaso tamaño muestral en el grupo con lactulosa.

#### 4.1.4. Análisis de los posibles cambios en las variables hemodinámicas tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral en los pacientes cirróticos con HTP:

Se han evaluado las posibles correlaciones entre los cambios inducidos por la administración prolongada por vía oral de propranolol (3 meses) en las variables hemodinámicas (GPVH, FC, PAS, PAD, PAM, PE y PL), entendidos como la diferencia en los valores de dichas variables entre el EH crónico y después de un bolus iv de propranolol, y los incrementos en los valores de AMPc tras someter a las muestras sanguíneas a un estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M en presencia y ausencia de propranolol  $10^{-5}$  M.

En el caso de los pacientes cirróticos con HTP, ninguna de las correlaciones evaluadas ha resultado significativa.

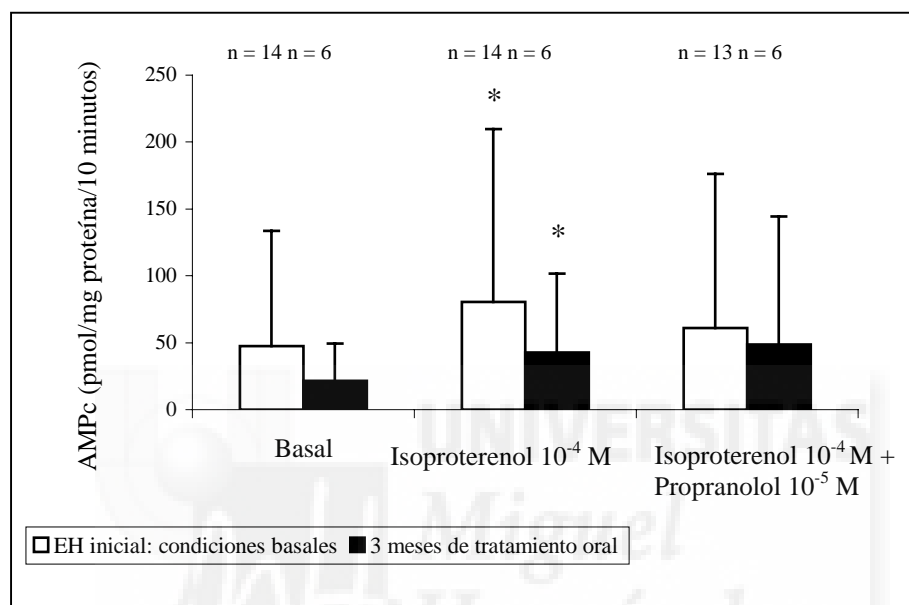
En la tabla 86 se recogen las correlaciones encontradas entre los valores de AMPc y las variables clínicas en los pacientes cirróticos con HTP incluidos en el estudio tras la administración del bolus iv de propranolol.

	Tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral	
	Pacientes cirróticos	Relevancia de la correlación
AMPc sin estímulo	-	-
AMPc tras isoproterenol $10^{-4}$ M	Espironolactona en el mes previo	Relevante
Incremento en la producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M (Estímulo relativo del isoproterenol)	PL	Irrelevante
Descenso en la producción de AMPc inducido por propranolol $10^{-5}$ M en presencia de isoproterenol $10^{-4}$ M (Bloqueo relativo del isoproterenol)	Bolsas de sangre transfundidas Lactulosa en el mes previo al EH inicial	Irrelevante Irrelevante
Cambios en las variables hemodinámicas	-	-

**Tabla 86 .** Cuadro resumen de las correlaciones entre la actividad de la AC en membranas de hematíes y las variables clínicas en los pacientes cirróticos con HTP incluidos en el estudio tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral.

#### 4.2. PACIENTES DE PROFILAXIS PRIMARIA:

A diferencia de lo observado en el estudio inicial de este subgrupo (figura 31), a los 3 meses de tratamiento con propranolol (columnas en negro) se observó que la actividad basal de la AC en membranas de hematíes fue de  $21.4 \pm 28.1$  pmol AMPc/mg proteína/10 min, con un incremento significativo hasta  $42.6 \pm 59.1$  pmol AMPc/mg proteína/10 min tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M y a  $48.7 \pm 95.6$  pmol AMPc/mg proteína/10 min cuando el propranolol  $10^{-5}$  M está presente. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los 2 estudios. Los resultados se recogen en la figura 101:



**Figura 101.** Actividad de la AC en membranas de hematíes de los pacientes de profilaxis primaria tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral.\*  $P < 0.05$  comparado con la basal.

Para los pacientes de profilaxis primaria se calcularon los valores del estímulo absoluto y relativo del isoproterenol  $10^{-4}$  M y el bloqueo relativo y absoluto del propranolol  $10^{-5}$  M. Los resultados se recogen en la tabla 87 y también se indican los resultados obtenidos antes de la administración iv de propranolol con el fin de facilitar la comparación:

	EH inicial	Tras 3 meses de tratamiento con propranolol
	Profilaxis primaria	Profilaxis primaria
Estímulo relativo del isoproterenol $10^{-4}$ M	$0.81 \pm 1.36$ (14)	$2.57 \pm 4.19$ (6)
Bloqueo relativo del propranolol $10^{-5}$ M	$1.17 \pm 3.39$ (13)	$-0.26 \pm 0.58$ (6)
Estímulo absoluto del isoproterenol $10^{-4}$ M	$33.07 \pm 53.05$ (14)	$21.12 \pm 32.10$ (6)
Bloqueo absoluto del propranolol $10^{-5}$ M	$-13.57 \pm 32.25$ (13)	$6.09 \pm 45.79$ (6)

**Tabla 87.**  $\bar{X} \pm Ds$  (n) del estímulo relativo y absoluto para el isoproterenol y el bloqueo relativo y absoluto para propranolol en membranas de hematíes de pacientes de profilaxis primaria antes de la administración iv de propranolol y después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral. Tanto el estímulo relativo del isoproterenol como el bloqueo relativo del propranolol se expresan en tanto por 1 mientras que el estímulo absoluto del isoproterenol y el bloqueo absoluto del propranolol se expresan en pmol AMPc/mg proteína/10 min.

No se han encontrado diferencias significativas en los valores de las variables anteriores entre el EH inicial y después de 3 meses de tratamiento continuado con propranolol en las membranas de hematíes de los pacientes de profilaxis primaria.

#### 4.2.1. Análisis de las posibles correlaciones entre la actividad de la AC y las características de los pacientes de profilaxis primaria después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral:

##### 4.2.1.1. Actividad basal:

Se ha evaluado la existencia de posibles correlaciones entre las diferentes variables clínicas y los valores de AMPc basales en membranas de hematíes medidos tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral en los pacientes de profilaxis primaria. Los resultados se recogen en las siguientes tablas:

Variable	Coeficiente correlación Pearson	P
Edad	-0.245	0.639
Peso	0.537	0.639
Presión enclavada	-0.996	0.054
Presión libre	0.033	0.979
GPVH	-0.632	0.564
Presión arterial sistólica	-0.768	0.443
Presión arterial diastólica	-0.058	0.963
Presión arterial media	-0.890	0.302
Frecuencia cardiaca	0.869	0.330

**Tabla 88.** Análisis del grado de correlación existente entre la producción basal de AMPc en membranas de hematíes y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes de profilaxis primaria tras 3 meses de tratamiento con propranolol por vía oral.

Variable		AMPc ( $\bar{X} \pm Ds$ ) (n)	P
Sexo	Masculino	16.1 $\pm$ 26.4 (3)	0.400
	Femenino	26.8 $\pm$ 34.5 (3)	
Etiología de la cirrosis	Alcohol	23.6 $\pm$ 32.4 (2)	0.800
	Virus	26.8 $\pm$ 34.5 (3)	
Consumo activo de alcohol	Si	- (0)	-
	No	21.4 $\pm$ 28.1 (6)	
$\beta$ -bloqueantes en el mes previo	Si	31.5 $\pm$ 30.1 (4)	0.267
	No	1.3 $\pm$ 0.7 (2)	
Nitritos en el mes previo	Si	- (0)	-
	No	21.4 $\pm$ 28.1 (6)	
Furosemida en el mes previo	Si	- (0)	-
	No	21.4 $\pm$ 28.1 (6)	
Espironolactona en el mes previo	Si	1.4 $\pm$ 0.6 (2)	0.533
	No	31.5 $\pm$ 30.2 (4)	
Lactulosa en el mes previo	Si	- (0)	-
	No	21.4 $\pm$ 28.1 (6)	
Respuesta estudio hemodinámico	Si	23.6 $\pm$ 32.4 (2)	1.000
	No	12.4 (1)	

**Tabla 89.** Producción basal de AMPc (  $\bar{X} \pm Ds$ ) en membranas de hematíes en función de las variables clínicas cualitativas en los pacientes de profilaxis primaria tras 3 meses de tratamiento con propranolol por vía oral.

Una vez evaluadas todas las variables, no se ha encontrado ninguna correlación significativa con los valores de AMPc basal tras 3 meses de tratamiento con propranolol vía oral.



#### 4.2.1.2. Tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M:

También se ha evaluado la existencia de correlaciones entre las diferentes variables clínicas y los valores de AMPc en membranas de hematíes tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M después de 3 meses de tratamiento con propranolol por vía oral. Los resultados obtenidos se recogen en las tablas 90 y 91:

Variable	Coefficiente correlación Pearson	P
Edad	-0.250	0.632
Peso	-0.821	0.386
Presión enclavada	-0.966	0.166
Presión libre	0.207	0.867
GPVH	-0.758	0.452
Presión arterial sistólica	-0.868	0.331
Presión arterial diastólica	0.118	0.925
Presión arterial media	-0.956	0.190
Frecuencia cardiaca	0.769	0.442

**Tabla 90.** Análisis del grado de correlación existente entre la producción de AMPc en membranas de hematíes tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes de profilaxis primaria después de 3 meses de tratamiento con propranolol por vía oral.

Variable		AMPc basal ( $\bar{X} \pm Ds$ ) (n)	P
Sexo	Masculino	28.6 $\pm$ 41.0 (3)	0.700
	Femenino	56.6 $\pm$ 80.3 (3)	
Etiología de la cirrosis	Alcohol	42.3 $\pm$ 47.1 (2)	1.000
	Virus	56.6 $\pm$ 80.3 (3)	
Consumo activo de alcohol	Si	- (0)	-
	No	42.6 $\pm$ 59.1 (6)	
$\beta$ -bloqueantes en el mes previo	Si	60.0 $\pm$ 67.8 (4)	0.533
	No	7.6 $\pm$ 2.1 (2)	
Nitritos en el mes previo	Si	- (0)	-
	No	42.6 $\pm$ 59.1 (6)	
Furosemida en el mes previo	Si	- (0)	-
	No	42.6 $\pm$ 59.1 (6)	
Espironolactona en el mes previo	Si	3.5 $\pm$ 3.6 (2)	0.133
	No	62.1 $\pm$ 65.5 (4)	
Lactulosa en el mes previo	Si	- (0)	-
	No	42.6 $\pm$ 59.1 (6)	
Respuesta estudio hemodinámico	Si	42.3 $\pm$ 47.1 (2)	1.000
	No	14.4 (1)	

**Tabla 91.** Producción de AMPc en membranas de hematíes tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas en los pacientes de profilaxis primaria después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral.

No se ha encontrado ninguna correlación significativa entre los valores de AMPc tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M en membranas de hematíes y las variables clínicas en los pacientes de profilaxis primaria tras 3 meses de tratamiento con propranolol por vía oral.

#### 4.2.2. Análisis de las posibles correlaciones entre la respuesta al isoproterenol $10^{-4}$ M (estímulo relativo del isoproterenol) y las variables clínicas y/o demográficas en los pacientes de profilaxis primaria después de un tratamiento con propranolol oral durante 3 meses:

Hemos evaluado el incremento en la producción de AMPc en membranas de hematíes por parte de la AC después del estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M. Para ello, hemos calculado el número de veces que se incrementa la producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol en relación al valor de AMPc previo, es decir, antes del estímulo beta (estímulo relativo del isoproterenol). En la tabla 92 y 93 se muestran los resultados.

Variable	Coefficiente correlación Pearson	P
Edad	0.158	0.765
Peso	-0.485	0.678
Presión enclavada	0.730	0.479
Presión libre	0.721	0.488
GPVH	-0.153	0.902
Presión arterial sistólica	0.037	0.976
Presión arterial diastólica	0.781	0.430
Presión arterial media	0.256	0.835
Frecuencia cardíaca	-0.949	0.203

**Tabla 92.** Análisis del grado de correlación existente entre el estímulo relativo del isoproterenol en membranas de hematíes y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes de profilaxis primaria después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral.

Variable		Estímulo relativo del isoproterenol ( $\bar{X} \pm Ds$ ) (n)	P
Sexo	Masculino	4.8 ± 6.1 (3)	1.000
	Femenino	2.3 ± 1.2 (3)	
Etiología de la cirrosis	Alcohol	6.8 ± 7.3 (2)	0.800
	Virus	2.3 ± 1.2 (3)	
	Otras	1.0 (1)	
	Alcohol + virus	- (0)	
Consumo activo de alcohol	Si	- (0)	-
	No	3.6 ± 4.2 (6)	
β-bloqueantes en el mes previo	Si	1.5 ± 0.6 (4)	0.133
	No	7.7 ± 6.0 (2)	
Nitritos en el mes previo al estudio	Si	- (0)	-
	No	3.6 ± 4.2 (6)	
Furosemida en el mes previo	Si	- (0)	-
	No	3.6 ± 4.2 (6)	
Espironolactona en el mes previo	Si	2.2 ± 1.8 (2)	0.800
	No	4.2 ± 5.1 (4)	
Lactulosa en el mes previo	Si	- (0)	-
	No	3.6 ± 4.2 (6)	
Respuesta estudio hemodinámico	Si	6.8 ± 7.3 (2)	0.667
	No	1.2 (1)	

**Tabla 93.** Estímulo relativo del isoproterenol en membranas de hematíes ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas en los pacientes de profilaxis primaria después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral.

No se ha encontrado ninguna correlación significativa entre el incremento en la producción de AMPc tras isoproterenol  $10^{-4}$  M en membranas de hematíes y las variables clínicas evaluadas.

#### 4.2.3. Análisis de las posibles correlaciones entre la capacidad de bloqueo del propranolol $10^{-5}$ M (bloqueo relativo del propranolol) y las variables clínicas y/o demográficas en los pacientes de profilaxis primaria después de un tratamiento con propranolol oral de 3 meses:

Hemos evaluado el descenso en la producción de AMPc en membranas de hematíes por parte de la AC después del estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M y el bloqueo con propranolol  $10^{-5}$  M. Para ello, hemos calculado el número de veces que disminuye el valor de AMPc tras el bloqueo con propranolol  $10^{-5}$  M en relación al AMPc tras el estímulo con el isoproterenol  $10^{-4}$  M (bloqueo relativo del propranolol). En las tablas 94 y 95 se muestran los resultados de este análisis.

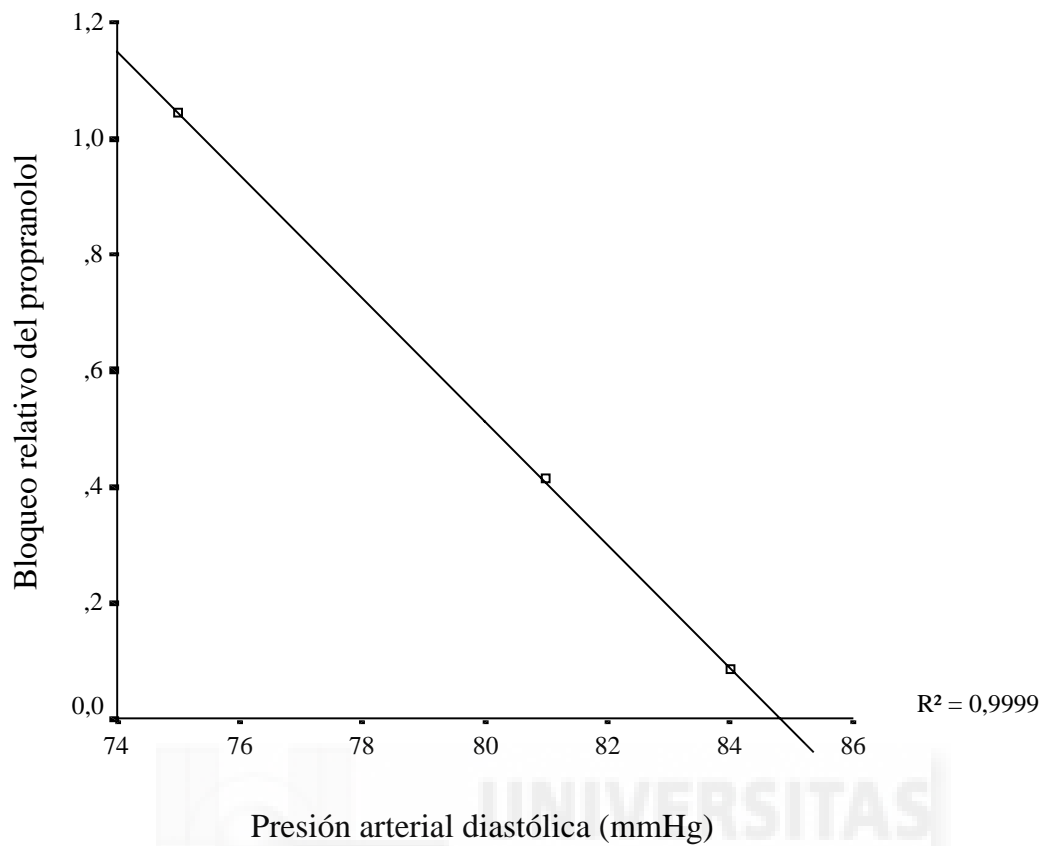
Variable	Coefficiente correlación Pearson	P
Edad	-0.212	0.687
Peso	0.901	0.286
Presión enclavada	-0.154	0.902
Presión libre	-0.995	0.065
GPVH	0.729	0.480
Presión arterial sistólica	0.587	0.601
Presión arterial diastólica	<b>1.000*</b>	<b>0.007*</b>
Presión arterial media	0.394	0.742
Frecuencia cardiaca	0.554	0.626

**Tabla 94.** Análisis del grado de correlación existente entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes de profilaxis primaria después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral. \*  $P < 0.05$ .

Variable		Bloqueo relativo del propranolol ( $\bar{X} \pm Ds$ ) (n)	P
Sexo	Masculino	0.5 $\pm$ 0.5 (3)	0.400
	Femenino	1.0 $\pm$ 0.7 (3)	
Etiología de la cirrosis	Alcohol	0.2 $\pm$ 0.2 (2)	0.400
	Virus	1.0 $\pm$ 0.7 (3)	
	Otras	1.0 (1)	
	Alcohol + virus	- (0)	
Consumo activo de alcohol	Si	- (0)	-
	No	0.7 $\pm$ 0.6 (6)	
$\beta$ -bloqueantes en el mes previo	Si	1.0 $\pm$ 0.5 (4)	0.133
	No	0.2 $\pm$ 0.1 (2)	
Nitritos en el mes previo	Si	- (0)	-
	No	0.7 $\pm$ 0.6 (6)	
Furosemina en el mes previo	Si	- (0)	-
	No	0.7 $\pm$ 0.6 (6)	
Espironolactona en el mes previo	Si	0.6 $\pm$ 0.5 (2)	0.800
	No	0.8 $\pm$ 0.7 (4)	
Lactulosa en el mes previo	Si	- (0)	-
	No	0.7 $\pm$ 0.6 (6)	
Respuesta estudio hemodinámico	Si	0.2 $\pm$ 0.2 (2)	0.667
	No	1.0 (1)	

**Tabla 95.** Bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas en los pacientes de profilaxis primaria después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral.

Sólo se ha encontrado una correlación significativa entre el descenso en la producción de AMPc en membranas de hematíes tras isoproterenol  $10^{-4}$  M en presencia de propranolol  $10^{-5}$  M y la presión arterial diastólica. En la figura 102 se muestra una representación de esta correlación:



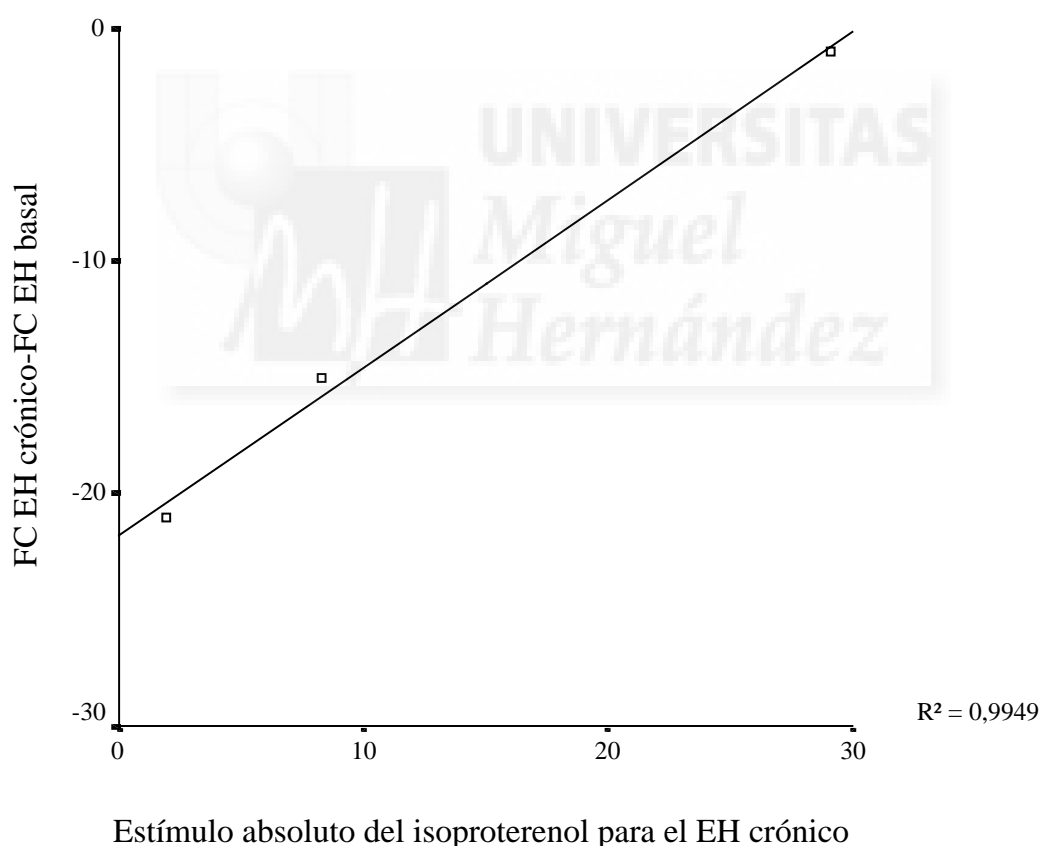
**Figura 102.** Correlación entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y la presión arterial diastólica en los pacientes de profilaxis primaria tras 3 meses de tratamiento con propranolol por vía oral.

En este caso, existe una clara correlación entre la capacidad de bloqueo por parte del propranolol y la presión arterial diastólica, a pesar del escaso tamaño muestral. De manera que, la capacidad de bloqueo por parte del propranolol será mayor cuanto menor sea el valor de presión arterial diastólica.

#### 4.2.4. Análisis de los posibles cambios en las variables hemodinámicas en los pacientes de profilaxis primaria después de 3 meses de tratamiento con propranolol por vía oral:

Se han evaluado las posibles correlaciones entre los cambios inducidos por la administración prolongada por vía oral de propranolol (3 meses) en las variables hemodinámicas (GPVH, FC, PAS, PAD, PAM, PE y PL), entendidos como la diferencia en los valores de dichas variables entre el EH crónico y el EH inicial, y los incrementos en los valores de AMPc tras someter a las muestras sanguíneas a un estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M en presencia y ausencia de propranolol  $10^{-5}$  M.

La única correlación encontrada en los pacientes de profilaxis primaria fue entre la diferencia en las frecuencias cardíacas y el incremento en la producción de AMPc inducido por isoproterenol  $10^{-4}$  M tras 3 meses de tratamiento con propranolol por vía oral (Coeficiente de correlación de Pearson: 0.997; P = 0.046). Debido al escaso tamaño muestral, esta correlación debe tomarse con precaución. En la figura 103 se representa dicha correlación.



**Figura 103.** Correlación entre las frecuencias cardíacas tras 3 meses de tratamiento con propranolol por vía oral y el EH inicial, y el incremento en la producción de AMPc inducido por isoproterenol  $10^{-4}$  M (estímulo absoluto del isoproterenol) en membranas de hemáties tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral en los pacientes de profilaxis primaria.

En la tabla 96 se resumen las correlaciones encontradas entre los valores de AMPc y las variables clínicas en los pacientes de profilaxis primaria tras 3 meses de tratamiento con propranolol por vía oral.

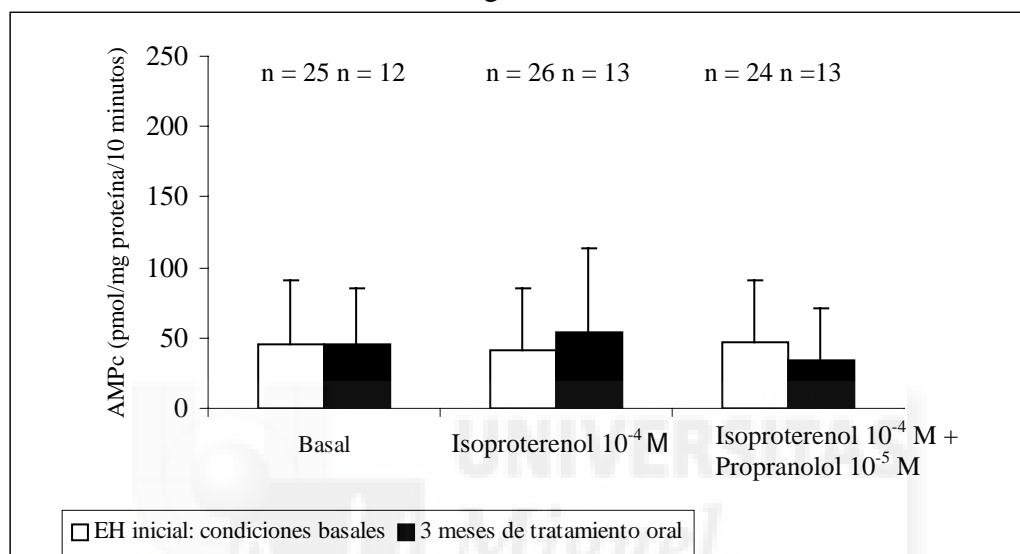
	<b>Tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral</b>	
	<b>Profilaxis Primaria</b>	<b>Relevancia de la correlación</b>
AMPc sin estímulo	-	-
AMPc tras isoproterenol $10^{-4}$ M	-	-
Incremento en la producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M	-	-
Descenso en la producción de AMPc inducido por propranolol $10^{-5}$ M en presencia de isoproterenol $10^{-4}$ M	PAD	Relevante
Cambios en las variables hemodinámicas	Cambios en la FC y el incremento en la producción de AMPc inducido por isoproterenol $10^{-4}$ M tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral	Relevante

**Tabla 96.** Cuadro resumen de las correlaciones entre la actividad de la AC en membranas de hematíes y las variables clínicas en los pacientes de profilaxis primaria tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral.



### 4.3. PACIENTES DE PROFILAXIS SECUNDARIA:

En los pacientes de profilaxis secundaria, tras 3 meses de tratamiento con propranolol (columnas en negro), se observó una actividad basal de la AC en membranas de hematíes de  $45.5 \pm 39.7$  pmol AMPc/mg proteína/10 min que se incrementó a  $53.7 \pm 60.6$  pmol AMPc/mg proteína/10 min tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M y disminuyó a  $33.6 \pm 36.9$  pmol AMPc/mg proteína/10 min cuando el propranolol  $10^{-5}$  M está presente. No se han encontrado diferencias significativas entre los valores de AMPc de los pacientes de profilaxis secundaria medidos en el estudio inicial antes de la administración del bolus iv de propranolol y tras 3 meses de tratamiento con propranolol vía oral. Los resultados se muestran en la figura 104:



**Figura 104.** Actividad de la AC en membranas de hematíes en los pacientes de profilaxis secundaria tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral.

Para los pacientes de profilaxis secundaria los valores del estímulo absoluto y relativo del isoproterenol  $10^{-4}$  M y el bloqueo relativo y absoluto del propranolol  $10^{-5}$  M se recogen en la tabla 97. También se indican los valores obtenidos en estos pacientes antes de la administración iv de propranolol.

	EH inicial	Tras 3 meses de tratamiento con propranolol
	Profilaxis secundaria	Profilaxis secundaria
Estímulo relativo del isoproterenol $10^{-4}$ M	$-0.17 \pm 0.42$ (25)	$0.09 \pm 0.81$ (12)
Bloqueo relativo del propranolol $10^{-5}$ M	$1.43 \pm 4.51$ (24)	$0.36 \pm 1.89$ (12)
Estímulo absoluto del isoproterenol $10^{-4}$ M	$-5.04 \pm 14.35$ (25)	$-2.22 \pm 17.67$ (12)
Bloqueo absoluto del propranolol $10^{-5}$ M	$1.87 \pm 21.43$ (24)	$-9.38 \pm 26.32$ (12)

**Tabla 97.**  $\bar{X} \pm Ds$  (n) del estímulo relativo y absoluto para el isoproterenol y el bloqueo relativo y absoluto para propranolol en membranas de hematíes de pacientes de profilaxis secundaria durante el EH inicial y después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral. Tanto el estímulo relativo del isoproterenol como el bloqueo relativo del propranolol se expresan en tanto por 1 mientras que el estímulo absoluto del isoproterenol y el bloqueo absoluto del propranolol se expresan en pmol AMPc/mg proteína/10 min.

No se han encontrado diferencias significativas en los pacientes de profilaxis secundaria entre el EH inicial y tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral para las variables anteriormente indicadas.

También se compararon los valores de las variables anteriores entre los pacientes de profilaxis primaria y secundaria después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral. Los resultados se muestran en la tabla 98.

	Tras 3 meses de tratamiento con propranolol	
	Pacientes de profilaxis primaria	Pacientes de profilaxis secundaria
Estímulo relativo del isoproterenol $10^{-4}$ M	$2.57 \pm 4.19$ (6)	$0.09 \pm 0.81$ (12)*
Bloqueo relativo del propranolol $10^{-5}$ M	$-0.26 \pm 0.58$ (6)	$0.36 \pm 1.89$ (12)
Estímulo absoluto del isoproterenol $10^{-4}$ M	$21.12 \pm 32.10$ (6)	$-2.22 \pm 17.67$ (12)
Bloqueo absoluto del propranolol $10^{-5}$ M	$6.09 \pm 45.79$ (6)	$-9.38 \pm 26.32$ (12)

**Tabla 98.**  $\bar{X} \pm Ds$  (n) del estímulo relativo y absoluto para el isoproterenol y el bloqueo relativo y absoluto para propranolol en membranas de hematíes de pacientes de profilaxis primaria y secundaria tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral. \*  $P < 0.05$  comparado con los pacientes de profilaxis primaria.

Entre los pacientes de profilaxis primaria y secundaria sólo se han observado diferencias significativas en el estímulo relativo del isoproterenol  $10^{-4}$  M siendo significativamente inferior en el caso de los pacientes de profilaxis secundaria. Para el resto de variables, no se han encontrado diferencias entre los 2 subgrupos de pacientes tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral.

### 4.3.1. Análisis de las posibles correlaciones entre la actividad de la AC y las características de los pacientes de profilaxis secundaria después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral:

#### 4.3.1.1. Actividad basal:

Se ha evaluado la existencia de posibles correlaciones entre las diferentes variables clínicas y los valores de AMPc basales medidos después de 3 meses de tratamiento con propranolol vía oral en los pacientes de profilaxis secundaria. Los resultados se recogen en las tablas 99 y 100:

Variable	Coefficiente correlación Pearson	P
Bolsas sangre transfundidas	0.453	0.367
Edad	-0.006	0.985
Peso	-0.164	0.673
Presión enclavada	0.231	0.520
Presión libre	-0.233	0.517
GPVH	0.288	0.420
Presión arterial sistólica	-0.116	0.751
Presión arterial diastólica	-0.314	0.376
Presión arterial media	-0.351	0.320
Frecuencia cardiaca	0.317	0.372

**Tabla 99.** Análisis del grado de correlación existente entre la producción de AMPc basal en membranas de hematíes y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes de profilaxis secundaria tras 3 meses de tratamiento con propranolol por vía oral.

Variable		AMPc ( $\bar{X} \pm Ds$ ) (n)	P
Somatostatina	Simple	36.3 $\pm$ 39.0 (4)	0.800
	Doble	34.6 $\pm$ 22.9 (2)	
Sexo	Masculino	47.4 $\pm$ 43.9 (9)	1.000
	Femenino	40.0 $\pm$ 30.2 (3)	
Etiología de la cirrosis	Alcohol	47.2 $\pm$ 49.8 (6)	0.352
	Virus	62.2 $\pm$ 17.4 (4)	
Consumo activo de alcohol	Si	83.9 $\pm$ 75.7 (2)	0.364
	No	37.9 $\pm$ 30.0 (10)	
$\beta$ -bloqueantes en el mes previo	Si	23.7 $\pm$ 19.1 (4)	0.283
	No	56.4 $\pm$ 43.8 (8)	
Nitritos en el mes previo	Si	18.4 (1)	0.667
	No	48.0 $\pm$ 40.7 (11)	
Furosemida en el mes previo	Si	20.0 (1)	0.833
	No	47.9 $\pm$ 40.8 (11)	
Espironolactona en el mes previo	Si	29.7 $\pm$ 18.2 (3)	0.727
	No	50.8 $\pm$ 44.3 (9)	
Lactulosa en el mes previo	Si	19.2 $\pm$ 1.1 (2)	0.485
	No	50.8 $\pm$ 41.8 (10)	
Respuesta estudio hemodinámico	Si	32.6 $\pm$ 37.5 (4)	0.610
	No	46.8 $\pm$ 47.8 (6)	

**Tabla 100.** Producción basal de AMPc en membranas de hematíes (  $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas estudiadas en los pacientes de profilaxis secundaria tras 3 meses de tratamiento con propranolol por vía oral.

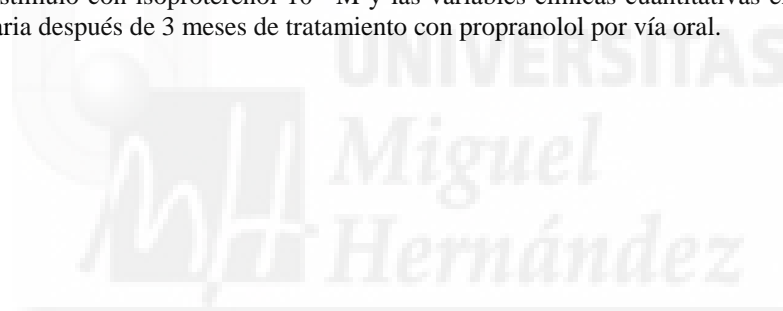
Una vez evaluadas todas las variables no se ha encontrado ninguna correlación con los valores basales de AMPc después de 3 meses de tratamiento con propranolol por vía oral en los pacientes de profilaxis secundaria.

#### 4.3.1.2. Tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M:

Se ha buscado la existencia de posibles correlaciones entre las diferentes variables clínicas y los valores de AMPc en membranas de hematíes tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M después de 3 meses de tratamiento con propranolol por vía oral en los pacientes de profilaxis secundaria. Los resultados obtenidos se recogen en las tablas 101 y 102:

Variable	Coficiente correlación Pearson	P
Bolsas sangre transfundidas	-0.293	0.524
Edad	-0.070	0.821
Peso	-0.327	0.391
Presión enclavada	0.443	0.172
Presión libre	-0.179	0.599
GPVH	0.432	0.184
Presión arterial sistólica	0.032	0.927
Presión arterial diastólica	0.051	0.882
Presión arterial media	0.051	0.882
Frecuencia cardíaca	0.295	0.378

**Tabla 101.** Análisis del grado de correlación existente entre la producción de AMPc en membranas de hematíes tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes de profilaxis secundaria después de 3 meses de tratamiento con propranolol por vía oral.



Variable		AMPc ( $\bar{X} \pm Ds$ ) (n)	P
Somatostatina	Simple	27.3 $\pm$ 23.8 (4)	1.000
	Doble	32.3 $\pm$ 19.6 (2)	
Sexo	Masculino	54.5 $\pm$ 67.4 (10)	0.937
	Femenino	50.9 $\pm$ 39.8 (3)	
Etiología de la cirrosis	Alcohol	57.7 $\pm$ 88.4 (6)	0.247
	Virus	62.9 $\pm$ 22.2 (5)	
Consumo activo de alcohol	Si	132.5 $\pm$ 141.0 (2)	0.410
	No	39.3 $\pm$ 30.9 (11)	
$\beta$ -bloqueantes en el mes previo	Si	19.8 $\pm$ 19.1 (4)	0.076
	No	68.7 $\pm$ 67.5 (9)	
Nitritos en el mes previo	Si	18.4 (1)	0.615
	No	56.6 $\pm$ 62.4 (12)	
Furosemida en el mes previo	Si	0.81 (1)	0.308
	No	58.1 $\pm$ 61.1 (12)	
Espironolactona en el mes previo	Si	21.8 $\pm$ 22.9 (3)	0.217
	No	63.2 $\pm$ 66.0 (10)	
Lactulosa en el mes previo	Si	9.6 $\pm$ 12.5 (2)	0.154
	No	61.7 $\pm$ 62.8 (11)	
Respuesta estudio hemodinámico	Si	26.0 $\pm$ 20.0 (4)	0.648
	No	62.8 $\pm$ 79.3 (7)	

**Tabla 102.** Producción de AMPc en membranas de hematíes tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$ M (  $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas en los pacientes de profilaxis secundaria tras 3 meses de tratamiento con propranolol por vía oral.

Después de evaluar todas las variables, no se ha encontrado ninguna correlación con los valores de AMPc en membranas de hematíes tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M en los pacientes de profilaxis secundaria que llevan 3 meses de tratamiento con propranolol vía oral.

#### 4.3.2. Análisis de las posibles correlaciones entre la respuesta al isoproterenol $10^{-4}$ M (estímulo relativo del isoproterenol) y las variables clínicas en los pacientes de profilaxis secundaria después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral:

Hemos evaluado el incremento en la producción de AMPc por parte de la AC en membranas de hematíes después de estimular con isoproterenol  $10^{-4}$  M. Para ello, hemos calculado el número de veces que se incrementa la producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol en relación al valor de AMPc previo, es decir, antes del estímulo beta. En la tabla 103 y 104 se muestran los resultados.

Variable	Coefficiente correlación Pearson	P
Bolsas de sangre transfundidas	-0.155	0.769
Edad	0.081	0.802
Peso	-0.232	0.548
Presión enclavada	0.367	0.297
Presión libre	0.565	0.089
GPVH	0.055	0.881
Presión arterial sistólica	0.097	0.789
Presión arterial diastólica	-0.040	0.913
Presión arterial media	0.034	0.925
Frecuencia cardiaca	-0.108	0.767

**Tabla 103.** Análisis del grado de correlación existente entre el estímulo relativo del isoproterenol en membranas de hematíes y las variables clínicas cuantitativas en los pacientes de profilaxis secundaria después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral.

Variable		Estímulo relativo del isoproterenol ( $\bar{X} \pm Ds$ ) (n)	P
Somatostatina	Simple	1.0 $\pm$ 1.0 (4)	0.800
	Doble	1.0 $\pm$ 0.1 (2)	
Sexo	Masculino	1.0 $\pm$ 0.8 (9)	0.373
	Femenino	1.6 $\pm$ 0.7 (3)	
Etiología de la cirrosis	Alcohol	0.8 $\pm$ 0.6 (6)	0.914
	Virus	1.0 $\pm$ 0.4 (4)	
	Otras	2.5 $\pm$ 0.2 (2)	
	Alcohol + virus	- (0)	
Consumo activo de alcohol	Si	1.4 $\pm$ 0.4 (2)	0.384
	No	1.1 $\pm$ 0.8 (10)	
$\beta$ -bloqueantes en el mes previo	Si	1.1 $\pm$ 1.0 (4)	0.808
	No	1.2 $\pm$ 0.8 (8)	
Nitritos en el mes previo al estudio	Si	1.0 (1)	1.000
	No	1.2 $\pm$ 0.8 (11)	
Furosemida en el mes previo	Si	0.0 (1)	0.167
	No	1.2 $\pm$ 0.7 (11)	
Espironolactona en el mes previo	Si	0.6 $\pm$ 0.5 (3)	0.282
	No	1.3 $\pm$ 0.8 (9)	
Lactulosa en el mes previo	Si	0.5 $\pm$ 0.7 (2)	0.364
	No	1.2 $\pm$ 0.8 (10)	
Respuesta estudio hemodinámico	Si	1.1 $\pm$ 1.1 (4)	1.000
	No	1.2 $\pm$ 0.8 (6)	

**Tabla 104.** Estímulo relativo del isoproterenol en membranas de hematíes ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas en los pacientes de profilaxis secundaria después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral.

No se ha encontrado ninguna correlación significativa entre el incremento en la producción de AMPc en membranas de hematíes tras isoproterenol  $10^{-4}$  M y las variables clínicas evaluadas.



### 4.3.3. Análisis de las posibles correlaciones entre la capacidad de bloqueo del propranolol $10^{-5}$ M (bloqueo relativo del propranolol) y las variables clínicas en los pacientes de profilaxis secundaria después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral:

Hemos evaluado el descenso en la producción de AMPc por parte de la AC en membranas de hematíes después del estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M y el bloqueo con propranolol  $10^{-5}$  M. Para ello, hemos calculado el número de veces que disminuye el valor de AMPc tras el bloqueo con propranolol  $10^{-5}$  M en relación al AMPc tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M (bloqueo relativo del propranolol). En la tabla 105 y 106 se muestran los resultados.

Variable	Coefficiente correlación Pearson	P
Bolsas de sangre transfundidas	<b>0.757*</b>	<b>0.049*</b>
Edad	0.087	0.788
Peso	0.631	0.094
Presión enclavada	-0.120	0.742
Presión libre	-0.279	0.436
GPVH	0.048	0.896
Presión arterial sistólica	-0.244	0.497
Presión arterial diastólica	0.029	0.937
Presión arterial media	-0.128	0.725
Frecuencia cardíaca	0.004	0.992

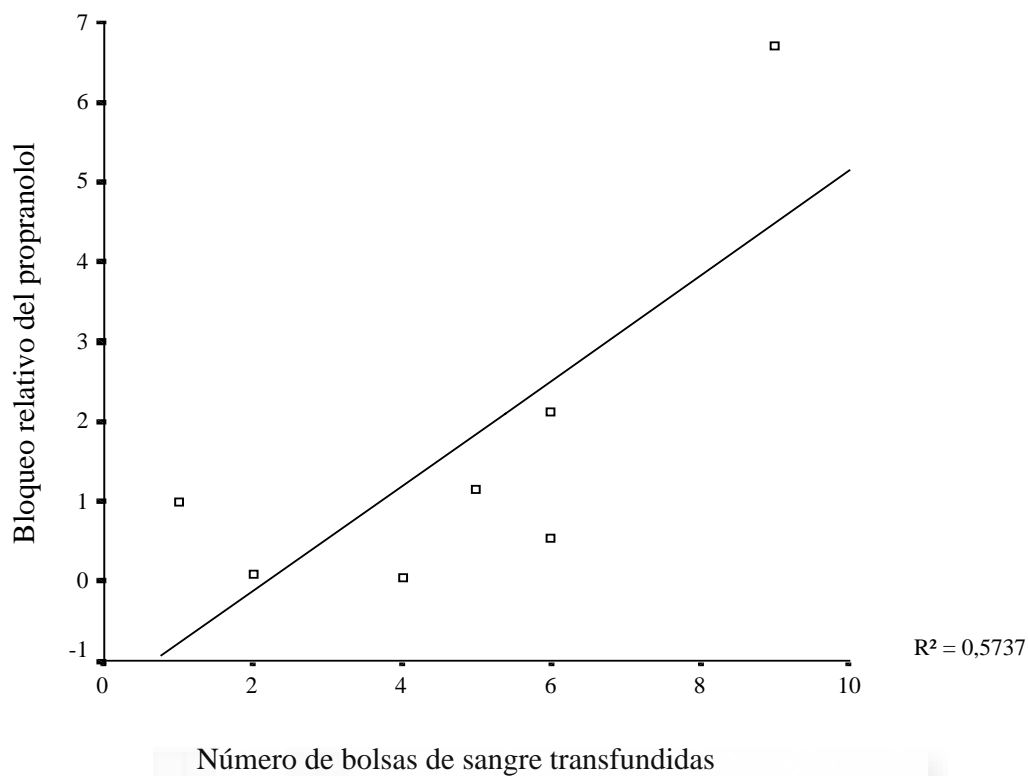
**Tabla 105.** Análisis del grado de correlación existente entre el bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes y las variables clínicas en los pacientes de profilaxis secundaria después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral. \*  $P < 0.05$ .

Variable		Bloqueo relativo del propranolol ( $\bar{X} \pm Ds$ ) (n)	P
Somatostatina	Simple	0.8 ± 0.7 (3)	0.800
	Doble	1.3 ± 1.1 (2)	
Sexo	Masculino	1.6 ± 2.0 (9)	0.209
	Femenino	0.4 ± 0.4 (3)	
Etiología de la cirrosis	Alcohol	2.0 ± 2.3 (6)	0.257
	Virus	0.7 ± 0.6 (4)	
	Otras	0.1 ± 0.1 (2)	
	Alcohol + virus	-	
Consumo activo de alcohol	Si	0.8 ± 0.5 (2)	1.000
	No	1.4 ± 2.0 (10)	
β-bloqueantes en el mes previo	Si	2.4 ± 3.1 (4)	0.683
	No	0.8 ± 0.5 (8)	
Nitritos en el mes previo	Si	2.1 (1)	0.333
	No	1.2 ± 1.9 (11)	
Furosemina en el mes previo	Si	6.7 (1)	0.167
	No	0.8 ± 0.6 (11)	
Espironolactona en el mes previo	Si	3.1 ± 3.2 (3)	0.145
	No	0.7 ± 0.5 (9)	
Lactulosa en el mes previo	Si	4.4 ± 3.3 (2)	<b>0.030*</b>
	No	0.7 ± 0.5 (10)	
Respuesta estudio hemodinámico	Si	0.9 ± 0.6 (4)	0.762
	No	1.7 ± 2.6 (6)	

**Tabla 106.** Bloqueo relativo del propranolol en membranas de hematíes ( $\bar{X} \pm Ds$ ) en función de las variables clínicas cualitativas en los pacientes de profilaxis secundaria después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral. \*  $P < 0.05$ .

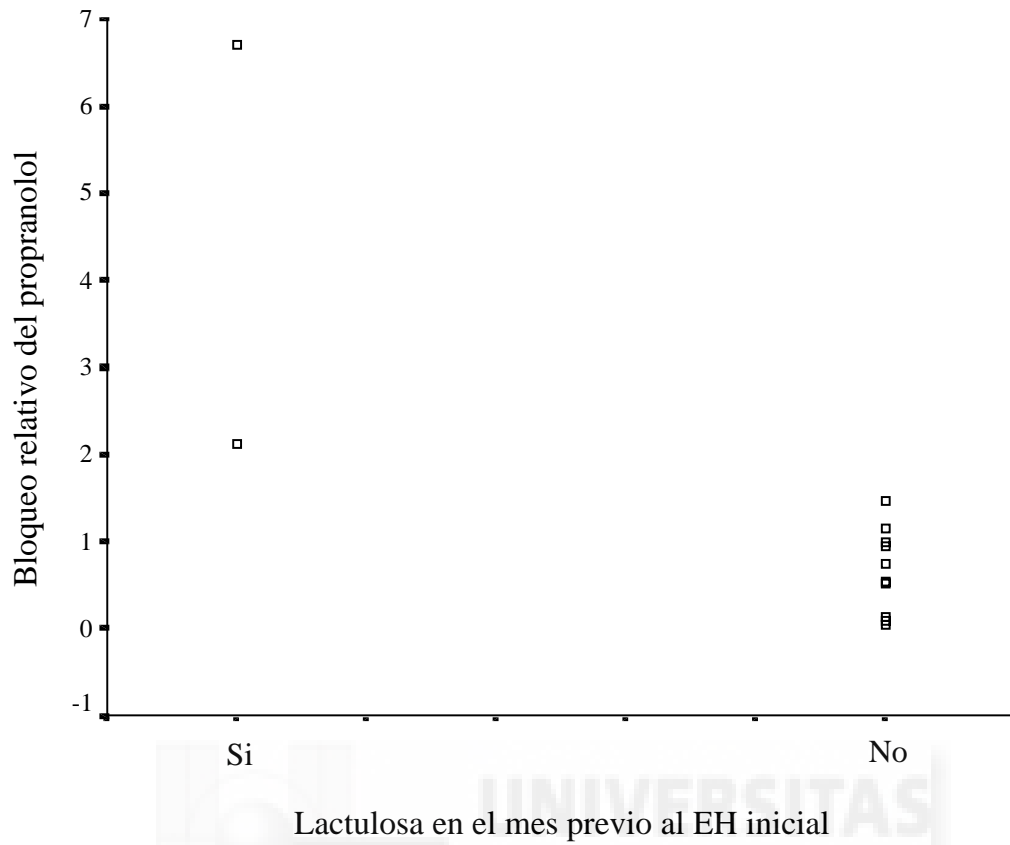
De todas las variables evaluadas, se ha encontrado una correlación significativa entre el descenso en la producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M en presencia de propranolol  $10^{-5}$  M y la cantidad de bolsas de sangre utilizadas para la transfusión y la administración de lactulosa o no en el mes previo al estudio hemodinámico.

En las figuras 105 y 106 se representan estas variables y su relación con el descenso en la producción de AMPc en presencia de propranolol  $10^{-5}$  M.



**Figura 105.** Correlación entre el bloqueo relativo del propranolol y el número de bolsas de sangre transfundidas en los pacientes de profilaxis secundaria tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral.

En esta correlación se observa que el número de bolsas que se le transfundieron al paciente durante el episodio de sangrado previo al EH inicial, no influye sobre el bloqueo relativo del propranolol.

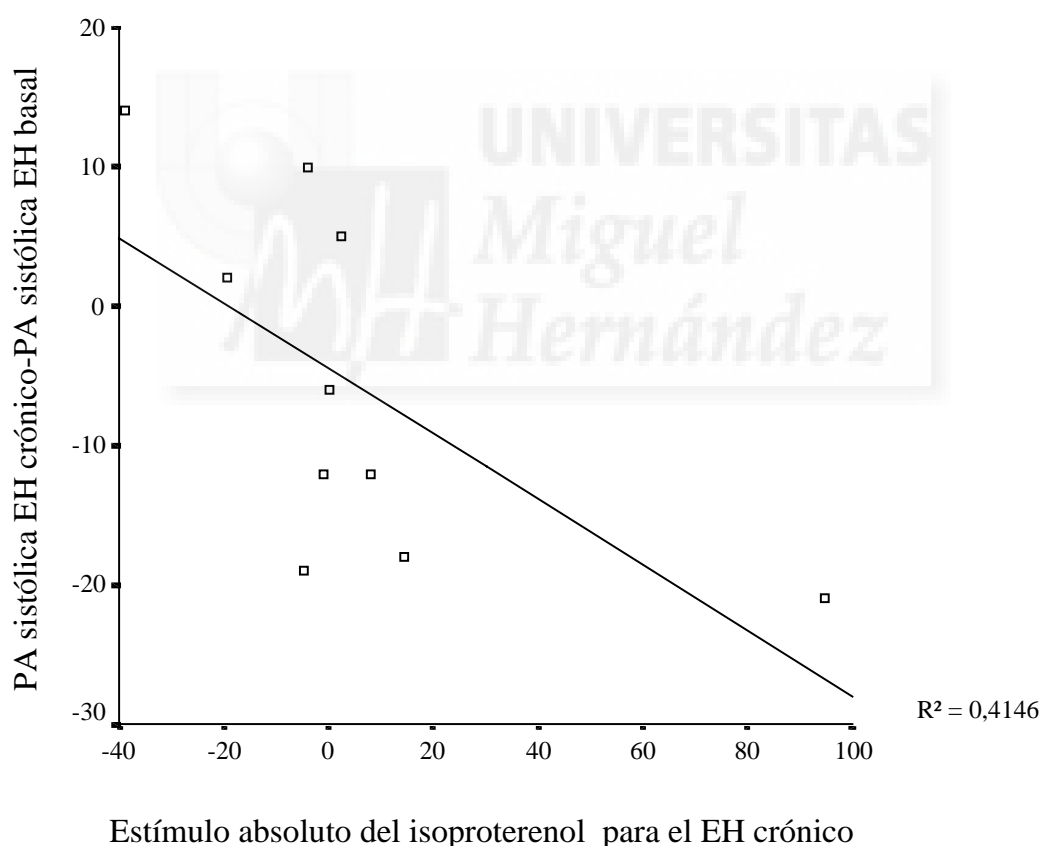


**Figura 106.** Comparación entre el bloqueo relativo del propranolol y la toma o no de lactulosa en el mes previo al EH inicial en los pacientes de profilaxis secundaria tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral.

#### 4.3.4. Análisis de los posibles cambios en las variables hemodinámicas tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral en los pacientes de profilaxis secundaria:

Se han evaluado las posibles correlaciones entre los cambios inducidos por la administración prolongada por vía oral de propranolol (3 meses) en las variables hemodinámicas (GPVH, FC, PAS, PAD, PAM, PE y PL), entendidos como la diferencia en los valores de dichas variables entre el EH crónico y después de un bolus iv de propranolol, y los incrementos en los valores de AMPc tras someter a las muestras sanguíneas a un estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M en presencia y ausencia de propranolol  $10^{-5}$  M.

En los pacientes de profilaxis secundaria, la única correlación significativa que se encontró fue entre los cambios en las presiones arteriales sistólicas durante el EH crónico y el EH inicial, y el incremento en la producción de AMPc inducido por isoproterenol  $10^{-4}$  M en membranas de hematíes después de 3 meses con propranolol oral (Coeficiente de correlación de Pearson: -0.644,  $P = 0.045$ ). En la figura 107 se representa dicha correlación.



**Figura 107.** Correlación entre los cambios en las presiones arteriales sistólicas tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral y el EH inicial, y el incremento en la producción de AMPc inducido por isoproterenol  $10^{-4}$  M (estímulo absoluto del isoproterenol) en pacientes de profilaxis secundaria después de 3 meses de tratamiento con propranolol.

En la tabla 107 se resumen las correlaciones encontradas entre los valores de AMPc y las variables clínicas en los pacientes de profilaxis secundaria tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral:

	Tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral	
	Profilaxis Secundaria	Relevancia de la correlación
AMPc sin estímulo	-	-
AMPc tras isoproterenol $10^{-4}$ M	-	-
Incremento en la producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol $10^{-4}$ M	-	-
Descenso en la producción de AMPc inducido por propranolol $10^{-5}$ M en presencia de isoproterenol $10^{-4}$ M	Bolsas de sangre transfundidas Lactulosa en el mes previo	Irrelevante Irrelevante
Cambios en las variables hemodinámicas	Cambios en la PAS y el incremento en la producción de AMPc inducido por isoproterenol $10^{-4}$ M tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral	Irrelevante

**Tabla 107.** Cuadro resumen de las correlaciones entre la actividad de la AC en membranas de hematíes y las variables clínicas en los pacientes de profilaxis secundaria tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral.

En las tablas 108 y 109 se resumen las correlaciones encontradas entre la actividad de la AC para los pacientes cirróticos con HTP participantes en el estudio.

	Situación basal		Tras bolus iv de propranolol		Tras 3 meses con propranolol oral	
	Profilaxis 1 <sup>aria</sup>	Profilaxis 2 <sup>aria</sup>	Profilaxis 1 <sup>aria</sup>	Profilaxis 2 <sup>aria</sup>	Profilaxis 1 <sup>aria</sup>	Profilaxis 2 <sup>aria</sup>
AMPc basal	-	PAS FC Índice de Quick	Edad Índice de Quick	PE FC Fosfatasa alcalina	-	-
AMPc tras isoproterenol 10 <sup>-4</sup> M	-	PAS PAM FC Glucosa Índice de Quick Consumo activo alcohol	FC Índice de Quick Sexo	Fosfatasa alcalina Glucosa	-	-
Incremento AMPc tras estimular con isoproterenol 10 <sup>-4</sup> M	Espironolactona en mes previo	-	-	-	-	-
Descenso AMPc tras bloquear con propranolol 10 <sup>-5</sup> M en presencia de isoproterenol 10 <sup>-4</sup> M	-	-	-	PE PAD	PAD	
Cambios en las variables hemodinámicas	-	-	Cambios en las presiones libres con el descenso en la producción de AMPc inducido por propranolol 10 <sup>-5</sup> M	-	Cambios en las frecuencias cardiacas con incremento en la producción de AMPc inducido por isoproterenol 10 <sup>-4</sup> M	

**Tabla 108.** Resumen con las correlaciones relevantes entre la actividad de la AC en membranas de hematíes y las variables clínicas en función de la profilaxis de los pacientes. PAD: presión arterial diastólica, PAS: presión arterial sistólica, PAM: presión arterial media, FC: frecuencia cardiaca

	Antes del bolus iv propranolol	Tras bolus iv de propranolol	Tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral
AMPc basal	-	Edad PE PL Espironolactona en el mes previo al EH	-
AMPc tras isoproterenol 10 <sup>-4</sup> M	-	-	Espironolactona en el mes previo al EH
Estímulo relativo del isoproterenol	-	-	-
Bloqueo relativo del propranolol	-	-	-
Cambios en las variables hemodinámicas		-	-

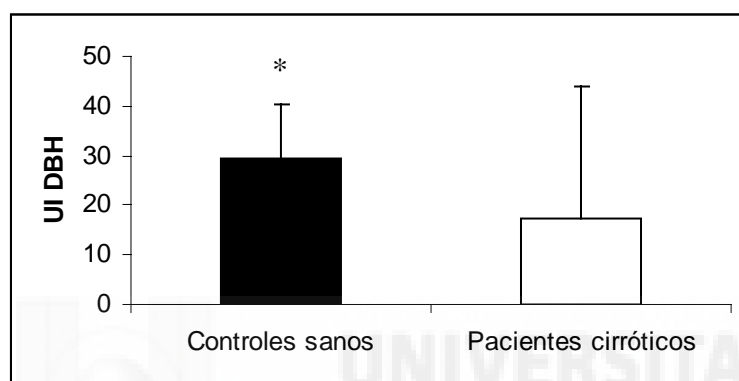
**Tabla 109.** Resumen de las correlaciones relevantes entre la actividad de la AC en membranas de hematíes y las variables clínicas de los pacientes cirróticos con HTP.



## 5. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LA DOPAMINA $\beta$ -HIDROXILASA:

En el estudio hemos determinado la actividad de la DBH en suero como un indicador de la actividad del sistema nervioso simpático en 21 sueros de controles sanos procedentes del centro de transfusión de sangre de Alicante y en 14 pacientes cirróticos con varices esofágicas e hipertensión portal.

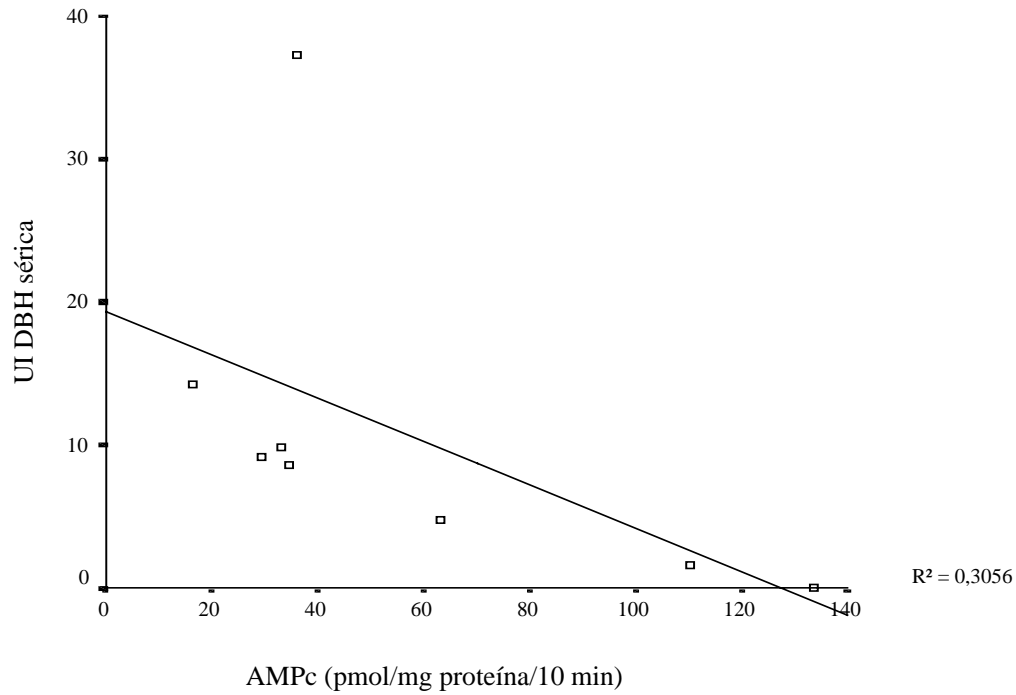
Los experimentos realizados muestran que los sueros de los controles sanos presentaban una actividad de  $29.3 \pm 11.0$  UI DBH y que este valor era significativamente mayor ( $P = 0.001$ ) al cuantificado en los pacientes cirróticos con hipertensión portal y varices esofágicas ( $17.5 \pm 26.6$  UI DBH) (figura 108).



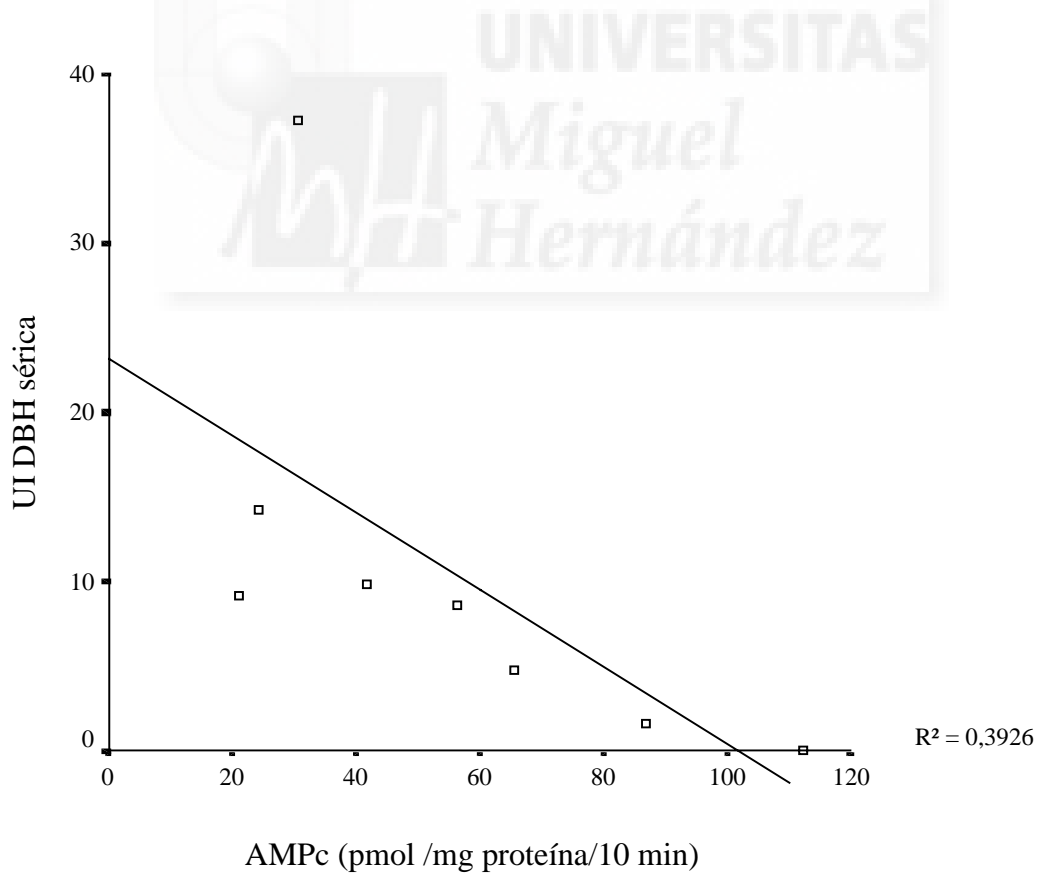
**Figura 108.** Actividad de la DBH sérica (UI) en controles sanos y pacientes cirróticos. \*  $P < 0.05$ .

Dentro del grupo de los pacientes, se evaluó la actividad de la DBH en función del tipo de profilaxis y se observó que los pacientes de profilaxis primaria presentaban una actividad de  $27.9 \pm 42.8$  ( $n = 5$ ) UI DBH y los pacientes de profilaxis secundaria mostraron una actividad de  $11.7 \pm 11.1$  ( $n = 9$ ) UI DBH, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

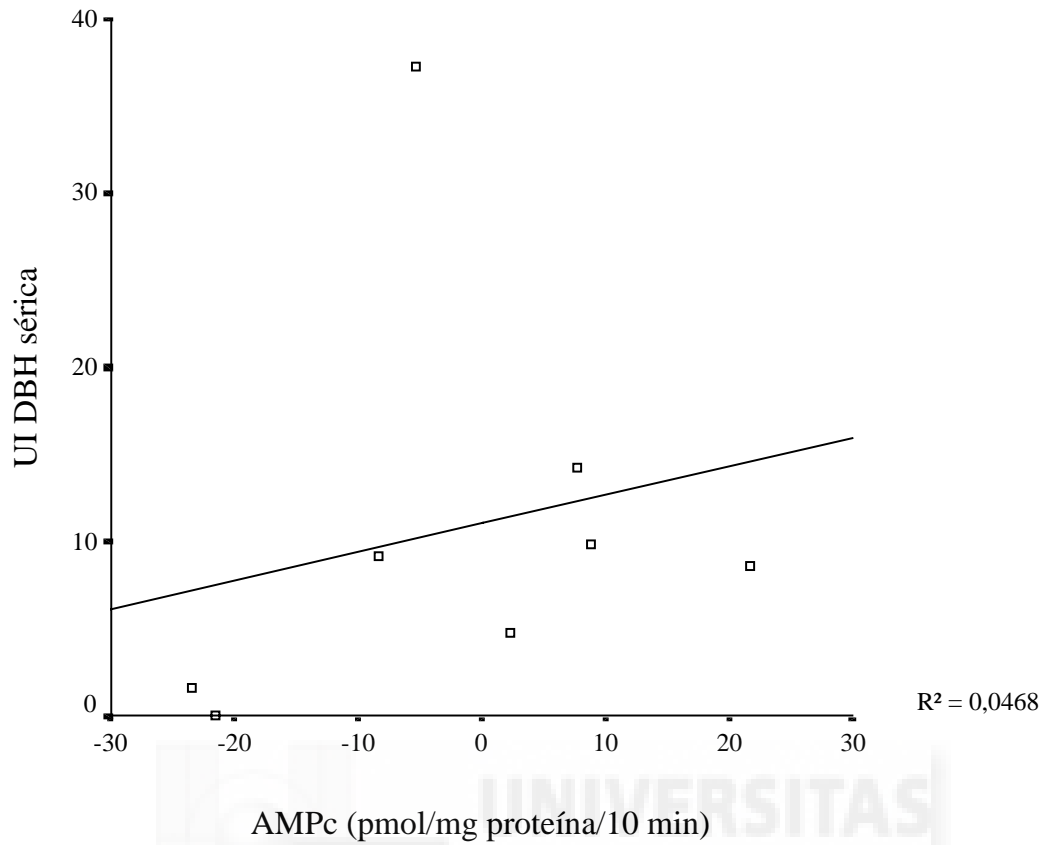
En la muestra de pacientes estudiados se apreció la existencia de una relación entre la producción de AMPc en las membranas de los hematíes y la actividad de la DBH sérica. Aquellos pacientes con una importante actividad de la AC tanto en condiciones basales (figura 109) como después del estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M (figura 110) mostraban valores de actividad de la DBH sérica relativamente bajos. También se observó que los pacientes donde el incremento neto en la producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M era negativo (no se produce un aumento en la actividad de la AC tras isoproterenol) poseen niveles de DBH séricos bajos en comparación con los pacientes que poseen un incremento positivo en la producción de AMPc (figura 111), aunque estos resultados deben tomarse con precaución debido al escaso tamaño muestral.



**Figura 109.** Correlación entre la actividad de la DBH sérica (UI DBH) y la producción basal de AMPc en las membranas aisladas de hematíes en pacientes cirróticos.



**Figura 110.** Correlación entre la actividad de la DBH sérica (UI DBH) y la formación de AMPc tras la incubación de las membranas de hematíes con isoproterenol  $10^{-4}$  M en pacientes cirróticos.

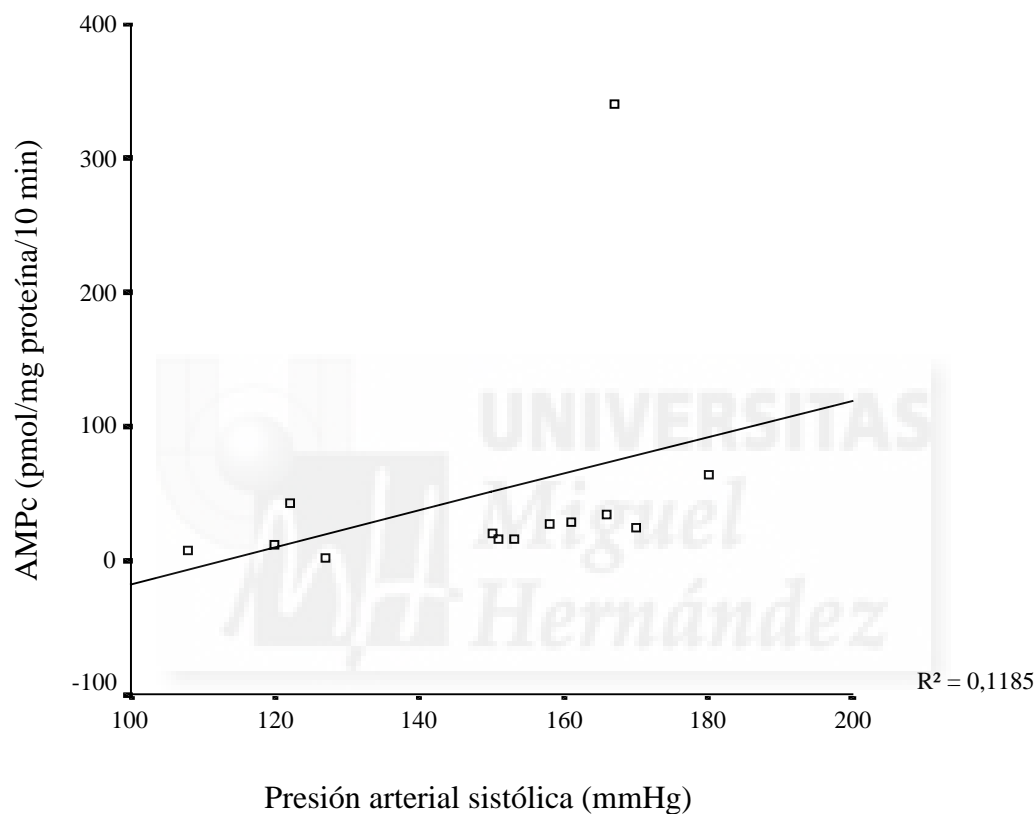


**Figura 111.** Correlación entre la actividad de la DBH sérica (UI DBH) y el incremento neto en la producción de AMPc formado tras la incubación de membranas de hematíes con isoproterenol  $10^{-4}$  M (n = 8) en pacientes cirróticos.

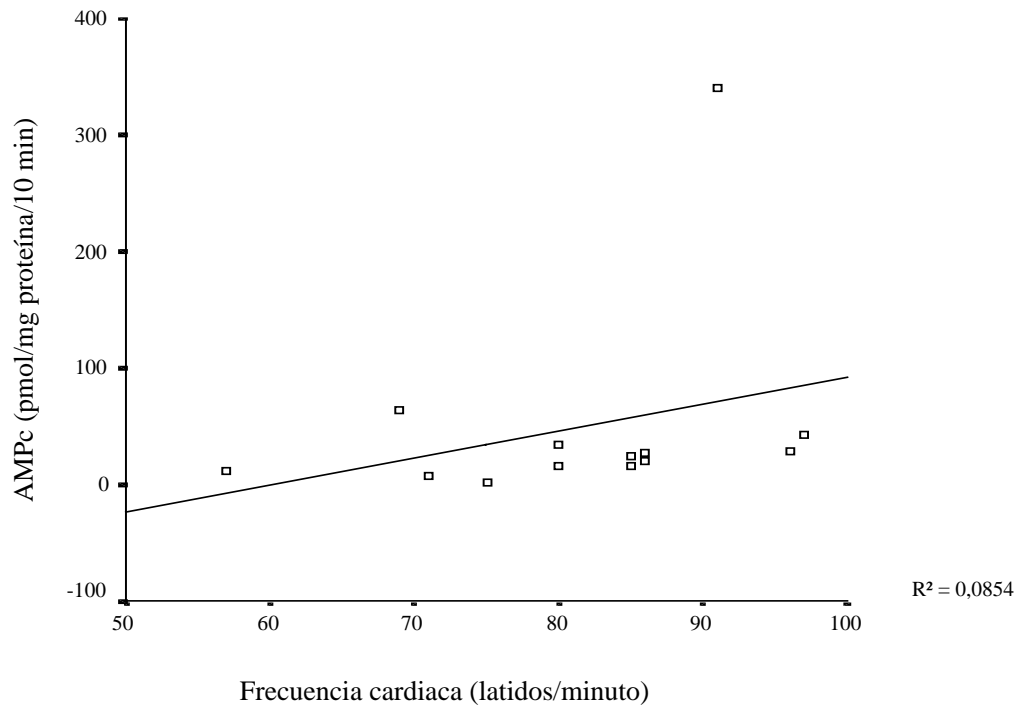
## 6. FACTORES HEMODINÁMICOS RELACIONADOS CON LA ACTIVIDAD DEL SISTEMA NERVIOSO SIMPÁTICO:

Nuestro equipo valoró la posible implicación del SNA en el modelo de estudio presentado. Para ello se evaluaron las posibles correlaciones entre los valores de AMPc en las membranas de hematíes de los pacientes y como indicador de la actividad del SNA se estudiaron factores hemodinámicos que están influidos por el SNA como la frecuencia cardíaca y presión arterial sistólica.

En el caso de los pacientes de profilaxis primaria no se encontraron correlaciones significativas entre los valores de AMPc y la FC y/o PAS (figuras 112 y 113.).

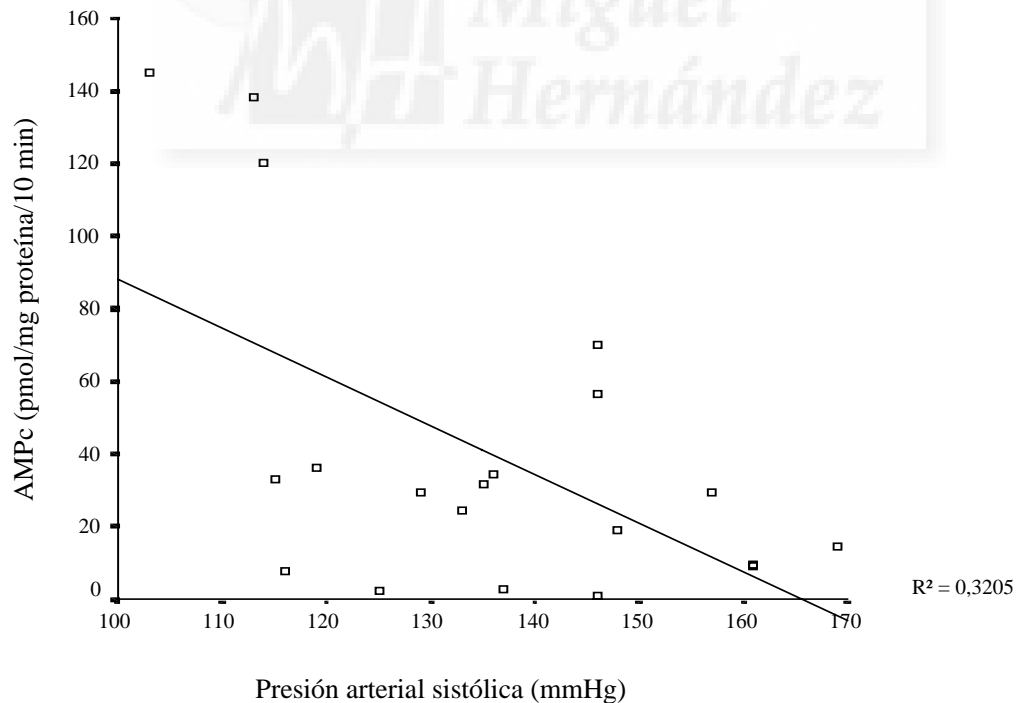


**Figura 112.** Correlación entre los valores de AMPc en membranas de hematíes y la presión arterial sistólica en los pacientes de profilaxis primaria ( $P = 0.249$ ).

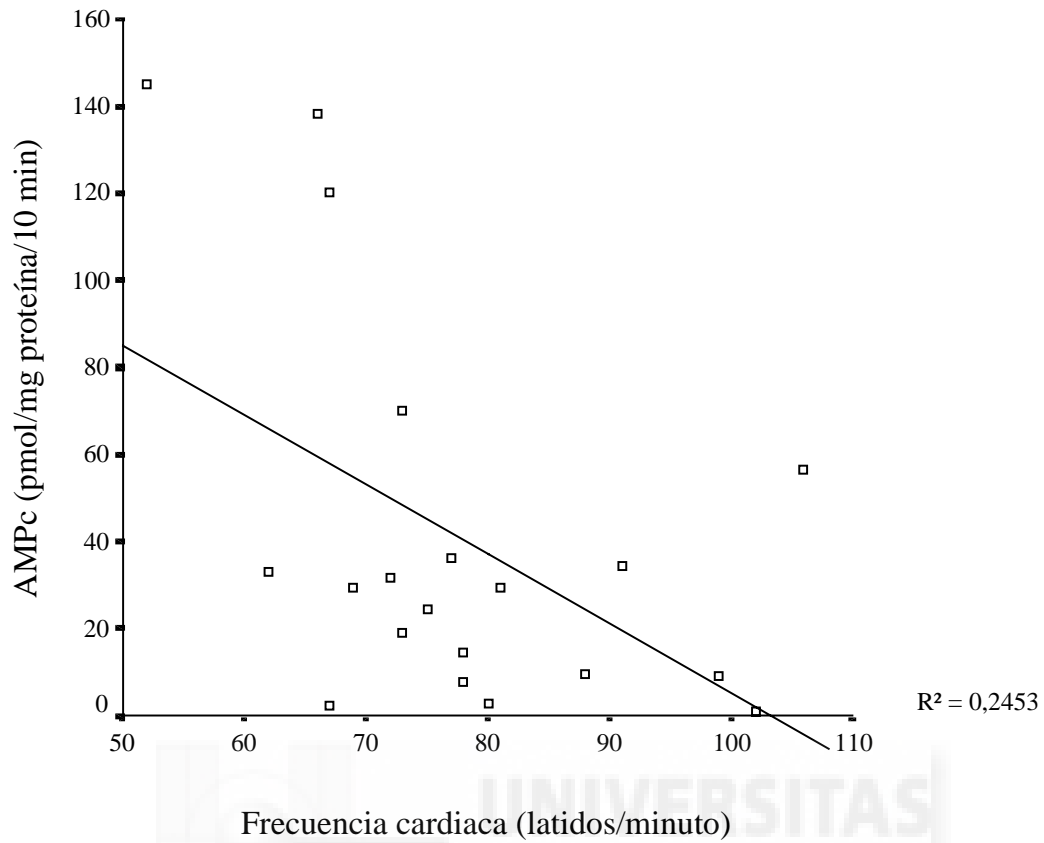


**Figura 113.** Correlación entre los valores de AMPc en membranas de hematíes y la frecuencia cardiaca en pacientes de profilaxis primaria (  $P = 0.333$ ).

En el caso de los pacientes de profilaxis secundaria, las correlaciones entre el AMPc y la FC y PA fueron significativas y se muestran en las figuras 114 y 115:



**Figura 114.** Correlación entre los valores de AMPc en membranas de hematíes y la presión arterial sistólica en pacientes de profilaxis secundaria (  $P = 0.009$ ).



**Figuras 115.** Correlaciones entre los valores de AMPC en membranas de hematíes y la frecuencia cardiaca en los pacientes de profilaxis secundaria ( $P = 0.026$ ).



## **DISCUSIÓN**

---

El sangrado por varices esofágicas constituye la complicación más común y letal en pacientes con cirrosis e HTP (Burroughs y cols, 1991 y 1992; Sharara, 2001) con un riesgo anual de sangrado del 33% (Groszman y cols, 1990; Sharara, 2001). Se origina cuando la tensión ejercida sobre las paredes delgadas de las varices sobrepasa el valor crítico de 12 mmHg (Polio y cols, 1986; Rigau y cols, 1989). Hasta un tercio de los pacientes con varices sangrarán durante los 2 primeros años (Groszman y cols, 1990) y aunque este sangrado inicial se detiene espontáneamente en el 60-70% de los casos, la mortalidad inicial oscila entre un 30 y 70%. Los pacientes que sobreviven al primer episodio de sangrado tienen un riesgo de resangrado del 80% a los 2 años (Kennedy y cols, 2002) y del 70% al año (D'Amico y cols, 1995).

El tratamiento de elección en estos pacientes cirróticos con HTP son los fármacos  $\beta$ -bloqueantes no selectivos (propranolol y nadolol) (Kennedy y cols, 2002; Cheng y cols, 2003) puesto que disminuyen el riesgo de sangrado por varices al disminuir la presión portal, la presión de las varices, el flujo sanguíneo en la vena acigos y también aumentan la tasa de supervivencia (Bosch y cols, 1985; García-Pagán y cols, 1990; Feu y cols, 1991 y 1993; Hicken y cols, 2003). Los  $\beta$ -bloqueantes no selectivos ejercen su acción por la combinación de 2 efectos. Por un lado, el bloqueo de los receptores  $\beta_1$  a nivel cardiaco origina una reducción en el gasto cardiaco con la consiguiente disminución de la presión arterial y la activación simpática refleja provocando una vasoconstricción esplácnica debida al estímulo de los receptores  $\alpha$  adrenérgicos. Por otro lado, el bloqueo de los receptores  $\beta_2$  favorece la vasoconstricción esplácnica en los vasos del territorio mesentérico y periférico por la eliminación de la vasodilatación mediada por estos receptores (Hillon y cols, 1982; Lebrec y cols, 1982; Luca y cols, 1995; Merli y cols, 2003).

Los pacientes tratados con  $\beta$ -bloqueantes no selectivos pueden responder o no adecuadamente a estos fármacos. En la práctica clínica, se considera a los pacientes buenos respondedores cuando después de 3 meses de tratamiento oral con el antagonista  $\beta$ -adrenérgico se produce una caída en el GPVH de un 20% respecto al valor basal o un descenso por debajo de 12 mmHg, asociándose con una disminución significativa del riesgo de sangrado (Feu y cols, 1995). La realidad es que tan sólo un 10-40% de los pacientes con cirrosis hepática, HTP y varices esofágicas son buenos respondedores al tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes (Feu y cols, 1995; Merkel y cols, 2000A; Sharara y cols, 2001) y que algunos autores cuestionan hoy en día la medida del GPVH como un indicador de la respuesta al tratamiento con antagonistas  $\beta$ -adrenérgico (Groszmann y cols, 2004). En el 60-70% de los casos, se produce un descenso en la presión portal tras la administración del fármaco pero sólo en el 10-30% de los pacientes desciende hasta un 20% del valor basal (Sharara, 2001).

No se conocen las causas o mecanismos por los que los pacientes cirróticos no responden al tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes aunque se han postulado factores relacionados con el paciente (grado de daño hepático, tamaño de las varices, presencia de marcas rojas en las mismas), factores farmacocinéticos (diferencias en la absorción, distribución o un elevado efecto de primer paso) y farmacodinámicos como disminución en el número de receptores (García-Pagán y cols, 1992), fenómenos de down-regulation (Gerbes y cols, 1986) y polimorfismos genéticos (Dishy y cols, 2001).

Son muchos los trabajos en los que se ha evaluado la farmacocinética del propranolol en pacientes cirróticos con el fin de conocer si ésta puede estar relacionada con la respuesta al tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes (Arthur y cols, 1985; Langner y cols, 1988; Cales y cols, 1989, 1993; Schepke y cols, 1999).

Caujolle y cols, (1988) y Calés y cols, (1989) no encontraron correlaciones significativas entre la severidad de la cirrosis y los datos farmacocinéticos. En 1993



estos autores sugirieron que la cinética estaba alterada en pacientes con cirrosis alcohólica e HTP puesto que se producía una reducción en el aclaramiento en comparación con voluntarios sanos. Schepke y cols, (1999) encontraron un efecto hemodinámico del propranolol altamente variable y, en el mismo sentido que los datos de Cales y cols, no correlacionado con las concentraciones plasmáticas de propranolol. Los resultados farmacocinéticos propuestos por los autores anteriores son controvertidos y aunque no se hayan encontrado cambios farmacocinéticos relevantes sí se han observado cambios en la respuesta al tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes. Tampoco se encontró ningún estudio en el que con concentraciones bajas de propranolol hubiera mayor sangrado de las varices esofágicas.

En cuanto a los factores farmacodinámicos, existen evidencias que apoyan diferencias en el número de receptores en células mononucleares de sangre periférica tanto en pacientes cirróticos con ascitis severa como en modelos de ratas cirróticas puesto que, aunque no existen diferencias significativas entre los pacientes cirróticos y los controles en cuanto a densidad y afinidad de los sitios de unión para  $\beta_2$ -adrenoceptores, sí existe un número significativamente más bajo de sitios de unión por célula en pacientes con ascitis severa que en pacientes con ascitis moderada o sin ascitis (Gerbes y cols, 1986). Por tanto, Gerbes y cols, (1986) propusieron que la regulación a la baja observada en los  $\beta$ -adrenoceptores podría influir sobre la respuesta hemodinámica de los fármacos  $\beta$ -bloqueantes. Por su parte, García-Pagán y cols, (1992) no encontraron relación alguna entre la densidad, afinidad y número de  $\beta_2$ -adrenoceptores en linfocitos y la respuesta hemodinámica de pacientes con cirrosis avanzada.

Dado que los fenómenos anteriores de down-regulation y de disminución en el número de receptores no explican con claridad las causas por las que los pacientes no responden al tratamiento con propranolol, nuestro equipo se planteó el estudio de este fenómeno evaluando la funcionalidad de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos. Como modelo de trabajo se utilizaron membranas de hematíes de pacientes cirróticos con HTP puesto que ya desde los años 80, Brodde y cols, 1981 y 1987, y más recientemente Dlusskaia y cols, 1996, propusieron que las células sanguíneas eran un modelo válido para el estudio de receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos en humanos ya que contienen una población homogénea de receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos acoplados al sistema adenilato ciclasa-AMPC (Horga y cols, 2000). Por este motivo, y ante la dificultad de acceder a los vasos espláncnicos para estudiar directamente la funcionalidad de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos nos planteamos el empleo de hematíes (Motulsky y cols, 1982) como sensores potenciales de lo que acontece con los  $\beta_2$ -adrenoceptores de los territorios vasculares en estos pacientes cirróticos, a pesar de que no existen evidencias experimentales de que los cambios funcionales y en número ocurran de forma simultánea y en la misma medida en los receptores  $\beta$ -adrenérgicos de células circulantes y de las células de los vasos espláncnicos.

Como indicador de esta funcionalidad se usó la producción de AMPC en respuesta a un estímulo adrenérgico con isoproterenol en presencia y ausencia de propranolol. Previamente nuestro grupo había confirmado la posibilidad de cuantificar la actividad del sistema formado por el receptor  $\beta$ -adrenérgico-proteína G-AC en membranas de hematíes humanos maduros midiendo la producción de AMPC en respuesta a un estímulo  $\beta$ -adrenérgico en voluntarios sanos (Horga y cols, 2000). Trabajos más recientes han confirmado la utilidad de este sistema como modelo experimental en hematíes maduros humanos de pacientes con anemia falciforme (Hines y cols, 2003) y en paludismo (Harrison y cols, 2003).

Los diferentes elementos celulares sanguíneos distintos de los eritrocitos como las plaquetas (Knudsen y cols, 1996; Søndergaard y cols, 1998; Geiger, 2001) y los leucocitos (Vermeir y cols, 1993) pueden actuar como una fuente importante de aporte de AMPc. En nuestras condiciones experimentales las posibles contaminaciones se controlaron sometiendo las muestras a centrifugaciones y a un gradiente de Ficoll y determinando el contenido celular de los pellets resultantes. En este sentido, el 99.82 % de las células de la muestra analizada lo constituían hematíes, el 0.0009 % linfocitos, el 0.09 % neutrófilos, el 0.004 % eosinófilos y el 0.08 % plaquetas. A diferencia de los trabajos anteriormente citados, en nuestras muestras la proporción de plaquetas o linfocitos remanente es de apenas 1 por cada 1000 hematíes. Experimentos previos de nuestro grupo y controles realizados en este estudio en el que se separaron los elementos celulares utilizando un gradiente de Percoll en vez de Ficoll y por tanto, excluyendo prácticamente la presencia de cualquier otro elemento celular diferente de los hematíes, muestran una producción basal similar. Por lo tanto, puede asumirse razonablemente que el AMPc medido en nuestro estudio procede, en su mayor parte, de las membranas de hematíes.

Dado que el isoproterenol es un agonista no específico de los receptores  $\beta$  adrenérgicos, el efecto estimulante del mismo no podría atribuirse específicamente a uno de los  $\beta$ -adrenoceptores. En las membranas de hematíes se ha descrito la existencia tanto de receptores  $\beta_1$  como  $\beta_2$  ambos acoplados al sistema de la AC aunque la proporción encontrada fue de 2 veces más receptores  $\beta_2$  que  $\beta_1$  (67/33) (Bree y cols, 1984). En un trabajo previo de nuestro grupo se demostró que el isoproterenol  $10^{-4}$  M provoca un estímulo en las membranas de los eritrocitos de voluntarios sanos que es consecuencia de una activación de los receptores  $\beta_2$  adrenérgicos, puesto que atenolol, un antagonista selectivo de los receptores  $\beta_1$ , no modificó el efecto del isoproterenol, pero este efecto sí se revirtió por la adición del antagonista de los receptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$  adrenérgicos propranolol (Horga y cols, 2000). Por esta razón, asumimos que las variaciones observadas se deben principalmente a cambios funcionales de los receptores  $\beta_2$  adrenérgicos.

Nuestros resultados muestran que la actividad funcional de los  $\beta_2$ -adrenoceptores y de la AC de membranas de hematíes maduros de pacientes cirróticos con HTP y varices esofágicas es diferente de la observada en voluntarios sanos. De hecho, esta actividad es del orden de 4 veces superior en el caso de los pacientes cirróticos en comparación con los voluntarios sanos siendo estos datos compatibles con resultados previos obtenidos en modelos animales de cirrosis e HTP (Bomzon y cols, 2001). Este hallazgo estaría en consonancia con observaciones previas (Cahill y cols, 1994) en arterias mesentéricas y hepáticas, y en aorta torácica de conejos hipertensos sugiriendo la posible existencia de un paralelismo entre los cambios en el sistema receptor  $\beta$ -adrenérgico/AC obtenidos en hematíes y en lechos arteriales. Por tanto, es razonable asumir que los eritrocitos adultos pueden ser considerados como un modelo accesible para el estudio de la funcionalidad del receptor  $\beta$ /AC en humanos.

No se conocen cuales son los factores relacionados con este incremento en la actividad de la AC aunque algunos autores han descrito una elevación de segundos mensajeros (AMPc) tras una estimulación continua de los  $\beta_2$ -adrenoceptores en células del músculo liso vascular por niveles elevados de catecolaminas (Henriksen y cols, 1994). Otros autores han propuesto que un incremento en la generación de prostaglandinas como respuesta al estrés en la circulación portal podría incrementar el nivel de AMPc ya que estimula la vía de señalización del mismo a través de la activación de receptores como EP<sub>2</sub>, EP<sub>4</sub> ó IP (Hamilton y cols, 1981; Hashizume y cols,

1985; Sitzman y cols, 1991; Jeremy y cols, 1994; Pazos, 2003) y otra vía de aumento de AMPc podría deberse a los niveles plasmáticos de glucagón debido a su modo de acción a través de un receptor acoplado a AMPc (Ohara y cols, 1993; Pak y cols, 1994).

Bomzon y cols, (2001) han descrito en modelos animales de cirrosis e HTP que la vasodilatación esplácnica característica de esta enfermedad se asocia a un incremento del AMPc en las células del músculo liso vascular. Todas estas observaciones serían extrapolables a la situación de los pacientes cirróticos ya que poseen niveles elevados de catecolaminas plasmáticas (Ring-Larsen y cols, 1982; Gaudin y cols, 1989; Braillon y cols, 1992; García-Pagán y cols, 1999), de prostaciclina (Tromm y cols, 1997), de glucagón (Yoshida y cols, 1998; Feng y cols, 1999) y muestran una vasodilatación esplácnica marcada, pero exactamente el mecanismo implicado no se conoce.

Otro resultado a destacar de nuestro estudio es que existen 2 comportamientos diferentes en los sistemas de la AC en las membranas de los hematíes de los pacientes. Por un lado, las membranas de los pacientes que nunca han sangrado (profilaxis primaria) incrementan de manera significativa la actividad de la AC ante un estímulo adrenérgico con isoproterenol y el propranolol es capaz de revertir este efecto, quedando patente el componente  $\beta$  adrenérgico de dicho incremento. Este patrón se asemeja a lo observado en voluntarios sanos. Por otro, las membranas de aquellos pacientes que han sufrido algún episodio de sangrado previo (profilaxis secundaria), no responden ante el agonista adrenérgico isoproterenol, a pesar de partir de una actividad basal de la AC similar a la de los pacientes que no han sangrado.

Un posible motivo para que los pacientes de profilaxis secundaria no respondan al isoproterenol podría ser la edad de los mismos ya que son significativamente mayores que los de primaria y se tiene constancia de que la sensibilidad para responder al isoproterenol disminuye conforme aumenta la edad (Davies y cols, 1996). Realizamos un análisis para ver las diferencias en los valores de AMPc de nuestros pacientes de acuerdo con la edad y se observó que ésta no influía sobre los valores de AMPc aunque no se puede descartar totalmente su participación (ver resultados).

Otra posible explicación de la diferencia entre ambos grupos de pacientes sería el distinto tratamiento farmacológico recibido. Se tiene constancia de que la somatostatina puede interferir sobre la actividad de la AC aunque existen datos contradictorios sobre la magnitud y sentido de dicho efecto (Moser y cols, 1992 y 1993; Reynaert y cols, 2003). A pesar que una parte de los pacientes del grupo de profilaxis secundaria fueron tratados con somatostatina en los días previos al estudio hemodinámico, no se encontraron diferencias significativas en la respuesta al estímulo con isoproterenol entre estos pacientes y los que no recibieron somatostatina. Así pues, el hecho de que los valores basales de AMPc sean similares en ambos grupos de pacientes sería compatible con la no existencia de cambios en la actividad de la AC inducidos agudamente por el episodio de sangrado y el tratamiento del mismo (somatostatina, transfusiones, expansores del plasma...) (Moser y cols, 1992 y 1993; Reynaert y cols, 2003).

También existen pacientes de profilaxis secundaria que habían recibido una transfusión sanguínea para el control del sangrado por varices y parte de sus hematíes podían proceder de concentrados transfundidos alterando los resultados. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en los valores de AMPc entre aquellos pacientes que fueron transfundidos y los que no. Estos datos sugieren que la actividad de la AC sufre un cambio relacionado con la evolución de la enfermedad que es “estable” durante el proceso hemorrágico y su tratamiento.

No se conoce si la falta de respuesta observada en algunos pacientes cirróticos frente al isoproterenol o ante un tratamiento con antagonistas  $\beta$  adrenérgicos está

asociada con algún tipo de polimorfismo genético. En este sentido, Evans y cols, (2003) han revisado la existencia de polimorfismos de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos que pueden alterar el proceso de transducción de la señal en estos receptores. Estos polimorfismos son los constituidos por sustitución de arginina por glicina en el codón 16 y por sustitución de glutamina por ácido glutámico en el codón 27. Concretamente, estos autores observaron que aquellos pacientes que eran homocigotos para arginina en el codón 16 tenían una desensibilización casi completa después de una infusión continua de isoproterenol con una dilatación de las venas que decrecía desde una basal de 44% a un 8% tras 90 minutos de infusión. Por el contrario, los pacientes que eran homocigotos para glicina en el codón 16 no sufrían cambios en la dilatación de las venas, independientemente del estado del codón 27. Por otro lado, los sujetos homocigotos para el alelo del ácido glutámico poseen una mayor dilatación de las venas en respuesta a isoproterenol que aquellos con el genotipo de glutamina en el codón 27, independientemente del estado del codón 16 (Evans y cols, 2003). No sabemos si el posible polimorfismo genético podría influir en la respuesta al tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes ni su relevancia puesto que no se ha evaluado siendo un campo interesante para futuros estudios.

Antes que nosotros, otros autores han observado mediante aproximaciones experimentales diferentes a la usada en este trabajo que la respuesta a isoproterenol puede estar alterada en pacientes cirróticos. Ya en 1985, Lenz y cols observaron que la respuesta a isoproterenol estaba disminuida cuando evaluaron la funcionalidad del sistema nervioso autónomo en 11 pacientes con encefalopatía hepática en comparación con los controles. Ramond y cols, (1986) postularon que la respuesta  $\beta$ -adrenérgica a isoproterenol podía también estar alterada en pacientes con cirrosis alcohólica; realizaron un estudio con 13 pacientes para evaluar la actividad nerviosa simpática mediante el test del isoproterenol y observaron que la dosis de isoproterenol requerida para incrementar la frecuencia cardíaca en 25 latidos/min (dosis cronotrópica 25 o  $CD_{25}$ ) era significativamente mayor en los pacientes que en los controles. Además, encontraron que esta  $CD_{25}$  estaba significativamente correlacionada con las concentraciones plasmáticas de albúmina, frecuencia cardíaca y presión venosa hepática enclavada. Puede excluirse que estos cambios se deban a alteraciones en el metabolismo del isoproterenol ya que se ha descrito que la actividad de la catecol-O-metil-transferasa (COMT) no está alterada en pacientes con cirrosis (Keller y cols, 1984). Igualmente, en estos estudios se excluyen todas aquellas causas que podían disminuir la respuesta a las inyecciones de isoproterenol como asma (Cookson y cols, 1963), diabetes mellitus (Cryer y cols, 1980), alteraciones tiroideas (Christensen y cols, 1979) o insuficiencia pulmonar (Henriksen y cols, 1980). Sin embargo, otros autores han postulado que la respuesta  $\beta$  a la administración de isoproterenol no está alterada en pacientes cirróticos en comparación con la de los controles (Bierbrier y cols, 1994). Estos autores realizaron un estudio para determinar la sensibilidad adrenérgica vascular en 9 pacientes cirróticos y cuantificaron los cambios inducidos por fenilefrina e isoproterenol en la vena de la mano dorsal. Los resultados mostraron que la vasoconstricción mediada por fenilefrina estaba significativamente reducida en pacientes cirróticos en comparación con los controles, hecho que confirma lo observado en modelos animales (Polio y cols, 1993; Bomzon y cols, 1987). En contraste con los hallazgos de la respuesta  $\alpha$ -adrenérgica, la respuesta  $\beta$ -adrenérgica al isoproterenol permaneció inalterada en los pacientes cirróticos. La posible discordancia entre los datos de Bierbrier y los de Ramond, puede deberse a diferentes etiologías de la cirrosis, a la heterogeneidad de los grupos, a la diferencia de edad con el grupo de referencia o control, etc. MacGilchrist y cols, (1991) también postularon que la  $CD_{20}$  (dosis de agonista necesaria para incrementar la

frecuencia cardiaca en 20 latidos/minuto) para isoproterenol era similar en pacientes cirróticos y controles. Estos autores también encontraron que los pacientes cirróticos muestran una respuesta atenuada a noradrenalina, a fenilefrina y a  $\alpha$ -metilnorepinefrina. Las diferencias con los grupos que postulan que existe atenuación en la respuesta a isoproterenol (Lenz y cols, 1985; Ramond y cols, 1986) podrían deberse a los métodos utilizados para determinar la actividad simpática. Así por ejemplo, el grupo de Lenz y cols, (1985) evaluó la respuesta examinando las inyecciones de bolus individuales que puede ser menos fiable que las dosis múltiples utilizadas por MacGilchrist y cols. También pueden ser debidas a la severidad de los pacientes participantes en los estudios puesto que los trabajos de Lenz y los de Ramond se realizaron con un grupo de pacientes cirróticos con enfermedad más avanzada. Además, el grupo control estudiado por Lenzer y cols fue considerablemente más joven que el grupo cirrótico y se sabe que la sensibilidad al isoproterenol disminuye con la edad (Cookson y cols, 1963; Cryer y cols, 1980). Más recientemente, Laurent y cols, 2001, observaron en cardiomiocitos una respuesta a isoproterenol disminuida a pesar de que no había reducción en la densidad de receptores  $\beta$ . Los datos de Lenz y cols, y los de Ramond y cols, estarían en concordancia con lo observado en nuestro estudio puesto que los pacientes que no responden al isoproterenol son aquellos con un grado de cirrosis más avanzado puesto que han sangrado (profilaxis secundaria) y porque estos pacientes poseen una edad significativamente mayor que los pacientes de profilaxis primaria (Cookson y cols, 1963; Cryer y cols, 1980).

En diferentes modelos animales de cirrosis, la respuesta vascular también se encuentra alterada. La primera demostración de respuesta vascular atenuada en la vasculatura periférica en un modelo animal de daño hepático fue hecha por Bomzon y cols en 1978. Mostraron una respuesta atenuada en la vasculatura muscular esquelética a noradrenalina en mandriles con un conducto biliar ligado. Polio y cols, (1993) evaluaron el efecto de la HTP y la edad sobre el estímulo adrenérgico evaluando la respuesta a noradrenalina, propranolol y nitroglicerina en ratas de 3 y de 9 meses de edad sometidas a una operación ficticia y en ratas con hipertensión portal. En el caso de la noradrenalina, los autores observaron que la presión portal fue significativamente más baja en las ratas ancianas que en las ratas jóvenes sometidas a una operación ficticia. En el caso del propranolol y nitroglicerina, observaron que la respuesta cardiovascular esplácnica y sistémica mediada por el sistema nervioso simpático está disminuida en las ratas de 9 meses, comprometiendo por tanto los efectos hipotensores portales de estos fármacos. El propranolol redujo significativamente la frecuencia cardiaca con 2 y 10 mg/kg peso; pero cuando se aumentó la dosis, los animales mostraron bradicardia y este efecto fue especialmente llamativo en las ratas de 9 meses de edad. En conejos con hipertensión portal prehepática, se ha observado que la actividad basal de la AC era más baja en arteria mesentérica superior (22-26%) y en membranas de aorta torácica (31-46%) que en conejos sin HTP, pero mayor en vena portal (178-321%) (Cahill y cols, 1994). Estos resultados serían compatibles con lo observado en pacientes cirróticos donde se ha visto que las arterias hepáticas libres de endotelio obtenidas tras un trasplante son hiporeactivas a los agonistas  $\alpha_1$  y  $\beta_2$  mientras que las venas portales son hiporeactivas a  $\alpha_1$  pero hiperreactivas a agonistas  $\beta_2$  adrenérgicos (Heller y cols, 1999).

Algunos autores proponen como hipótesis para explicar esta respuesta vascular atenuada, un defecto en el mecanismo de transducción de la señal del receptor (Murray y Paller, 1985). Bomzon y cols, (1987) proporcionaron un soporte mayor para un defecto post-receptor como base de la respuesta vascular atenuada en HTP. Utilizando segmentos de aorta preparados de un modelo de rata de HTP, mostraron que la respuesta vascular a NA está asociada con el desarrollo de una incapacidad dependiente

del tiempo para movilizar  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Estos autores observaron que la reactividad vascular a noradrenalina estaba disminuida en el grupo de ratas con estenosis de la vena porta parcial en comparación con el grupo control. En contraste, se ha observado normorespuesta vascular in vivo en perros con HTP y cirrosis (Bomzon y cols, 1993) y en ratas (Bomzon y cols, 1992), así como in vitro, utilizando vesículas sanguíneas aisladas de diferentes modelos de cirrosis y/o HTP (Bomzon y cols, 1991; Lee y cols, 1995). Por tanto, la incapacidad del isoproterenol para producir activación en la señal de AMPc en pacientes del grupo de profilaxis secundaria puede ser consecuencia de cambios adaptativos en la producción de AMPc después de una activación continuada por agonistas tal y como se ha descrito en ratas (Bomzon y cols, 2001).

En otro tipo de enfermedades como patologías cardíacas, está bien documentado que el incremento en la actividad de la AC debido a la infusión de isoproterenol también está disminuido (Bristow y cols, 1989) y que la actividad de la AC está significativamente reducida (Brodde y cols, 1998). Se cree que en este fenómeno están implicados procesos de down-regulation de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos y desacoplamiento, así como incrementos en la expresión de  $G_i$  o defectos de la unidad catalítica enzimática (Dzimiri y cols, 1999). Las observaciones de down-regulation prolongada y descenso de la respuesta de la AC a la estimulación por agonistas en células aisladas sugieren que la reducción en la actividad enzimática es debida a una adaptación al incremento mantenido en la exposición a la estimulación adrenérgica (Dzimiri y cols, 1999). También se ha descrito una reducción en la actividad de la AC cuando es estimulada por isoproterenol pero sin cambios en el número de  $\beta$ -adrenoceptores en pacientes con hipertensión arterial (Dzimiri y cols, 1999) una situación asociada a un estado hiperadrenérgico crónico con niveles elevados de catecolaminas plasmáticas y de AMPc (Mills y cols, 1994). En concordancia con esto, Thornton y cols, (1988) han descrito que los pacientes con sangrado por varices esofágicas reciente poseen niveles elevados de adrenalina, noradrenalina y metionina.

Autores como Schepke y cols, (2001) después de realizar un estudio con segmentos de arterias hepáticas de 32 pacientes con cirrosis postularon que la causa de hiporespuesta a algunos vasoconstrictores (angiotensina II) en la cirrosis parece ser debido a un fenómeno localizado en el receptor o en la interacción de la proteína G al receptor. En este sentido, Laurent y cols, (2001) utilizando un modelo de fallo biventricular en perros mostraron que la respuesta al isoproterenol estaba disminuida a pesar de que no había reducción en la densidad de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos ni en la generación de AMPc mediada por estos receptores en membranas derivadas de homogeneizados de cardiomiocitos alterados en comparación con cardiomiocitos sanos. La interpretación más simple de estos resultados fue que la respuesta contráctil reducida del isoproterenol estaba relacionada con alteraciones en los mecanismos de acoplamiento de excitación-contracción y con la maquinaria contráctil y, sería un mecanismo alternativo que podría estar implicado en la limitada respuesta funcional de los cardiomiocitos en respuesta a la estimulación  $\beta$ -adrenérgica. Nuestros resultados sugieren que los pacientes con cirrosis hepática y varices esofágicas podrían tener disminuida la capacidad funcional de los  $\beta$ -adrenoceptores, y que esta reducción en la capacidad funcional parece tener relación con los mecanismos asociados a la evolución de estos pacientes, de tal modo que aquellos cuyos cambios conducen al desarrollo de hemorragias presenta de modo paralelo una pérdida de capacidad de respuesta a los estímulos  $\beta$ -adrenérgicos. No obstante, los análisis realizados en este estudio no permiten definir cuales de estos cambios adaptativos se correlacionan o asocian con la pérdida de respuesta  $\beta$ -adrenérgica. En concordancia con estos trabajos, somos

conscientes de la necesidad de realizar nuevos estudios en los que se identifique el nivel en el que se producen dichos cambios (receptor, proteína G, AC).

Cuando se determinó la actividad de la AC después de la administración del bolus iv de propranolol, no se encontraron diferencias significativas en la actividad de la misma antes y después de la administración del bolus, ni en los pacientes de profilaxis primaria ni en los de secundaria. Dado que el comportamiento de las membranas de los pacientes ante el isoproterenol para ambos grupos de pacientes fue la misma que antes de la administración del bolus, no parece por tanto que el estrés agudo de la administración del bolus ni la dosis administrada de propranolol iv interfiera con la respuesta al agonista adrenérgico isoproterenol de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos.

Cuando se evaluó la actividad de la AC en el conjunto de pacientes estudiados tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral, se obtuvieron unos valores de actividad que no difieren de los datos medios obtenidos durante el estudio hemodinámico inicial. Este hecho sugiere que la administración prolongada de propranolol por vía oral no modifica la actividad de la AC. El análisis individualizado de estos cambios en cada paciente tampoco indicó diferencias relevantes después de 3 meses de tratamiento con propranolol oral.

Puesto que nuestros resultados apuntan a que la actividad basal de la AC en pacientes cirróticos con varices esofágicas e HTP es significativamente superior a la de controles sanos y ya que existen 2 tipos de comportamientos de este sistema ante un agonista  $\beta$ -adrenérgico en función de si el paciente pertenece al grupo de profilaxis primaria o secundaria, nos planteamos la posibilidad de que estos cambios se asociaran a otras manifestaciones del SNS. Para ello se estudiaron 2 factores hemodinámicos relacionados con la actividad del SNS. Por un lado, factores hemodinámicos como la presión arterial y la frecuencia cardiaca y por otro cuantificando la actividad de la DBH. En el primer caso, se observó que los valores de PA de los pacientes de profilaxis primaria no guardan correlación alguna con la actividad basal de la AC mientras que en el caso de los pacientes de profilaxis secundaria se observó que cuanto más bajas eran las cifras de PAS, mayor era la actividad basal de AC. Igualmente, con la frecuencia cardiaca se observó que no existía correlación alguna para los pacientes de profilaxis primaria mientras que en los de profilaxis secundaria cuanto menor era la frecuencia cardiaca, mayor era la actividad de la AC. De forma global se aprecia que los pacientes de profilaxis secundaria, que en su mayoría no responden al estímulo con isoproterenol, muestran valores de frecuencia cardiaca y presión arterial sistólica menores que los pacientes de profilaxis primaria, acordes con un estado más avanzado de la enfermedad, y estos cambios hemodinámicos se asocian a un estado basal de mayor actividad de la AC. Estos datos son sugestivos de que precisamente en los pacientes con mayor evolución de la enfermedad, se ha producido una pérdida de la capacidad funcional del receptor  $\beta$ . No conocemos cuál es el mecanismo preciso por el que se incrementa la actividad basal de la AC en los pacientes cirróticos comparado con controles pero probablemente esté directa o indirectamente relacionado con procesos de regulación hemodinámicos.

En nuestro trabajo también hemos evaluado las posibles correlaciones entre las variables clínicas y/o demográficas de los pacientes y los valores de AMPc que se cuantifican en situación basal, tras un estímulo con isoproterenol  $10^{-4}$  M, cuando se estudia la capacidad de estímulo por parte del isoproterenol y cuando se evalúa la capacidad de bloqueo por parte del propranolol. Durante el EH inicial se ha observado que existe una correlación significativa en los pacientes de profilaxis primaria entre la capacidad de incrementar la actividad de la AC por parte del isoproterenol y la toma o no de espirolactona en el mes previo al EH. Se ha descrito que la aldosterona, la cual

es inhibida a nivel del receptor de manera competitiva, estereoespecífica y reversible por la espironolactona, es capaz de inducir un incremento en la actividad de la AC en células de la musculatura lisa vascular (Christ y cols, 1999) pero desconocemos por qué los pacientes que han recibido espironolactona en el mes previo son los que más incrementan la actividad de la AC ante un estímulo con isoproterenol. Una posibilidad es que la aldosterona, con la retención de  $\text{Na}^+$  y líquido que produce, origine un deterioro hemodinámico favoreciendo de forma refleja la activación del SNS con la consiguiente vasoconstricción esplácnica, liberación de catecolaminas y por tanto la puesta en marcha de procesos de down-regulation. La espironolactona por tanto, actuaría inhibiendo esta down-regulation de manera que aquellos pacientes que habían tomado espironolactona en el mes previo tendrían más capacidad para incrementar la actividad de la AC tras un estímulo con isoproterenol.

En los pacientes en profilaxis secundaria, las correlaciones que se han observado tienen que ver más con parámetros hemodinámicos como PAS, FC, PAM, etc. Estos hechos, a pesar del escaso tamaño muestral, estarían de acuerdo con los de Gines y cols, 1993; Bataller y cols, 1997, puesto que en pacientes con cirrosis la existencia de alteraciones severas en la circulación sistémica se traducen en valores bajos de presión arterial y una marcada activación de los sistemas vasoconstrictores. En nuestro trabajo los pacientes con sangrado por varices reciente son los que presentaban presiones arteriales sistólicas menores, valores más elevados de AMPc e incapacidad para responder al isoproterenol.

En relación al EH después de la administración del bolus iv de propranolol, hemos observado que en el grupo de pacientes cirróticos evaluados en su conjunto existen correlaciones relevantes entre la actividad de la AC basal con variables como la edad, PE, PL y espironolactona en el mes previo al EH. De manera que, aquellos pacientes de edad más avanzada (corresponden fundamentalmente al grupo de profilaxis secundaria) presentan niveles más altos de AMPc. También es importante destacar que aquellos pacientes con valores elevados de AMPc poseen presiones enclavadas y libres bajas. En los pacientes de profilaxis primaria, se han observado diferentes correlaciones significativas pero destaca especialmente el hecho de los pacientes en los que la disminución en la presión libre es mayor, muestran una capacidad mayor del propranolol de bloquear el estímulo del receptor  $\beta$  ejercido por el isoproterenol. Por otra parte, en el caso de los pacientes de profilaxis secundaria, se han encontrado correlaciones relevantes entre el grado de bloqueo in vitro del estímulo  $\beta$  por el propranolol y las variaciones en la PE y la PAD observadas en los pacientes tras el bolus iv de propranolol. Consideramos relevante el hecho de que la capacidad del propranolol de actuar como antagonista en nuestro sistema experimental in vitro se relacione con la capacidad del propranolol por vía iv in vivo para reducir las cifras de PL y/o PE. El verdadero significado y utilidad clínica de este hallazgo exige estudios diferentes a nivel clínico y farmacodinámicos (capacidad de reversión del antagonista por concentraciones crecientes de isoproterenol, cambios hemodinámicos con dosis distintas de propranolol...).

Respecto a los resultados del EH crónico, no se han observado cambios en la respuesta del sistema de la AC en comparación con lo observado durante el EH inicial lo que se asemeja a la respuesta clínica que tampoco difiere. Parece que existe un paralelismo entre la evolución clínica, el grado de evolución hemodinámica y el comportamiento de nuestro sistema experimental.

La otra forma de estudiar modificaciones del SNS fue mediante la cuantificación de la actividad de la DBH sérica puesto que, como numerosos autores han propuesto, es un indicador más estable y a más largo plazo de la actividad simpática que la



cuantificación de catecolaminas (Geffen, 1974; Schanberg, 1976). Para ello, cuantificamos la actividad de la DBH en pacientes cirróticos y la comparamos con un grupo control de voluntarios sanos. Los resultados obtenidos son discrepantes con los escasos datos disponibles hasta la fecha en este campo con este tipo de pacientes cirróticos, ya que Rabinowitz y cols (1979) encontraron que la actividad de la DBH no estaba elevada de forma significativa en los pacientes con daño hepático en comparación con los controles. Sin embargo, nuestros experimentos sugieren que la actividad de la DBH en los pacientes cirróticos con hipertensión portal y varices esofágicas es significativamente menor que la de los voluntarios sanos. La diferencia con el otro estudio radica en que en nuestro estudio los pacientes cirróticos presentan HTP y en el otro seguramente no. Por otro lado, nuestros resultados de actividad de la DBH en voluntarios sanos están en perfecta concordancia con los descritos en la literatura (Weinshilboum, 1978).

Se observó que existía una correlación entre los niveles de AMPc basales, tras el estímulo con isoproterenol y tras el bloqueo con propranolol, y la actividad de la DBH, puesto que en las 3 situaciones, cuanto más elevado era el valor de AMPc, menor era la actividad de la DBH sérica, y viceversa, aunque en ninguno de los casos llegaron a ser significativas estas correlaciones. Igualmente, hemos observado que los pacientes en los que no se incrementa la producción de AMPc tras el estímulo con isoproterenol, poseen valores bajos de actividad de DBH mientras que los pacientes que sí responden al estímulo beta tienen valores más altos de DBH. Estos datos sugieren que de la misma manera que se producen cambios a nivel del receptor  $\beta$  en estos pacientes, se producen cambios a otros marcadores del SNS como es el caso de la actividad sérica de DBH.

En conclusión, en este estudio se describe por primera vez la existencia de cambios en la funcionalidad de los  $\beta$ -adrenoreceptores y el sistema receptor-proteína G-AC en los pacientes cirróticos con HTP, dependientes del grado de evolución de la enfermedad. Existe un patrón de comportamiento diferente en los pacientes de profilaxis primaria y los de secundaria en cuanto a respuesta a isoproterenol se refiere. Las correlaciones encontradas en los pacientes son sugestivas de una posible evolución paralela entre los cambios en la actividad de la AC en hematíes maduros y los cambios hemodinámicos que sufren los pacientes con HTP. Serían necesarios estudios futuros con el fin de determinar en primer lugar si la técnica utilizada posee un valor diagnóstico o pronóstico para la evaluación de la situación hemodinámica del paciente y su evolución clínica; si son extrapolables los cambios observados en las membranas de los hematíes a la pared vascular de los pacientes cirróticos; cuál es la estructura molecular implicada en las alteraciones observadas (receptor, proteína G, AC) y por último y más importante, conocer cuál sería el mecanismo fisiopatológico por el que se originan todos los cambios observados.



## **CONCLUSIONES**

---

1. La actividad funcional de la AC en membranas de eritrocitos maduros de pacientes cirróticos con varices esofágicas e hipertensión portal es significativamente superior a lo observado en voluntarios sanos.
2. Los valores basales de producción de AMPc por parte de la AC son similares entre los pacientes de profilaxis primaria y secundaria y significativamente superior a los controles.
3. No existen cambios en la actividad de la AC inducidos por el episodio de sangrado agudo y el tratamiento del mismo.
4. El patrón de respuesta ante un agonista  $\beta$  adrenérgico como el isoproterenol en los pacientes de profilaxis primaria es similar al de los voluntarios sanos y totalmente diferente al de los pacientes de profilaxis secundaria.
5. Los pacientes de profilaxis secundaria no responden a un estímulo adrenérgico con isoproterenol.
6. La administración iv de propranolol, no modifica la actividad de la AC.
7. La actividad de la AC en el conjunto de pacientes estudiados tras 3 meses de tratamiento con propranolol oral, no difiere significativamente de lo obtenido durante el estudio hemodinámico inicial.
8. La actividad de la DBH sérica es significativamente inferior en los pacientes cirróticos con HTP que en los sanos.





## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- Abraham G., Broddet O.E., Ungemach F.R.: "Identification and characterization of beta-adrenoceptors on intact equine peripheral blood lymphocytes with the radioligand (-)-(<sup>125</sup>I)-iodocyanopindolol". *Equine. Vet. J.*, 2001; 33 (5): 487-93.
- Abraham G., Kottke C., Dhein S., Ungemach F.R.: "Pharmacological and biochemical characterization of the beta-adrenergic signal transduction pathway in different segments of the respiratory tract". *Biochem. Pharmacol.*, 2003; 66 (6): 1067-81.
- Ahlquist R.F.: "A study of the adrenotropic receptors". *Am. J. Physiol.*, 1948; 153: 586-600.
- Albano J.D.N., Mendsley D.V., Brown B.L., Bames G.D.: "A simplified procedure for the determination of adenylate-cyclase activity". 534<sup>th</sup> Meeting Nottingham. *Biochem. Society Transactions*, 1973; I: 477-479.
- Albillos A., García-Pagán J.C., Iborra J.: "Propranolol plus prazosin compared to propranolol plus isosorbide-5-mononitrate in the chronic treatment of portal hypertension". *Gastroenterol.*, 1998; 115: 116-123.
- Albillos A., Lledó J.L., Bañares R.: "Hemodynamic effects of alpha-adrenergic blockade with prazosin in cirrhotic patients with portal hypertension". *Hepatol.*, 1994; 20: 611-7.
- Albillos A., Lledó J.L., Rossi I.: "Continuous prazosin administration in cirrhotic patients: effects on portal hemodynamics and on liver and renal function". *Gastroenterol.*, 1995; 109: 1257-65.
- Albillos A., Pérez-Paramo M.: "Accuracy of portal and forearm blood flow measurements in the assesment of the portal pressure response to propranolol". *J. Hepatol.*, 1997; 27: 496-504.
- Angélico M., Carli L., Piat C.: "Effects if isosorbide-5-mononitrate compared with propranolol on first bleeding and long-term survival in cirrhosis". *Gastroenterol.*, 1997; 113: 1794-1797.
- Angelico M., Carli L., Piat C.: "Isosorbide-5-monitrate versus propranolol in the prevention of first bleeding in cirrhosis". *Gastroenterol.*, 1993; 104: 1460-1465.
- Aquilar F., Harris C.C., Sun T., Hollstein M., Cerrutti P.: "Geographic variation of p53 mutational profile in non-malignant human liver". *Science*, 1994; 264: 1317-9.
- Arch J.R.S., Ainsworth A.T., Cawthorne M.A., Piercy V., Sennitt M.V., Wilson S.: "Atypical  $\beta$ -adrenoceptor on brown adipocytes for anti-obesity drugs". *Nature*, 1984; 309: 163-5.
- Arnaiz J.M., García A.G., Horga J.F., Kirpekar S.M.: "Tissue and plasma catecholamines and dopamine  $\beta$ -hydroxylase activity of various animal species after neurogenic sympathetic stimulation". *J. Physiol.*, 1978; 285: 515-29.
- Arroyo V., Planas R., Gaya J., Deulofeu R., Rivera F.: "Sympathetic activity, renin-angiotensin system and renal excretion of prostaglandin E2 in cirrhosis: relationship to functional renal failure and sodium and water excretion". *Eur. J. Clin. Invest.*, 1983; 13: 271-278.
- Arthur M.J., Tanner A.R., Patel C., Wright R., Renwick A.G., George C.F.: "Pharmacology of propranolol in patients with cirrhosis and portal hypertension". *Gut*, 1985; 26: 14-19.
- Atlas D., Volsky D.J., Levitzki A.: "Lateral mobility of beta-receptors involved in adenylate cyclase activation". *Biochem. Biophys. Acta.*, 1980; 597 (1): 64-9.
- Banerji T.K., Quay W.B.: "Twenty-four hour rhythm in plasma dopamine-beta-hydroxylase activity. Evidence of age and strain difference and an adrenomedullary contribution". *Chronobiologia Supp I*, 1975; 1: 299-304.

- Bataller R., Gines P., Guevara M., Arroyo V.: "Hepatorrenal syndrome". *Semin. Liver. Dis.*, 1997; 17 (3): 233-47.
- Bathal P.S., Grossman H.J.: "Reduction of the increased portal vascular resistance of the isolated perfused cirrhotic rat liver by vasodilators". *J. Hepatol.*, 1985; 1: 325-9.
- Beavo J.A.: "Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms". *Physiol. Rev.*, 1995; 75: 725-748.
- Bendtsen F., Christensen N.J., Sörensen T.I.A., Henriksen J.H.: "Effect of oral propranolol administration on azygos, renal and hepatic uptake and output of catecholamines in cirrhosis". *Hepatol.*, 1991; 14: 237-43.
- Bendtsen F., Henriksen J.H., Sörensen T.I.A., Christensen N.J.: "Effect of oral propranolol on circulating catecholamines in cirrhosis: relationship with severity of liver disease and splanchnic hemodynamics". *J. Hepatol.*, 1990; 10: 198-204.
- Benoit J.N., Granger N.: "Splanchnic hemodynamics in chronic portal hypertension". *Semin. Liver. Dis.*, 1986; 6: 287-298.
- Benoit J.N., Womack W.A., Hernández L., Granger D.N.: "Forward and backward flow mechanisms of portal hypertension: relative contributions in the rat model of portal vein stenosis". *Gastroenterol.*, 1985; 89: 1092-6.
- Bercoff E., Bataille C., Pariente A.E., Valla D., Delhotal B., Lebrec D.: "Assesment of beta-adrenergic blockade with propranolol in patients with cirrhosis". *Hepatol.*, 1984; 4 (3): 451-3.
- Bernard B., Lebrec D., Mathurin P., Opolon P., Poynard T.: "Beta-adrenergic antagonists in the prevention of gastrointestinal rebleeding in patients with cirrhosis: a meta-analysis". *Hepatol.*, 1997A; 25: 63-70.
- Bernard B., Lebrec D., Mathurin P., Opolon P., Poynard T.: "Propranolol and sclerotherapy in the prevention of gastrointestinal rebleeding in patients with cirrhosis: a meta-analysis". *J. Hepatol.*, 1997B; 26: 312-24.
- Bernardi M., Calandrea S., Colantoni A., Trevisani F., Raimondo M.L., Schepis F., Mandini M., Simoni P., Contin M., Raimondo G.: "Q-T interval prolongation in cirrhosis: prevalence, relationship with severity, and etiology of the disease and possible pathogenetic factors". *Hepatol.*, 1998 Jan; 27 (1): 28-34.
- Bernardi M., Trevisani F., Santini C.: "Plasma norepinephrine, weak neurotransmitters, and renin activity during active tilting in liver cirrhosis: relationship with cardiovascular homeostasis and renal function". *Hepatol.*, 1983; 3: 56-64.
- Bichet D., Szatalowicz V., Chaimovitz C., Schrier R.W.: "Role of vasopressin in abnormal water excretion in cirrhotic patients". *Ann. Intern. Med.*, 1982A; 96: 413-7.
- Bichet D.G., Van Putten V.J., Schrier R.W.: "Potential role of increased sympathetic activity in impaired sodium and water excretion in cirrhosis". *N. Engl. J. Med.*, 1982B; 307: 1552-7.
- Bierbrier G.S., Adams P.C., Feldman R.D.: "Vascular alpha-adrenergic responsiveness is reduced in cirrhosis". *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1994 Dec; 56 (6 Pt 1): 668-71.
- Bilski A., Dorries S., Fitzgerald J., Jessup R., Tucker H., Wale J.: "ICI 118551, a potent beta-2-adrenoceptor antagonist". *Br. J. Pharmacol.*, 1980; 69: 292P-293P.
- Binmoeller K.F., Borsatto R.: "Variceal bleeding and portal hypertension". *Endoscopy*, 2000; 32 (3): 189-199.

- Birnbaumer L., Rodbell M.: "Adenyl cyclase in fat cells. II. Hormone receptors". *J. Biol. Chem.*, 1969; 244: 3477-82.
- Black J.W., Crowther A.F., Shanks R.G., Smith L.H., Dornhorst A.C.: "A new adrenergic beta-receptor antagonist". *Lancet*, 1964 I: 1080-1.
- Bockaert J., Cantau B., Sebben-Perez M.: "Hormonal inhibition of adenylate cyclase. A crucial role for  $Mg^{2+}$ ". *Mol. Pharmacol.*, 1984; 26: 180-6.
- Böhm S., Grady E.F., Bunnett N.W.: "Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors". *Biochem. J.*, 1997; 322: 1-18.
- Bojanic D., Jansen J.D., Nahorski S.R., Zaagsma J.: "Atypical characterization of the  $\beta$ -adrenoceptor mediating cAMP generation lipolysis in the rat adipocyte". *Br. J. Pharmacol.*, 1985; 84: 131-7.
- Bomzon A., Blendis L.M.: "Vascular reactivity in experimental portal hypertension". *Am. J. Physiol.*, 1987; 252: G158-G162.
- Bomzon A., Binab O., Blendis L.M.: "Hypotension in experimental cirrhosis. Is loss of vascular responsiveness to norepinephrine the cause of hypotension in chronic bile-duct-ligated dogs". *J. Hepatol.*, 1993; 17: 116-123.
- Bomzon A., Huang Y.T.: "Vascular smooth muscle cell signalling in cirrhosis and portal hypertension". *Pharmacol. Ther.*, 2001; 89: 255-272.
- Bomzon A., Jacob G., Lee S., Meddings J.: "In vitro vascular responsiveness to norepinephrine in experimental portal hypertension". *Clin. Invest. Med.*, 1991; 14: 63-71.
- Bomzon A., Weinbroum A., Blendis L.M.: "Pressor response to a postural change in cirrhosis: an experimental study in the  $CCl_4$ -treated rat". *Clin. Sci.*, 1992; 82: 147-156.
- Bomzon L., Wilton P.B., McCalden T.A.: "Impaired skeletal muscle vasomotor response to infused noradrenaline in baboons with obstructive jaundice". *Clin. Sci. Mol. Med.*, 1978; 55: 109-112.
- Bosch J., García-Pagán J.C.: "Complications of cirrhosis I. Portal hypertension". *J. Hepatol.*, 2000; 32 (suppl 1): 141-156.
- Bosch J., Bordas J.M., Mastai R., Kravetz D., Bruix J., Rigau J., Rodés J.: "Measurement of azygos venous blood flow in the evaluation of portal hypertension in patients with cirrhosis. Clinical and haemodynamic correlations in 100 patients". *J. Hepatol.*, 1985; 1: 125-39.
- Bosch J., García-Pagán J.C., Feu F., Luca A., Fernández M., Pizcueta P., Rodés J.: "New approaches in the pharmacologic treatment of portal hypertension". *J. Hepatol.*, 1993; 17 (suppl 2): 41-5.
- Bosch J., Mastai R., Kravetz D., Bruix J., Gaya J., Rigau J.: "Effects of Propranolol on azygos venous blood flow and hepatic and systemic hemodynamics in cirrhosis". *Hepatol.*, 1984; 4: 1200-5.
- Bosch X., Ribes J., Borrás J.: "Epidemiology of primary liver cancer". *Sem. Liver. Dis.*, 1999; 19: 271-85.
- Bradford M.: "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Anal. Biochem.*, 1976; 72: 248-254.
- Braillon A., Gaudin C., Poo J.L., Moreau R., Debaene B., Lebrec D.: "Plasma catecholamines concentrations are a reliable index of sympathetic vascular tone in patients with cirrhosis". *Hepatol.*, 1992; 15: 58-62.
- Braun S., Arad H., Levitzki I.: "The interaction of  $Mn^{2+}$  with turkey erythrocyte adenylate cyclase". *Biochem. Biophys. Acta.*, 1982; 705: 55-62.

- Bree F., Gault I., D'Athis P., Tillement J.P.: "Beta adrenoceptors of human red blood cells, determination of their subtypes". *Bioch. Pharma.*, 1984; 33: 4045-50.
- Bristow M.R., Hersbberger R.E., Port J.D., Minobe W., Rasmussen R.: " $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenergic receptor-mediated adenylate cyclase stimulation in nonfailing and failing human ventricular myocardium". *Mol. Pharmacol.*, 1989; 35: 295-303.
- Brodde O.E., Beckeringh J.J., Michel M.C.: "Human heart  $\beta$ -adrenoceptors: a fair comparison with lymphocyte  $\beta$ -adrenoceptors?". *Trends. Pharmacol. Sci.*, 1987; 8: 403-7.
- Brodde O.E., Engel G., Hoyer D., Bock K.D., Weber F.: "The  $\beta$ -adrenergic receptor in human lymphocytes: subclassification by the use of a new radioligand, (+/-)-125 iodocyanopindolol". *Life. Sci.*, 1981; 29: 2189-98.
- Brodde O.E., Voglesang M., Broede A., Michel-Reher M., Beisenbusch-Schafer E., Hakin K., Zerkowski H.R.: "Diminished responsiveness of Gs-coupled receptors in severely failing human hearts: no difference in dilated versus ischemic cardiomyopathy". *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 1998; 31: 585-94.
- Brodde O.E.: "Beta-adrenoceptors in cardiac disease". *Pharmacol. Ther.*, 1993 Dec; 60 (3): 405-30.
- Brown J.N., Makman M.N.: "Stimulation by dopamine of adenylate cyclase in retinal homogenates and of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate formation in intact retina". *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1972; 69: 539-43.
- Bruck H., Leineweber K., Beilfuß A., Weber M., Heusch G., Philipp T., Brodde O.E.: "Genotype-dependent time course of lymphocyte  $\beta_2$ -adrenergic receptor down-regulation". *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2003; 74: 255-63.
- Bruix J., Bosch J., Kravetz D., Mastai R., Rodés J.: "Effects of prostaglandin inhibition on systemic and hepatic hemodynamics in patients with cirrhosis of the liver". *Gastroenterol.*, 1985; 88: 430-5.
- Bryan L.J., Cole J.J., O'Donnell S.R., Wanstall J.C.: "A study designed to explore the hypothesis that beta-1 adrenoceptors are "innervated" receptors and beta-2 adrenoceptors are "hormonal" receptors". *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1981; 216: 395-400.
- Bureau C., Peron J.M., Alric L., Morales J., Sanchez J., Barange K., Payen J.L.: "A la carte" treatment of portal hypertension: adapting medical therapy to hemodynamic response for the prevention of bleeding". *Hepatol.*, 2002; 36: 1361-66.
- Burghardt W., Werne H., Schaffrath I.: "Changes of circulating noradrenaline and adrenaline in hepatic cirrhosis: relation to stage of disease, liver and renal function". *Acta. Endocrinol.*, 1982; 99 (suppl 246): 100-101.
- Burroughs A.K., Bosch J.: "Clinical manifestations and management of bleeding episodes in cirrhotics". McIntyre N, Benhamou JP, Bircher J, Rizzeto M, Rodés J, eds. *Oxford Textbook of Clinical Hepatology*. Oxford University Press, 1991: 408-425.
- Burroughs A.K., McCormick P.A.: "Natural history and prognosis of variceal bleeding". *Baillieres. Clin. Gastroenterol.*, 1992; 6: 437-450.
- Büscher R., Herrmann V., Ring K.M., Kailasam M.T., O'Connor D.T., Parmer R.J., Insel P.A.: "Variability in phenylephrine response and essential hypertension: a search for human  $\alpha_1b$ -adrenergic receptor polymorphisms". *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1999, 291; 2: 793-798.



- Bylund D.B., Eikenberg D.C., Hieble J.P., Langer S.Z., Lefkowitz R.J., Minneman KP, Molinoff PB, Ruffolo JR y Trendelenburg U. *Pharmacological Reviews*, 1994; 46 (2): 121-136.
- Cahill P.A., Redmond F.M., Sitzman J.V.: "Endothelial dysfunction in cirrhosis and portal hypertension". *Pharmacol. Ther.*, 2001; 89: 273-293.
- Cahill P.A., Wu Y., Sitzmann J.V.: "Altered adenylyl cyclase activities and G-protein abnormalities in portal hypertensive rabbits". *J. Clin. Invest.*, 1994; 93: 2691-700.
- Cahill P.A.: "Vasoconstrictor responsiveness of portal hypertensive vessels". *Clin. Sci.*, 1999; 96: 3-4.
- Cales P., Caillau H., Crambes O., Vinel J.P., Desmorat H., Rocher I., Brouard R., Pascal J.P.: "Hemodynamic and pharmacokinetic study of tertatolol in patients with alcoholic cirrhosis and portal hypertension". *J. Hepatol.*, 1993 Aug; 19 (1): 43-50.
- Cales P., Desmorat H., Vinel J.P., Caucanas J.P., Ravaud A., Gerin P.: "Incidence of large oesophageal varices in patients with cirrhosis: application to prophylaxis of first bleeding". *Gut*, 1990; 31: 1298-1302.
- Cales P., Grasset D., Ravaud A., Meskens C., Blanc M., Vinel J.P., Cotonat J., Pascal J.P.: "Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of propranolol in patients with cirrhosis and portal hypertension". *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1989; 27: 763-770.
- Carman Krzan M.: "Reagents for catecholamines receptor studies". *Trends. Pharmacol. Sci.*, 1983: 477-80.
- Casado M., Bosch J., García-Pagán J.C.: "Clinical events after transjugular intrahepatic portosystemic shunt: correlation with hemodynamic findings". *Gastroenterol.*, 1998; 114: 1296-1303.
- Caujolle B., Ballet F., Poupon R.: "Relationship among beta-adrenergic blockade, propranolol concentration, and liver function in patients with cirrhosis". *Scand. J. Gastroenterol.*, 1988; 23 (8): 925-30.
- Cerione R.A., Strulovici B., Lefkowitz R.J.: "Pure beta-adrenergic receptor: the single polypeptide confers catecholamines responsiveness to adenylate cyclase". *Nature*, 1983; 306: 562-6.
- Cheng J.W., Zhu L., Gu M.J., Song Z.M.: "Meta analysis of propranolol effects on gastrointestinal hemorrhage in cirrhotic patients". *Worl. J. Gastroenterol.*, 2003; 9 (8): 1836-9.
- Cherskey B.: "Beta-adrenergic receptors: new methods –new insights-". *Proc. Int. Soc. For Eye Research III*, 1984; p-3, pag 61.
- Christ M., Gunther A., Heck M., Schmidt B.M., Falkenstein E., Wehling M.: "Aldosterone, not estradiol, is the physiological agonist for rapid increases in cAMP in vascular smooth muscle cells". *Circulation.*, 1999 Mar 23; 99 (11):1485-91.
- Christensen E., Faverholdt L., Schlichting P.: "Aspects of natural history of gastrointestinal bleeding in cirrhosis and the effect of prednisolone". *Gastroenterol.*, 1980B; 79: 1139-1144.
- Christensen N.J., Brandsborg O., Lovgreen N.A., Brandsborg M.: "Elevated plasma noradrenaline concentration in duodenal ulcer patients are not normalized by vagotomy". *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 1979; 49: 331-4.
- Christensen N.J.: "Adrenergic mechanisms in selected diseases: arterial hypertension, duodenal ulcer, primary depressive illness, malignant tumors, and ketotic hypoglycemia". *Metabolism.*, 1980A; 29 (11): 1190-1197.

- Chuang T.T., Lacovelli L., Sallèse, De Blasi A.: "G-protein-coupled receptors: heterologous regulation of homologous desensitization and its implications". *TIPS*, 1996; 17: 416-421.
- Chung R.T., Podolsky D.K.: "Enfermedades del aparato digestivo". En "Principios de Medicina Interna", editor: Harrison, 15ª edición, Madrid, 2001, página: 2050-7.
- Clapham D.E., Neer E.J.: "G protein beta gamma subunits". *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1997; 37: 167-203.
- Coelho L., Saraiva S., Guimaraes H., Freitas D., Providencia L.A.: "Autonomic function in chronic liver disease" assessed by Heart Rate Variability Study. *Rev Port. Cardiol.*, 2001 Jan; 20 (1): 25-36.
- Colombato L.A., Albillos A., Genecin P., Sarin S., Groszmann R.J.: "Prevention of portal-systemic shunt in propranolol treated and in sodium restricted cirrhotic rats (abstr)". *Gastroenterol.*, 1991; 100: A713.
- Colquhoun D.: "The relationship between classical and cooperative models for drug action". In: H.P. Rand (ed) *Drug receptors*, Macmillan, London, 1973.
- Cookson D.Y., Red C.E.: "A comparison of the effects of isoproterenol in the normal and asthmatic subject. A preliminary report". *Am. Rev. Resp. Dis.*, 1963; 88: 636-43.
- Cortelli P., Lugaresi A., Contin E.: "Cardiovascular reflexes in migraine patients during and out of migraine attack". *Cephalalgia*, 1987; 7: 289-90.
- Craig S.P., Buckle V.J., Lamoroux A., Mallet J., Craig I.W.: "Localization of the human dopamine-beta-hydroxylase (DBH) gene to the chromosome 9q34". *Cytogenet. Cell. Genet.*, 1988; 48: 48-50.
- Cryer P.E.: "Physiology and pathophysiology of the human sympatho-adrenal neuroendocrine system". *N. Engl. J. Med.*, 1980; 303: 436-44.
- Cubeddu L., Santiago X.E., Pinarði G.: "Adrenal origin of the increase in plasma dopamine-beta-hydroxylase and catecholamines induces by hemorrhagic hypertension in dogs". *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1977; 203: 587-597.
- Cubells J.F., van Kammen D.P., Kelley M.E., Anderson G.M., O'Connor D.T., Price L.H., Malison R., Rao P.A., Kobayashi K., Nagatsu T., Gelernter J.: "Dopamine beta-hydroxylase: two polymorphisms in linkage disequilibrium at structural gene DBH associate with biochemical phenotypic variation". *Hum. Genet.*, 1998; 102: 533-540.
- D'Amico G., Pagliaro L., Bosch J.: "Pharmacological treatment of portal hypertension: an evidence-based approach". *Semin. Liver. Dis.*, 1999; 19: 475-505.
- D'Amico G., Pagliaro L., Bosch J.: "The treatment of portal hypertension. A meta-analytic review". *Hepatology*, 1995; 22: 332-354.
- D'Amico G., Luca A.: "Natural history. Clinical-haemodynamic correlations. Prediction of the risk of bleeding". *Bailliere's. Clin.Gastroenterol.*, 1997; 11: 243-256.
- Dale H.H.: "On some physiological actions of ergot". *J. Physiol. (Lond.)*, 1906; 34: 163-206.
- Davies C.H., Ferrara N., Harding S.E.: "Beta-adrenoceptor function changes with age of subject in myocytes from non-failing human ventricle". *Cardiovascular. Res.*, 1996; 31 (1): 152-6.
- Davis P.B., Braunstein M., Jay C.: "Decreased adenosine 3',5'-monophosphate response to isoproterenol in cystic fibrosis leukocytes". *Pediatr. Res.*, 1978; 12: 703-7.

- Davoren P.R., Sutherland W.: "Cellular localization of adenylyl cyclase in the pigeon erythrocyte". *J. Biol. Chem.*, 1963; 258: 3016-22.
- De Agustin J.C.: "Estudio de la adenilato ciclase acoplada al receptor  $\beta$ -adrenérgico en la célula sinovial humana". Tesis doctoral, 1989.
- De Lean A., Stadel J.M., Lefkowitz R.J.: "A ternary complex model explains the agonist specific binding properties of the adenylyl cyclase-coupled beta-adrenergic receptor". *J. Biol. Chem.*, 1980; 255: 7108-7117.
- De Pottter W.P., de Schaepdrlyver A.F., Moerman E.J., Smith AD.: "Evidence for the release of vesicle proteins together with noradrenaline upon stimulation of the splenic nerve". *J. Physiol.*, 1969; (London) 204: 102P-104P.
- Dillon J.F., Plevris J.N., Nolan J., Ewing D.J., Neilson J.M., Bouchier I.A., Hayes P.C.: "Autonomic function in cirrhosis assessed by cardiovascular reflex tests and 24-hour heart rate variability". *Am. J. Gastroenterol.*, 1994; 89 (9): 1544-7.
- Dinçer U.D., Bidasee K.R., Güner S., Özçelikay A.T., Altan V.M.: "The effect of diabetes on expression of  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -, and  $\beta_3$ - adrenoceptors in rat hearts". *Diabetes*, 2001; 50: 455-61.
- Dinçer U.D., Güner S., Tay A., Arioglu E., Tasdelen A., Aslamaci S., Bidasee K.R.: "Decreased expression of  $\beta_1$  and  $\beta_2$  -adrenoceptors in human diabetic atrial appendage". *Cardiovascular Diabetol.*, 2003; 2 (1): 6-16.
- Dishy V., Sofowora G.G., Xie H.G., Kim R.B., Byrne D.W., Stein C.M.: "The effect of common polymorphisms of the beta-2-adrenergic receptor on agonist-mediated vascular desensitisation". *N. Engl. J. Med.*, 2001; 345: 1030-5.
- Dixon R.A.F., Kobilda B.: "Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin". *Nature*, 1986; 321: 75-9.
- Dlusskaia I.G., Striuk R.I., Bobrovnikskii I.P.: "Indicator of adrenoceptors in cell membranes: reference values and informative validity in the assessment of the functional state of the cardiovascular system". *Aviakosm. Ekolog. Med.*, 1996; 30 (4): 46-51.
- Dubocovich M.L., Langer S.Z.: "Negative feed-back regulation of noradrenaline release by nerve stimulation in the perfused cat's spleen: differences in potency of phenoxybenzamine in blocking the pre- and post-synaptic adrenergic receptors". *J. Physiol.*, 1974; 237(3): 505-19.
- Duch D.S., Viveros O.H., Kirshner N.: "Endogenous inhibitors in adrenal medulla of dopamine beta-hydroxylase". *Biochem. Pharmacol.*, 1968; 17: 255-264.
- Dulis B.H., Wilson I.B.: "The beta-adrenergic receptor of live human polymorphonuclear leukocytes". *J. Biol. Chem.*, 1980 Feb 10; 255 (3): 1043-8
- Duncan G., Johnson R.H., Lambie D.G., Whiteside E.A.: "Evidence of vagal neuropathy in chronic alcoholics". *Lancet*, 1980; II; 1053-7.
- Dzimiri N.: "Regulation of  $\beta$ -adrenoceptor signalling in cardiac function and disease". *Pharmacol. Rev.*, 1999; 51 (3): 465-501.
- Eckstein F., Romaniuk P., Heideman W., Storm D.R.: "Stereochemistry of the Mammalian Cyclase Reaction". *J. Biol. Chem.*, 1981; 256: 9118-9120.
- Emorine L.J., Marullo S., Briend-Sutren M.M., Patey G., Tate K., Delavier-Klutchko C., Strosberg A.D.: "Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor". *Science*. 1989 Sep 8; 245 (4922):1118-21.
- Engelman K., Portnoy B., Sjoerdsma A.: "Plasma catecholamines concentrations in patients with hypertension". *Circ. Res.*, 1970; 26 and 27 (suppl 1): 141-5.

- Epstein M.: "The kidney in liver disease", 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Hanley & Belfus, Inc.; 1996.
- Escorsell A., Bordas J.M., Castañeda B., Llach J., Garcia-Pagan J.C., Rodes J., Bosch J.: "Predictive value of the variceal pressure response to continued pharmacological therapy in patients with cirrhosis and portal hypertension". *Hepatology*, 2000; 31: 1061-1067
- Escorsell A., Banares R., Gilabert R.: "Transjugular intrahepatic portosystemic shunt vs propranolol + isosorbide-monomonitrate for the prevention of variceal rebleeding in patients with cirrhosis. Results of a randomized controlled trial". *Hepatology*, 1998A; 28: 770A.
- Escorsell A., Castañeda B., Bordas J.M.: "Predictive value of the variceal pressure response to continued pharmacological therapy for portal hypertension in patients with cirrhosis". *Hepatology*, 1998B; 28: 771.
- Escorsell A., Ferayorni K., Bosch J., García-Pagán J.C., García-Tsao G., Grace N., Rodés J., Groszmann R.J.: "The portal pressure response to beta-blockade is greater in cirrhotic patients without varices than in those with varices". *Gastroenterology*, 1997; 112: 2012-6.
- Escorsell A., Feu F., Bordas J.M., García-Pagán J.C., Luca A., Bosch J., Rodés J.: "Effects of isosorbide-5-monomonitrate on variceal pressure and systemic and splanchnic haemodynamics in patients with cirrhosis". *J. Hepatology*, 1996; 24: 423-9.
- Evans W.E., McLeod H.L.: "Pharmacogenomics-drug disposition, drug targets, and side effects". *N. Engl. J. Med.*, 2003; 348: 538-549.
- Ewing D.J., Clarke B.F.: "Diabetic autonomic neuropathy: a clinical viewpoint". En: Dyck PJ. ed. *Diabetic Neuropathy*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1987; 66-88.
- Ewing D.J., Clarke B.F.: "Diagnosis and management of diabetic autonomic failure". *Br. Med. J.*, 1982; 285: 916-8.
- Farfel Z., Bourne H.R., Iiri T.: "The expanding spectrum of G protein diseases". *New. Eng. J. Med.*, 1999; 340 (13): 1012-1019.
- Feng H., Zhang Z., Leng X., Li S., Zhu J., Du R.: "Plasma level of glucagon in cirrhotic patients with portal hypertension during operation of portacaval shunts". *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*, 1999 Apr; 37 (4): 222-4.
- Ferrari R.: "The role of TNF in cardiovascular disease". *Pharmacol. Res.*, 1999; 40: 97-105.
- Feu F., Bordas J.M., García-Pagán J.C., Bosch J., Rodés J.: "Double-blind investigation of the effects of propranolol and placebo on the pressure of esophageal varices in patients with portal hypertension". *Hepatology*, 1991; 13: 917-922.
- Feu F., Bordas J.M., Luca A., García-Pagán J.C., Escorsell A., Bosch J., Rodés J.: "Reduction of variceal pressure by propranolol. Comparison of the effects on portal pressure and azygos blood flow in patients with cirrhosis". *Hepatology*, 1993; 18 (5): 1082-9.
- Feu F., García-Pagán J.C., Bosch J., Luca A., Teres J., Escorsell A., Rodés J.: "Relation between portal pressure response to pharmacotherapy and risk of recurrent variceal haemorrhage in patients with cirrhosis". *Lancet*, 1995; 346: 1056-1059.
- Fitzgerald D., Gumbrielle T., Harry J.: "Effects in man of ICI 118551 (a selective beta-2-adrenoceptor blocking drug) on some cardiovascular responses induced by isoprenaline". *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1982; 13: 586P.

- Flórez J.: “Acciones de los fármacos II. Mecanismos moleculares.” En “Farmacología Humana”, Masson, 4ª edición, 2003: página 34-47.
- Foldes A., Jeffrey P.L., Preston B.N., Austin L.: “Dopamine beta-hydroxylase of bovine adrenal medulla. A rapid purification procedure”. *Biochem. J.*, 1972; 126: 1209-17.
- Freedman S., Roffman M., Goldstein M., Fuxe K., Hokfelt T.: “Serum and tissue dopamine- $\beta$ -hydroxylase activity I hypophysectomized rats”. *Eur. J. Pharmacol.*, 1973; 51: 986-9.
- Friedman S., Kaufman S.: “3, 4-Dihydroxyphenylethylamine  $\beta$ -hydroxylase”. *J. Biol. Chem.*, 1965; 240: 4763-4773.
- Fritsche A., Stumvoll M., Häring HU., Gerich JE.: “Reversal of hypoglycemia unawareness in a long-term type 1 diabetic patient by improvement of  $\beta$ -adrenergic sensitivity after prevention of hypoglycemia”. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2000; 85: 523-5.
- Gabilondo A.M., Hegler J., Krasel C., Boivin-Jahns V., Hein L, Lohse M.J.: “A dileucine motif in the C terminus of the beta-2-adrenergic receptor is involved in receptor internalisation”. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 1997; Nov 11; 94 (23): 12285-90.
- Galas M.C., Harden T.K.: “Cyclic AMP-induced desensitization of G-protein-regulated phospholipase C in turkey erythrocyte membranes”. *Eur. J. Pharm.*, 1996; 314: 157-64.
- García-Pagán J.C., Escorsell A., Moitinho E., Bosch J.: “Influence of pharmacological agents on portal hemodynamics: basis for its use in treatment of portal hypertension”. *Sem. Liver. Dis.*, 1999; 19 (4): 427-438.
- García-Pagán J.C., Feu F., Bosch J., Rodés J.: “Propranolol compared with propranolol plus isosorbide-5-mononitrate for portal hypertension in cirrhosis: a randomised controlled study”. *Ann. Intern. Med.*, 1991; 114: 869-73.
- García-Pagán J.C., Morillas R., Bañares R., Albillos A., Villanueva C., Vila C., Genescà J., Jiménez M., Rodríguez M., Callejas J.L., Balanzó J., García-Durán F., Planas R., Bosch J. y el Grupo español para el estudio del sangrado por varices. “Propranolol plus placebo versus propranolol plus isosorbide-5-mononitrate in the prevention of a first variceal bleed: a double-blind RCT”. *Hepatology*, 2003; 37 (6): 1260-6.
- García-Pagán J.C., Navasa M., Bosch J., Bru C., Pizcueta M.P., Rodés J.: “Enhancement of portal pressure reduction by the association of isosorbide-5-mononitrate to propranolol administration in patients with cirrhosis”. *Hepatology*, 1990; 11: 230-8.
- García-Pagán J.C., Navasa M., Rivera F., Bosch J., Rodés J.: “Lymphocyte beta-2-adrenoceptors and plasma catecholamines in patients with cirrhosis. Relationship with the hemodynamic response to propranolol”. *Gastroenterol.*, 1992; 102: 2015-23.
- García-Pagán J.C., Salmeron J.M., Feu F., Luca A., Gines P., Pizcueta P., Claria J., Piera C., Arroyo V., Bosch J.: “Effects of low-sodium and spironolactone on portal pressure in patients with compensated cirrhosis”. *Hepatology*, 1994; 19: 1095-9.
- García-Sevilla J.A., Meana J.J.: En “Transmisión catecolaminérgica. Fármacos agonistas catecolaminérgicos”. Flórez J. 4ª edición. Editorial: Masson, Barcelona, 2003. Página: 260-71.
- García-Tsao G., Grace N.D., Groszmann R.J.: “Short-term effects of propranolol on portal venous pressure”. *Hepatology*, 1986; 6: 101-6.

- García-Tsao G., Groszmann R.J., Fisher R., Conn H.O., Atterbury C.E., Glickmann M.: "Portal pressure, presence of gastroesophageal varices and variceal bleeding". *Hepatology*, 1985; 5: 419-424.
- García-Tsao G.: "Portal hypertension and bleeding gastroesophageal varices". *Best practice of Medicine*. January 2000.
- Gaudin C., Braillon A., Moreau R., Roulot D., Bacq Y., Hadengue A., Lebrech D.: "Relation between plasma catecholamines, the severity of the liver disease and hemodynamics in patients with cirrhosis". *Gastroenterol. Clin. Biol.*, 1989; 13 (8-9): 701-6.
- Gauger D., Kaiser G., Quiring K., Palm D.: "The beta-adrenergic receptor-adenyl cyclase system of rat reticulocytes". *Naunyn-Schmid. Arch. Pharmacol.*, 1975; 289: 379-398.
- Geffen L.: "Serum dopamine beta-hydroxylase as an index of sympathetic function". *Life. Sci.*, 1974; 14 (9): 1593-1604.
- Geffen L.B., Livett B.G.: "Synaptic vesicles in sympathetic neurons". *Physiol. Rev.*, 1971; 51 (1): 98-157.
- Geiger J.: "Inhibitors of platelet signal transduction as anti-aggregatory drugs". *Expert. Opin. Investig. Drugs.*, 2001 May; 10 (5): 865-90.
- Gentilini P., Laffi G., La Villa G., Romanelli R.G., Buzzelli G., Casini-Raggi V.: "Long course and prognostic factors of virus-induced cirrhosis of the liver". *Am. J. Gastroenterol.*, 1997; 92 (1): 66-72.
- Geraghty J.G., Anderson W.J., Carter D.C.: "Portal venous pressure and portosystemic shunt in experimental portal hypertension". *Am. J. Physiol.*, 1989; 257: 652-7.
- Gerbes A.L., Gulberg V., Bilzer M.: "Endotelina and other mediators in the pathophysiology of portal hypertension". *Digestion.*, 1998; 59 (suppl.2): 8-10.
- Gerbes A.L., Remien J., Jüngst D., Sauerbruch T., Paumgartner G.: "Evidence for down-regulation of beta-2-adrenoceptors in cirrhotic patients with severe ascites". *Lancet.*, 1986; 1: 1409-1411.
- Gether U., Lin S., Ghanouni P., Ballesteros J.A., Weisntein H., Kobilka B.K.: "Agonists induce conformational changes in transmembrane domains III and VI of the  $\beta_2$  adrenoceptor". *The EMBO J.*, 1997; 16 (22): 6737-47.
- Geyer S.J., Schanberg S.M., Kirshner N.: "Turnover of dopamine-beta-hydroxylase in rat blood and lymph". In *Structure and function of monoamine enzymes*, ed. By E. Usdin, N. Weiner, and M.B.H Youdim, pp. 423-438, Marcel Dekker, Inc, New York, 1977.
- Ghanouni P., Steenhuis J.J., Farrens D., Kobilka B.K.: "Agonist-induced conformational changes in the G-protein-coupling domain of the  $\beta_2$  adrenergic receptor". *PNAS*, 2001; 98 (11): 5997-6002.
- Gilbert A., Villaret M.: "Contribution à l'étude du syndrome d'hypertension portale; cytologie des liquides d'ascite dans les cirrhoses". *Comptes Rendus Societe de Biologie*, 1906; 60: 820-823.
- Gilman A.G.: "Guanine nucleotide-binding regulatory proteins and dual control of adenylate-cyclase". *J. Clin. Invest.*, 1984; 73: 1-4.
- Ginés A., Escorsell A., Gines P., Salo J., Jimenez W., Inglada L.: "Incidence, predictive factors, and prognosis of the hepatorenal syndrome in cirrhosis with ascites". *Gastroenterol.*, 1993; 105: 229-36.
- Ginés P., Sort P.: "Pathophysiology of renal dysfunction in cirrhosis". *Digestion*, 1998; 59 (suppl 2): 11-15.

- Gisbert J.: “Efecto de los iones divalentes manganeso y calcio en la actividad del receptor beta-adrenérgico en hematíes humanos”. Tesina. Septiembre del 1987.
- Goldstein M., Freedman L.S., Bonnay M.: “An assay for dopamine- $\beta$ -hydroxylase activity in tissues and serum”. *Experimentia*, 1971; 27: 632.
- Goldstein M., John T and Gawly TQ. “Kinetic studies of the enzymatic dopamine- $\beta$ -hydroxylation reaction”. *Biochemistry*, 1968; 7: 2724-2730.
- Goldstein M., Lauser E., McKereghan M.R.: “Studies on the purification and characterization of 3,4-dihydroxyphenylethylamine  $\beta$ -hydroxylase”. *J. Biol. Chem.*, 1965; 240: 2066-2072.
- Gores G.J., Wiesner R.H., Dickson E.R., Zinsmeister A.R., Jorgensen R.A., Langworthy A.: “Prospective evaluation of esophageal varices in primary biliary cirrhosis: development, natural history, and influence on survival”. *Gastroenterol.*, 1989; 96: 1552-9.
- Gournay J., Martin T., Perrin D., Galmiche J.P.: “Isosorbide mononitrate and propranolol compared with propranolol alone for the prevention of variceal rebleeding”. *Hepatology*, 2000; 31: 1239-1245.
- Graham D.Y., Smith J.L.: The course of patients after variceal hemorrhage *Gastroenterol.*, 1981; 80: 800-809.
- Green S.A., Turki J., Innis M., Liggett S.: “Amino-terminal polymorphisms of the human beta-2-adrenergic receptor impart distinct agonist-promoted regulatory properties”. *Biochem.*, 1994; 33: 9414-9.
- Groszmann R.J.: “Beta-adrenergic blockers and nitrovasodilators for the treatment of portal hypertension: the good, the bad, the ugly”. *Gastroenterol.*, 1998; 113: 1794-1797.
- Groszmann R.J., Bosch J., Grace N., Conn H.O., García-Tsao G., Navasa M., Albert J.: “Hemodynamic events in a prospective randomized trial of propranolol vs placebo in the prevention of the first variceal hemorrhage”. *Gastroenterol.*, 1990; 99: 1401-1407.
- Groszmann R.J., Wongcharatrawee S.: “The hepatic venous pressure gradient: anything worth should be done right”. *Hepatology*, 2004, 39 (2): 280-2.
- Groszmann R.J.: “Hyperdynamic circulation of liver disease 40 years later: pathophysiology and clinical consequences”. *Hepatology*, 1994; 20: 1359-1363.
- Guarner C., Soriano G., Such J., Teixido M., Ramis I., Bulbena O., Rosello J., Guarner F., Gelpi E., Balanzo J.: “Systemic prostacyclin in cirrhotic patients: relationship with portal hypertension and changes after intestinal decontamination”. *Gastroenterol.*, 1992; 102: 303-9.
- Guderman T., Kalkbrenner F., Schultz G.: “Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction”. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1996; 36: 429-59.
- Guimarães S, Moura D. “Vascular adrenoceptors: an update”. *Pharmacol. Rev.*, 2001; 53 (2): 319-356.
- Gupta T.K., Chen L., Groszmann R.J.: Pathophysiology of portal hypertension *Bailliere’s Clin Gastroenterol.*, 1997; 11: 203-219.
- Gutierrez C., Bernabé R.R., Vega J., Kreisler M.: “Purification of human T and C cells by a discontinuous density gradient of Percoll”. *J. Immunol. Methods.*, 1979; 29: 57-63.
- Guyton A.C.: En “Tratado de fisiología médica”. Capítulo 32 “Eritrocitos, anemia y policitemia”. Página 219-21. Editorial Interamericana McGraw-Hill., 1992.

- Hamilton G., Phing R.C., Hutton R.A., Dandona P., Hobbs K.F.: "The relationship between prostacyclin activity and pressure in the portal vein". *Hepatology*, 1982; 2: 236-242.
- Hamilton G., Rosza I., Hutton F.P.R., Dandona P., Hobbs E.F.: "Portal vein prostacyclin activity in experimental portal hypertension in rats". *Clin. Sci.*, 1981; 60: 327-329.
- Hanski E., Sternweis P.C., Northup J.K., Drowerik A.W., Gilman A.G.: "The regulatory component of adenylate cyclase purification and properties of the turkeys erythrocyte protein". *J. Biol. Chem.*, 1981; 256: 12911-12919.
- Harrison T., Samuel B.U., Akompong T., Hamm H., Mohandas N., Lomasney J.W., Haldar K.: "Erythrocyte G protein-coupled receptor signalling in malarial infection". *Sci.*, 2003; 301 (19): 1734-6.
- Hashizume M., Inokuchi K., Tanaka K.: "The role of prostacyclin in patients with portal hypertension". *Liver*, 1985; 5: 89-93.
- Heller J., Schepke M., Gehnen N., Molderings G.J., Müller A., Erhard J., Spengler U., Sauerbruch T.: "Altered adrenergic responsiveness of endothelium-denuded hepatic arteries and portal veins in patients with cirrhosis". *Gastroenterol.*, 1999; 116 (2): 387-93.
- Hendrickse M.T., Triger D.R.: "Peripheral and cardiovascular autonomic impairment in chronic liver disease: prevalence and relation to hepatic function". *J. Hepatology*, 1992; 16 (1-2): 177-83.
- Henriksen J.H., Ring-Larsen H.: "Hepatorenal disorders: role of the sympathetic nervous system". *Semin. Liver. Dis.*, 1994; 14: 35-43.
- Henriksen J.H., Christensen N.J., Kok-Jensen A., Christiansen I.: "Increased plasma noradrenaline concentration in patients with chronic obstructive lung disease: relation to haemodynamics and blood gases". *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1980; 40: 419-27.
- Henriksen J.H., Christensen N.J., Ring-Larsen H.: "Noradrenaline and adrenaline concentrations in various vascular beds in patients with cirrhosis. Relation to haemodynamics". *Clin. Physiol.*, 1981; 1: 283-304.
- Henriksen J.H., Møller S., Ring-Larsen H., Christensen N.J.: "The sympathetic nervous system in liver disease". *J. Hepatology*, 1998; 29: 328-41.
- Henriksen J.H., Ring-Larsen H., Christensen N.J.: "Hepatic intestinal uptake and release of catecholamines in alcoholic cirrhosis. Evidence of enhanced hepatic intestinal sympathetic nervous activity". *Gut*, 1987; 28 (12): 1637-42.
- Henriksen J.H., Ring-Larsen H., Christensen N.J.: "Sympathetic nervous activity in cirrhosis". *J. Hepatology*, 1984A; 1: 55-65.
- Henriksen J.H., Ring-Larsen H., Kanstrup I.L., Christensen N.J.: "Splanchnic and renal elimination and release of catecholamines in cirrhosis. Evidence of enhanced sympathetic nervous activity in patients with cirrhosis". *Gut*, 1984B; 25: 1034-43.
- Herman C.A., Brown B.L.: "Catecholamines and divalent cation effects on frog liver adenylate cyclase". *General and comparative endocrinology*, 1983; 50: 87-94.
- Hicken B.L., Sharara A.I., Abrams G.A., Eloubeidi M., Fallon M.B., Arguedas M.R.: "Hepatic venous pressure gradient measurements to assess response to primary prophylaxis in patients with cirrhosis: a decision analytical study". *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2003; 17: 145-53.
- Hildebrandt J.D., Codina J., Birnbaumer L.: "Interaction of the stimulatory and inhibitory regulatory proteins of adenylate cyclase system with the catalytic



- component of CYC-S 49 cell membranes". *J. Biol. Chem.*, 1984; 259: 13178-13185.
- Hillon P., Lebec D., Muñoz C., Jungers M., Godfarb G., Benhamou J.P.: "Comparison of the effects of a cardioselective and a non-selective beta blocker on portal hypertension in patients with cirrhosis". *Hepatology*, 1982; 2: 528-31.
  - Hilsted J.: "Autonomic neuropathy: the diagnosis". *Acta Neurol. Scand.*, 1983; 67: 193-201.
  - Hines P.C., Zen Q., Burney S.N., Shea D.A., Ataga K.I., Orringer E.P., Telen M.J., Parise L.V.: "Novel epinephrine and cyclic AMP-mediated activation of BCAM/Lu-dependent sickle (SS) RBC adhesion". *Blood*, 2003; 101 (15): 3281-7.
  - Hirata F., Warren J., Strittmatter W.J., Axelrod J.: " $\beta$ -adrenergic receptor agonists increase phospholipid methylation, membrane fluidity, and  $\beta$ -adrenergic receptor-adenylate cyclase coupling". *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1979; 76 (1): 368-372.
  - Hoffman B.B., Taylor P.: "Neurotransmisión: sistema nervioso autónomo y motor somático". En "Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica". Editores: Hardam JG y Limbird LE Editor consultor: Alfred Goodman Gilman. 10ª edición, Mc Graw Hill, México, 2003, página: 129-147.
  - Hollenberg M.: "Receptor regulation, part I: examples of monospecific and heterospecific receptor regulation". *Trends. Pharmacol. Sci.*, 1985; 242-5.
  - Homcy C.J., Vatner S.F., Vatner D.E.: " $\beta$ -adrenergic receptor regulation in the heart in pathophysiologic states: abnormal adrenergic responsiveness in cardiac diseases". *Annu. Rev. Physiol.*, 1991; 53: 137-59.
  - Horga J.F., Gisbert J., De Agustín J.C., Hernández M., Zapater P.: "A beta-2 adrenergic receptor activates adenylate cyclase in human erythrocyte membranes at physiological calcium plasma concentrations". *Blood. Cells., Molecules., and Diseases.*, 2000; 26 (3): 1-6.
  - Horowitz L.D., Travis V.L.: "Low serum dopamine beta hydroxylase activity: a marker of congestive heart failure". *J. Clin. Invest.*, 1978; 62: 899-906.
  - Hörtnagl H., Lochs H., Winkler H.: "Immunological studies on the acidic chromogranins and on dopamine beta-hydroxylase of bovine chromaffin granules". *J. Neurochem.*, 1974; 22: 197-199.
  - Hörtnagl H., Winkler H., Lochs H.: "Membrane proteins of chromaffin granules: dopamine beta-hydroxylase, a mayor constituent". *Biochem. J.*, 1972; 129: 187-195.
  - Insel P.A., Stoolman L.M.: "Radioligand binding to beta adrenergic receptors of intact cultured S49 cells". *Mol. Pharmacol.*, 1978 Jul;14(4):549-61.
  - IUPHAR compendium of receptor characterization and classification. Compiled by the IUPHAR Committee on receptor nomenclature and drug classification 1998.
  - Jackobs K.H., Aktories K., Schultz G.: "A nucleotide regulatory site for somatostatin inhibition of adenylate cyclase in S49 lymphoma cells". *Nature*, 1984; 303: 177-8.
  - Jalan R., Forrest E.H., Stanley A.J.: "A randomized trial comparing transjugular intrahepatic portosystemic stent-shunt with variceal band ligation in the prevention of rebleeding form esophageal varices". *Hepatology*, 1997; 36: 1115-22.
  - James S.R., Vaziri C., Walker T.R., Milligan G., Downes C.P.: "The turkey erythrocyte  $\beta$ -adrenergic receptor couples to both adenylate cyclase and

- phospholipase C via distinct G-protein  $\alpha$  subunits". *Biochem. J.*, 1994; 304 (pt 2): 359-64.
- Jeremy J.Y., Mikhailidis D.P., Karatapanis S., Harry D., Burroughs A.K., McIntyre N., Stansby G., Jacobs M., McCormik A.: "Altered prostacyclin synthesis by aortae from hepatic portal vein-constricted rats: evidence for effects on protein Kinase C and calcium". *J. Hepatol.*, 1994; 21: 1017-1022.
  - Johnson G.L., Wolfe B.B., Harden T.K., Molinoff P.B., Perkins J.P.: "Role of beta-adrenergic receptors in catecholamine-induced desensitization of adenylate cyclase in human astrocytoma cells". *J. Biol. Chem.*, 1978 Mar 10; 253 (5): 1472-80.
  - Johnson M.: "The  $\beta$ -adrenoceptor". *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 1998; 158: S146-S153.
  - Kaiser G., Wiemer G., Kremer G., Dietz J., Palm D.: "Identification and quantification of  $\beta$ -adrenoceptor sites in red blood cells from rats". *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 1978 ; 305: 41-50.
  - Katade T., Dinuing M., Vi M.: "Mechanisms for inhibition of the catalytic activity of adenylate cyclase by the guanine nucleotide-binding. Proteins serving as the substitute of islet-activation protein, pertussis toxin". *J. Biol. Chem.*, 1986; 261 (11): 5215-5221.
  - Kaufman S., Friedman S.: "Dopamine  $\beta$ -hydroxylase". *Pharmacol. Rev.*, 1965; 17: 71-100.
  - Keller U., Gerber P.P.G., Buhler F.R., Stauffacher W.: "Role of the splanchnic bed in extracting circulating adrenaline and noradrenaline in normal subjects and in patients with cirrhosis of the liver". *Clin. Sci.*, 1984; 67 (1): 45-49.
  - Kemper C.M., O'Connor D.T., Westlund K.N.: "Immunocytochemical localization of dopamine-beta-hydroxylase in neurons of the human brain stem". *Neuroscience.*, 1987; 23: 981-989.
  - Kempler P., Váradi A., Kádár É., Szalay F.: "Autonomic and peripheral neuropathy in primary biliary cirrhosis: evidence of small sensory fibre damage and prolongation of the QT interval". *J. Hepatol.*, 1994; 21: 1150-1.
  - Kenakin T.: "Pharmacologic analysis of drug-receptor interaction, 2<sup>nd</sup> edn. Raven Press, New York, 1993.
  - Kennedy P., Grady J.: "Diseases of the liver. Chronic liver disease". *Hospital Pharmacist*, 2002; 9: 137-143.
  - Kirpekar A.M., Puig M.: "Effect of Flow-stop on noradrenaline release from normal spleens and spleens treated with cocaine, phentolamine or OH-enaxibenzamine". *Br. J. Pharmacol.*, 1971; 43: 359-69.
  - Kitagawa Y., Adachi-Akahane S., Nagao T.: "Determination of beta-adrenoceptor subtype on rat isolated ventricular myocytes by use of highly selective beta-antagonists". *Br. J. Pharmacol.*, 1995; Sep; 116 (1): 1635-43.
  - Knudsen J.H., Christensen N.J., Bratholm P.: "Lymphocyte norepinephrine and epinephrine, but not plasma catecholamines predict lymphocyte cAMP production". *Life. Sci.*, 1996; 59: 639-647.
  - Kobayashi K., Kurosawa Y., Fujita K.Y., Nagatsu T.: "Human dopamine beta-hydroxylase gene: two mRNA types having different 3'-terminal regions are produced through alternative polyadenylation". *Nucleic Acids Research*, 1989; 17 (3): 1089-1102.
  - Koenig J.A., Edwardson J.M.: "Endocytosis and recycling of G protein-coupled receptors". *TIPS*, 1997; 18:276-287.

- Kontos H.A., Shapiro W., Page Mauck H., Patterson J.L. Jr.: "General and regional circulatory alterations in cirrhosis of the liver". *Am. J. Med.*, 1964; 37: 526-535.
- Krishner G., Weiss B., Brodie B.B.: "A simple sensitive method of the assay of adenylyl cyclase". *J. Pharmacol. Exp. Ther.*; 1968; 163: 379-85.
- Krstulovic A.M., Hartwick R.A., Brown P.R.: "Reversed-phase liquid chromatographic separation of 3',5'-cyclic ribonucleotides". *Clin. Chem.*, 1979; 25: 235-41.
- Krupnick J.G., Benovic J.L.: "The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation". *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1998; 38: 289-319.
- Kubo T., Fukuda K., Mikami A., Maeda A., Takahashi H., Mishina N., Haga T., Ichiyama A., Kangawa K.: "Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor". *Nature*, 1986; 323: 411-6.
- Kuzuya H., Nagatsu T.: "Properties of dopamine beta-hydroxylase in soluble and particulate fractions of bovine adrenal medulla". *Biochem. Pharmacol.*, 1972; 21: 737-40.
- Lad P.M., Nielsen T.B., Rodbell M.: "A probe for the organization of the beta adrenergic receptor-regulated adenylyl cyclase system in turkey erythrocyte membranes by the use of a complementation assay". *FEBS Lett.*, 1980; 122 (2): 179-183.
- Laine K., Sloane R., Garcia F.: "Endoscopic ligation compared with sclerotherapy for the treatment of bleeding esophageal varices". *Ann. Intern. Med.*, 1993; 119: 1-7.
- Lake C.R., Ziegler M.G., Kopin I.J.: "Use of plasma norepinephrine for evaluation of sympathetic neuronal function in man". *Life. Sci.*, 1976; 18 (11): 1315-1325.
- Lands A.M., Arnold A., McAuliff J.P., Ludena F.P., Brown T.B.: "Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines". *Nature*, 1967; 214: 597-8.
- Landsberg L., Young J.B.: "Fisiología y Farmacología del Sistema Nervioso Autónomo". En "Principios de Medicina Interna", editor: Harrison, 15ª edición, Madrid, 2001, página: 519 y 520.
- Langer S.Z., Adler E., Enero M.A., Stefano F.J.E.: "The role of the alpha-receptors in regulating noradrenaline release by nerve stimulation". *Proc XXV Cong. Physiol Sci*, 1971; 335.
- Langer S.Z.: "Presynaptic regulation of catecholamine release". *Biochem. Pharmacol.*, 1974; 23: 1793-1800.
- Langner B., Lemmer B.: "Circadian changes in the pharmacokinetics and cardiovascular effects of oral propranolol in healthy subjects". *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 1988; 33: 619-24.
- Lasker R.D., Douns R.W., Auerbach G.D.: "Calcium inhibition of adenylyl cyclase: studies in turkey erythrocyte and S49 CYC- cell membranes". *Arch. Biochem. Biophys.*, 1982; 216: 345-55.
- Laurent C.E., Cardinal R., Rousseau G., Vermeulen M., Bouchard C., Wilkinson M., Armour J.A., Bouvier M.: "Functional desensitization to isoproterenol without reducing cAMP production in canine failing cardiocytes". *Am. J. Physiol. Regulatory. Comp. Physiol.*, 2001; 280: R355-R364.

- Lebrech D., Moreau P.: "Pathophysiology of portal hypertension". *Hepato-gastroenterol.*, 1999; 46 (suppl 2): 1426-8.
- Lebrech D., Hillon P., Munoz C., Goldfarb G., Nouel O., Benhamou J.P.: "The effect of propranolol on portal hypertension in patients with cirrhosis: a haemodynamic study". *Hepato-l.*, 1982; 2: 523-7.
- Lebrech D., Nouel O., Corbic M., Benhamou J.P.: "Propranolol -a medical treatment for portal hypertension?". *Lancet*, 1980; 2: 180-182.
- Lebrech D., Poynard T., Capron J.P., Hillon P., Geoffroy P., Chaput J.C., Rueff B., Benhamou J. P.: "Nadolol for prophylaxis of gastrointestinal bleeding in patients with cirrhosis: a randomised trial". *J. Hepato-l.*, 1988; 7: 118-25.
- Lebrech D., Poynard T., Hillon P., Benhamou J.P.: "Propranolol for prevention of recurrent gastrointestinal bleeding in patients with cirrhosis: a controlled study". *N. Engl. J. Med.*, 1981; 305: 1371-74.
- Lee S., Pak J.M., Medlicott S.M., Bomzon A.: "Vasodilatory responses of isolated arteries of cirrhotic rats". *Clin. Sci.*, 1995; 89: 227-232.
- Lee S.S., Marty J., Mantz J., Samain E., Braillon A., and Lebrech D.: "Desensitization of myocardial  $\beta$ -adrenergic receptors in cirrhotic rats". *Hepato-l.*, 1990; 12 (3 Pt1): 481-5.
- Leff P.: "The two-state model of receptor activation". *Trends. Pharmacol. Sci.*, 1995; 16: 89-97.
- Lefkowitz R.J., Caron M.G., Michel T., Stadel J.M.: "Mechanisms of hormone receptor-effector coupling: the beta adrenergic receptor and adenylate cyclase". *Federation Proc*, 1982; 41: 2664-2670.
- Lefkowitz R.J., Stadel J.M., Caron M.G.: "Adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptors: structure and mechanism of activation and desensibilization". *Arch. Rev. Biochem.*, 1983; 52: 159-86.
- Lefkowitz R.J.: "Identification and regulation of alpha- and beta-adrenergic receptors". *Fed. Proc.*, 1978 Feb; 37 (2): 123-9.
- Lefkowitz R.J.: "The superfamily of heptahelical receptors". *Nature Cell Biology*, 2000; 2: E133-E136.
- Lenz K., Hortnagl H., Magometschnigg D., Kleinberger G., Druml W.: "Function of the autonomic nervous system in patients with hepatic encephalopathy". *Hepato-l.*, 1985; 5 (5): 831-6.
- Levin E., Kaufman S.: "Studies on the enzyme catalysing the conversion of 3, 4-dihydroxyphenylamine to norepinephrine". *J. Biol. Chem.*, 1961; 236: 2043-2049.
- Levin E., Levenberg B., Kaufman S.: "The enzymatic conversion of 3,4-dihydroxy-phenyl-ethylamine to norepinephrine". *J. Biol. Chem.*, 1960; 235: 2080-2086.
- Levitzki A.: " $\beta$ -adrenergic receptors and their mode of coupling to adenylate cyclase". *Physiol. Rev.*, 1986, 66 (3): 819-54.
- Levitzki A.: "From epinephrine to cyclic AMP". *Science*, 1988; 241: 800-6.
- Levitzki A.: "Receptors, a quantitative approach". Ed. Por The Benjamin cumming publishing company, Inc 1984.
- Li J.C., Henderson J.M.: En "Surgical Treatment. Portal hypertension". Editores: Holzheimer RG y Mannick JA, 2001.
- Lin H.C., Soubrane O., Cailmail S., Lebrech D.: "Early chronic administration of propranolol reduces the severity of portal hypertension and portal-systemic shunting in conscious portal vein stenosed rats". *J. Hepato-l.*, 1991; 13: 213-9.

- Lo O.H., Lai K.H., Cheng I.S.: "A prospective, randomized trial of sclerotherapy vs ligation in the managements of bleeding esophageal varices". *Hepatology*, 1995; 22: 466-71.
- Louis W.J., Doyle A.E., Anavekar S.: "Plasma norepinephrine levels in essential hypertension". *N. Engl. J. Med.*, 1973; 288; 599-601.
- Luca A., García-Pagán J.C., Feu F.: "Noninvasive measurements of femoral blood flow and portal pressure response to propranolol in patients with cirrhosis". *Hepatology*, 1995; 21: 83-8.
- Lunzer M., Newmann S.P., Sherlock S.: "Skeletal muscle blood flow and neurovascular reactivity in liver disease". *Gut*, 1973; 14: 354-359.
- MØller S., Henriksen J.H.: "Endothelins in chronic liver disease". *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1996; 56: 481-90.
- MacGilchrist A.J., Reid J.L.: "Impairment of autonomic reflexes in cirrhosis". *Am. J. Gastroenterol.*, 1990; 85 (3): 288-92.
- MacGilchrist A.J., Sumner D., Reid J.L.: "Impaired pressor reactivity in cirrhosis: evidence for a peripheral vascular defect". *Hepatology*, 1991; 13: 689-694.
- Marchesi V.T.: "El sistema citoesquelético de los hematíes". *Hospital Practice I*, 1986; 4: 21-35.
- Martín R., Moltó J.M., Villagrasa F.: "Valoración de la función autonómica en pacientes sometidos a hemodiálisis periódica". *Rev. Neurol. (Barcelona)*, 1990; 18 (91): 117-122.
- Mattera R., Graziano M.P., Yatani A., Zhou A., Craf R., Codina J., Birnbaumer L., Gilman A.G., Brown A.M.: "Splice variants of the  $\alpha$ -subunits of the G protein Gs activate both adenylyl cyclase and calcium channels". *Science*, 1989; 243: 804-7.
- Mayor F.: "Mecanismos de regulación de receptores acoplados a proteínas G". *Transducción de señales como diana farmacológica (Monografías del Dr. Antonio Esteve)*, 1999.
- Merkel C., Bolognesi M., Sacerdoti D., Bombonato G., Bellini B., Bighin R., Gatta A.: "The hemodynamic response to medical treatment of portal hypertension as a predictor of clinical effectiveness in the primary prophylaxis of variceal bleeding in cirrhosis". *Hepatology*, 2000A; 32; 930-4.
- Merkel C., Marin R., Sacerdoti D., Donada C., Cavallarín G., Torboli P., Amodio P.: "Long-term results of a clinical trial of nadolol with or without isosorbide mononitrate for primary prophylaxis of variceal bleeding in cirrhosis". *Hepatology*, 2000B; 31: 324-29.
- Merkel C., Sacerdoti D., Bolognesi M., Bombonato G., Gatta A.: "Doppler sonography and hepatic vein catheterization in portal hypertension: assessment of agreement in evaluating severity and response to treatment". *J. Hepatology*, 1998; 28: 622-630.
- Merkel C.: "Nonselective  $\beta$ -blockers plus nitrates in portal hypertension: an open question". *Hepatology*, 2003; 37 (6): 1254-6.
- Merli M., Nicolini G., Angeloni S., Rinaldi V., de Santis A., Merkel C., Attili A.F., Riggio O.: "Incidence and natural history of small esophageal varices in cirrhotic patients". *J. Hepatology*, 2003; 38: 266-272.
- Mills P.J., Dimsdale J.E., Nelesen R.A., Ziegler M.G.: "Cyclic AMP export from lymphocytes in hypertension". *Clin. Exp. Hypertens.*, 1994; 16 (6): 825-33.

- Minneman K.P., Pittman R.N., Molinoff P.B.: "Beta adrenergic receptor subtypes: properties, distribution, and regulation". *Ann. Rev. Neurosci.*, 1981; 4: 419-61.
- Molinoff P.B., Weinshilboun R., Axelrod J.: "A sensitive enzymatic assay for dopamine  $\beta$ -hydroxylase". *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1971; 178: 425-431.
- Moltó J.M., Martín R.: "Los reflejos cardiovasculares en la valoración no invasiva del sistema nervioso autónomo". *Rev. Neurol. (Barcelona)*, 1990; XVIII; 91: 109-115.
- Monthly Vital Statistics Report: Advance report of final mortality statistics, 1992 Monthly Vital Stat Rep, 1995; 43: 24-33.
- Moore K., Wendon J., Frazer M., Karani J., Williams R., Badr K.: "Plasma endothelin immunoreactivity in liver disease and the hepatorenal syndrome". *N. Engl. J. Med.*, 1992; 327: 1774-8.
- Morgan A.G., Clamp S.E.: "International upper gastrointestinal bleeding survey, 1976-1986". *Scan. J. Gastroenterol.*, 1988; 23 (suppl 144): S51-S58.
- Moser A., Cramer H.: "Peptidergic modulation of G-protein coupled cyclic-AMP accumulation in the rat caudate nucleus". *Neuropeptides*, 1992; 22 (3): 143-7.
- Moser A., Klose C.: "Somatostatin modulation o adenosine receptor coupled G-protein subunits in the caudate nucleus of the rat". *Neuropeptides*, 1993; 24 (5): 293-7.
- Motulsky H.J., Insel P.A.: "Adrenergic receptors in man: direct identification, physiologic regulation, and clinical alterations". *N. Engl. J. Med.*, 1982; 307: 18-29.
- Murray B.M., Paller M.S.: "Decreased pressor reactivity to angiotensin II in cirrhotic rats: evidence for a post-receptor defect in angiotensin action". *Circ. Res.*, 1985; 57: 424-431.
- Murray J.F., Dawson A.M., Scherlock S.: "Circulatory changes in chronic liver disease". *Am. J. Med.*, 1958; 24: 358-67.
- Nagatsu T., Udenfried S.: "Photometric assay of dopamine- $\beta$ -hydroxylase activity in human blood". *Clin. Chem.*, 1972; 18 (9): 980-983.
- Nagatsu T., Kuzuya H., Hidaka H.: "Inhibition of dopamine beta-hydroxylase by sulphhydryl compounds and the nature of the natural inhibitors". *Biochem. Biophys. Acta.*, 1967; 139: 319-327.
- Nambi P., Peters J.R., Sibley D.R., Lefkowitz R.J.: "Desensitization of the turkey erythrocyte  $\beta$ -adrenergic receptor in a cell-free system". *J. Biol. Chem.*, 1985; 260 (4): 2165-71.
- Navasa M., Chesta J., Bosch J., Rodés J.: "Reduction of portal pressure by isosorbide-5-mononitrate in patients with cirrhosis. Effects on splanchnic and systemic hemodynamics and liver function". *Gastroenterol.*, 1989; 96: 1110-8.
- Netter F.H.: En "Colección Ciba de ilustraciones médicas". Tomo 3: "Sistema digestivo", página 69. Editorial Salvat, 1981.
- Neumann J., Scholz H., Doring V., Schmitz W., Meyerinck L.V., Kalmar P.: "Aumento de las proteínas Gi miocárdicas en la insuficiencia cardiaca". *The Lancet (ed. Esp.)*, 1989; 14 (3): 40-41.
- Nevens F., Lijnen P., VanBilloen H., Fevery J.: "The effect of long-term treatment with spironolactone on variceal pressure in patients with portal hypertension without ascites". *Hepatol.*, 1996; 23: 1047-52.
- Noth R.H., Spaulding S.W.: "Decreased serum dopamine-beta-hydroxylase in hyperthyroidism". *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1974; 39: 614-7.

- Ohara N., Jaskan J., Chang S.W.: "Hyperglucagonemia and hyperdynamic circulation in rats with biliar cirrhosis". *J. Lab. Clin. Med.*, 1993; 121: 142-147.
- Ohta M., Kishihara F., Hashizume M., Kawanaka H., Tomikawa M., Sugimachi K.: "Increased prostacyclin content in gastric mucosa of cirrhotic patients with portal hypertensive gastropathy". *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 1995; 53: 41-5.
- Oka K., Kijikawa K., Ohuchi T., Yoshida H., Imaizumi R.: "Distribution of dopamine- $\beta$ -hydroxylase in subcellular fractions of adrenal medulla". *Life. Sci.*, 1967; 6: 461-5.
- Oliver M.I., Miralles R., Rubies-Prat J., Navarro X., Espadaler J.M., Andreu M.: "Autonomic dysfunction in patients with non-alcoholic chronic liver disease". *J. Hepatol.*, 1997; 26 (6): 1242-8.
- Oxenstierna G., Edman G., Iselius L., Orelund L., Ross S.B., Sedvall G.: "Concentrations of monoamine metabolites in the cerebrospinal fluid of twins and unrelated individuals-a genetic study". *J. Psychiatr. Res.*, 1986; 20: 19-29.
- Oye I., Sutherland E.W.: "The effect of epinephrine and other agents on adenyl cyclase in the cell membrane of avian erythrocytes". *Biochem. Biophys. Acta.*, (Amst.), 1966; 127: 347-54.
- Pagani M., Rinoldi O., Malliani A.: "Low-frequency components of cardiovascular variabilities as markers of sympathetic modulation". *TIPS*, 1992; 13: 50-54.
- Pagliaro L., D'Amico G., Pasta L.: "Portal Hypertension in cirrhosis: natural history". In *Portal Hypertension. Pathophysiology and Treatment*. Edited by Bosch J, Groszmann RJ. Oxford: Blackwell Scientific; 1994: 72-92.
- Pagliaro L., D'Amico G., Sorensen T.I., Lebrec D., Burroughs A.K., Morabito A., Tine F., Politi F., Traina M.: "Prevention of first bleeding in cirrhosis. A meta-analysis of randomized trials of nonsurgical treatment". *Ann. Intern. Med.*, 1992; 117: 59-70.
- Pak J.M., Lee S.S.: "Glucagon in portal hypertension". *J. Hepatol.*, 1994; 20: 825-832.
- Palczewski K., Pulvermiller A., Buczylo J., Hofmann K.P.: "Phosphorylated rhodopsin and heparin induce similar conformational changes in arrestin". *J. Biol. Chem.*, 1991; 266: 18649-54.
- Pascal J.P., Cales P.: "Multicenter study group. Propranolol in the prevention of first upper gastrointestinal tract hemorrhage in patients with cirrhosis of the liver and esophageal varices". *N. Engl. J. Med.*, 1987; 317: 856-61.
- Pazos A.: En "Acciones de los fármacos I. Interacciones fármaco y receptor". Flórez J. 4ª edición, Masson, Barcelona, 2003, página: 7, 19, 351.
- Peng C.T.: "Sample preparation in liquid scintillation counting". Amersham, the radiochemical centre. *Rev.* 17 (1977).
- Peronnet F., Cleroux J., Perrault H., Thibault G., Cosineau D., de Champlain J., Guiland J.C., Kleeping J.: "Plasma norepinephrine, epinephrine, and dopamine beta-hydroxylase activity during exercise in man". *Med. Sci. Sports. Exerc.*, 1985; 17: 683-688.
- Piascik M.T., Addison B., Babich M.: "Ca<sup>2+</sup>-dependent inhibition of smooth muscle adenylate cyclase activity". *Arch. Biochem. Biophys.*, 1985; 241: 28-35.
- Pippig S., Andexinger S., Lohse M.J.: "Sequestration and recycling of  $\beta_2$ -adrenergic receptors permit receptor resensitization". *Mol. Pharmacol.*, 1995; 47: 666-76.

- Polio J., Groszmann R.J.: "Hemodynamic factors involved in the development and rupture of esophageal varices. A pathophysiological approach to treatment". *Semin. Liver. Dis.*, 1986; 6: 318-331.
- Polio J., Sieber C.C., Lerner E., Groszmann R.J.: "Cardiovascular hyporesponsiveness to norepinephrine, propranolol, and nitroglycerin in portal-hypertensive and aged rats". *Hepatology*, 1993; 18: 128-36.
- Porzig H.: "Are the differences in the beta-receptor-adenylate cyclase systems of fragmented membranes and living cells?". *Trends. Pharmacol. Sci.*, 1982; 3: 75-78.
- Post S.R., Hammond H.K., Insel P.A.: "β-adrenergic receptors and receptor signalling in heart failure". *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1999; 39: 343-60.
- Powell C.E., Slater I.H.: "Blocking of inhibitory adrenergic receptors by a dichloro analog of isoproterenol". *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1958; 122: 480-8.
- Poynard T., Cales P., Pasta L., Ideo G., Pascal J.P., Pagliaro L., Lebrec D.: "Beta-adrenergic-antagonist drugs in the prevention of gastrointestinal bleeding in patients with cirrhosis and esophageal varices: an analysis of data and prognostic factors in 589 patients from four randomised clinical trials". *N. Engl. J. Med.*, 1991; 324: 1532-8.
- Price H.L., Cooperman L.H., Warden J.C.: "Control of splanchnic circulation in man: role of beta-adrenergic receptors". *Circ. Res.*, 1967; 21: 333-340.
- Puthumana L., Chaudhry V., Thuluvath P.J.: "Prolonged QTc interval and its relationship to autonomic cardiovascular reflexes in patients with cirrhosis". *J. Hepatology*, 2001; 35: 733-8.
- Quiring K., Kaiser G., Gauger D., Palm D.: "Cyclic AMP-dependent protein kinases and binding sites for cyclic AMP in rat erythrocytes". *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 1975, Oct 15; 290(4): 397-417.
- Rabinowitz R., Korczyn A.D., Eshel Y., Rubinstein I.: "Dopamine-beta-hydroxylase activity in serum of patients with hepatic damage". *Prog. Neuro-Psychopharmacol.*, 1979; 3: 551-553.
- Ramond M.J., Comoy E., Lebrec D.: "Alterations in isoprenaline sensitivity in patients with cirrhosis: evidence of abnormality of the sympathetic nervous activity". *Br. J. Pharmacol.*, 1986; 21(2): 191-6.
- Rana B.K., Shiina T., Insel P.A.: "Genetic variation and polymorphisms of G protein-coupled receptors: functional and therapeutic implications". *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2001; 41: 593-624.
- Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M.: En "Farmacología", 4ª edición. Página:12. Ediciones Harcourt S.A, 2000.
- Reichen J.: "Portal hypertension: cytokines and Endothelins". *Hepatogastroenterol.*, 1999; 46 (suppl 2): 1434-6.
- Reynaert H., Geerts A.: "Pharmacological rationale for the use of somatostatin and analogues in portal hypertension". *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2003 Aug 15; 18 (4): 375-86.
- Richardson P., Withrington P.: "Liver blood flow". *Gastroenterol.*, 1981; 81 (2): 356-375.
- Rigau J., Bosch J., Bordás J.M., Navasa M., Mastai R., Kravetz D., Bruix J.: "Endoscopic measurements of variceal pressure in cirrhosis: correlation with portal pressure and variceal hemorrhage". *Gastroenterol.*, 1989; 96: 873-880.
- Ring-Larsen H., Hesse B., Henriksen J.H., Christensen N.J.: "Sympathetic nervous activity and renal and systemic hemodynamics in cirrhosis: plasma



- norepinephrine concentration, hepatic extraction, and renal release". *Hepatology*, 1982; 2: 304-310.
- Rodbell M.: "The role of hormone receptors and GTP regulatory proteins in membrane transduction". *Nature*, 1980; 284: 17-22.
  - Rohrer D.K., Chruscinski A., Schauble E.H.: "Cardiovascular and metabolic alterations in mice lacking both  $\beta_1$  and  $\beta_2$  adrenergic receptors". *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 16701-16708.
  - Rosen O.M., Rosen S.M.: "Properties of an adenyl cyclase partially purified from frog erythrocytes". *Arch. Biochem. Biophys.*, 1969; 131: 449-56.
  - Ross E.M., Gilman A.G.: "Resolution of some components of adenylate cyclase necessary for catalytic activity". *J. Biol. Chem.*, 1977; 252: 538-51.
  - Ross E.M., Kenakin T.P.: "Farmacodinámica: mecanismos de acción y relación entre la concentración y el efecto de los fármacos". En "Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica". Editores: Hardam JG y Limbird LE Editor consultor: Alfred Goodman Gilman. 10ª edición, Mc Graw Hill, México, 2003, página: 35-40.
  - Rossle M., Deibert P., Haag K., Ochs A., Olschewski M., Siegerstetter V., Hauenstein K.H., Geiger R., Stiepak C., Keller W., Blum H.E.: "Randomised trial of transjugular intrahepatic-portosystemic shunt versus endoscopy plus propranolol for prevention of variceal rebleeding". *Lancet*, 1997; 349: 1043-9.
  - Rush R.A., Geffen L.B.: "Radioimmunoassay and clearance of circulating dopamine-beta-hydroxylase". *Circ. Res.*, 1972; 32: 444-452.
  - Russel M.P., Moran N.C.: "Evidence for lack of innervation of beta-2 adrenoceptors in the blood vessels of the gracilis muscle of the dog". *Circ. Res.*, 1980; 46: 344-52.
  - Sabba C., Weltin G.G., Cicchetti D.V., Ferraioli G., Taylor K.J., Nakamura T., Moriyasu F., Groszmann R.J.: "Observer variability in echo Doppler measurements of portal blood flow in cirrhotic patients and normal volunteers". *Gastroenterol.*, 1990; 98: 1603-4.
  - Salmeron J.M., Ruiz del Arbol L., Ginés A., Garcia-Pagan J.C., Gines P., Feu F., Claria J., Rivera F., Bosch J., Arroyo V.: "Renal effects of acute isosorbide-5-mononitrate administration in cirrhosis". *Hepatology*, 1993; 17: 800-6.
  - Salomon H., Londos L., Rodbell M.: "A highly sensitive adenylate cyclase assay". *Arch. Biochem.*, 1974; 58: 541-8.
  - Sanyal A.J., Freedman A.M., Luketic V.A., Shiffman M.L., Cole P.E., Tisnado J., Simmons S.: "Transjugular intrahepatic portosystemic shunts compared with endoscopic sclerotherapy for the prevention of recurrent variceal hemorrhage: a randomized, controlled trial". *Ann. Intern. Med.*, 1997; 126: 849-57.
  - Sarin S.K., Groszmann R.J., Mosca P.G., Rojkind M., Stadecker M.J., Reuben A., Bhatnagar R., Dayal Y.: "Propranolol ameliorates the development of portal-systemic shunting in a chronic murine schistosomiasis model of portal hypertension". *J. Clin. Invest.*, 1991; 87: 1032-6.
  - Schanberg S.M., Kirshner N.: "Serum dopamine-beta-hydroxylase as an indicator of sympathetic activity and primary hypertension". *Biochem. Pharmacol.*, 1976; 25: 617-621.
  - Schepke M., Heller J., Paschke S., Thomas J., Wolf M., Neef M., Malago M., Gerhard J., Molderings G., Spengler U., Sauerbruhc T.: "Contractile hyporesponsiveness of hepatic arteries in humans with cirrhosis: evidence for a receptor-specific mechanism". *Hepatology*, 2001; 34 (5): 884-888.

- Schepke M., Raab P., Hoppe A., Brensing K.A., Paar D., Potyka U., Sauerbruch T.: "Propranolol stereoisomer plasma concentrations and portal haemodynamic response in patients with liver cirrhosis". *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 1999; 13: 1451-58.
- Schlichting P., Christensen E., Faurholdt K.: "Main causes of death in cirrhosis". *Scand. J. Gastroenterol.*, 1983; 18: 881-888.
- Schoneberg T., Schultz G., Gudermann T.: "Structural basis of G protein-coupled receptor function". *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1999; 151: 181-93.
- Schwartz J.P., Costa E.: "Beta adrenergic receptor-mediated regulation of cyclic nucleotide phosphodiesterase in C6 glioma cells: vinblastine blockade of isoproterenol induction". *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1980 Mar; 212 (3): 569-72.
- Sell S., Hunt J.M., Dunsford H.A., Chisari F.V.: "Synergy between hepatitis B virus expression and chemical hepatocarcinogens in transgenic mice". *Cancer Res.*, 1991; 51: 1278-85.
- Sevilla N., Tolkovsky A.M., Levitzki A.: "Activation of turkey erythrocyte adenylate cyclase by two receptors: adenosine and catecholamines". *Febs. Letters*, 1977; 81 (2): 339-341.
- Shaldon C., Peacock J.H., Walker R.M., Palmer D.B., Badrick F.E.: "The portal venous content of adrenaline and noradrenaline in portal hypertension". *Lancet*, 1961; 1: 957-961.
- Sharara A.I., Rockey D.C.: "Gastroesophageal variceal hemorrhage". *N. Engl. J. Med.*, 2001; 345 (9): 669-681.
- Sharara A.I.: "Therapy for primary prophylaxis of varices: and, the winner is...?". *Hepatology*, 2003; 37 (2): 473-5.
- Sheppard H., Burghardt C.R.: "Adenyl Cyclase activity in non-nucleated erythrocytes of several mammalian species". *Biochem. Pharmacol.*, 1969; 18: 2576.
- Shorr R., Lefkowitz R.J., Caron M.G.: "Purification of the beta-adrenoceptor: identification of the hormone binding subunit". *J. Biol. Chem.*, 1981; 256: 5820-6.
- Sikula E., Kravetz D., Groszmann R.J.: "Evolution of portal hypertension and mechanisms involved in its maintenance in a rat model". *Am. J. Physiol.*, 1985; 248: G618-625.
- Silverstein F.E., Gilbert D.A., Tedesco F.J.: "The national ASGE survey on upper gastrointestinal bleeding. I. Study design and baseline data. II". *Clinical prognostic factors Gastrointest Endosc*, 1981; 27: 73-93.
- Siringo S., Bolondi L., Gaiani S., Sofia S., Zironi G., Rigamonti A., Di Febo G., Miglioli M., Cavalli G., Barbara L.: "Timing of the first variceal hemorrhage in cirrhotic patients: prospective evaluation of Doppler flowmetry, endoscopy and clinical parameters". *Hepatology*, 1994; 20: 66-73.
- Sitzmann J.V., Campbell K., Wu Y., Clair C.: "Prostacyclin production in acute, chronic, and long-term experimental portal hypertension". *Surgery*, 1994; 115: 290-4.
- Sitzmann J.V., Li S.S., Adkinson N.F.: "Evidence for role of prostacyclin as a systemic hormone in portal hypertension". *Surgery*, 1991; 109: 149-153.
- Small K.M., McGraw D.W., Liggett S.B.: "Pharmacology and physiology of human adrenergic receptor polymorphisms". *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2003; 43: 381-411.
- Smith J.L., Graham D.Y.: "Variceal hemorrhage: a critical evaluation of survival analysis". *Gastroenterol.*, 1982; 82: 968-73.

- Søndergaard S.B., Knudsen J.H., Christensen N.J.: "Regulation of cAMP in a lymphocyte preparation isolated from peripheral venous blood in human subjects: the significance of residual thrombocytes, noradrenaline and prostaglandins". *Clin. Sci.*, 1998; 95: 377-383.
- Stadel J.M., Rebar R., Shorr R.G., Nambi P., Crooke S.T.: "Biochemical characterization of phosphorylated beta-adrenergic receptors from catecholamines-desensitized turkey erythrocyte". *Biochem.*, 1986 Jun 17; 25 (12): 3719-24.
- Stanley A.J., Hayes P.C.: "Portal hypertension and variceal haemorrhage". *Lancet*, 1997; 350: 1235-1239.
- Starke K.: "Influence of the alpha-receptor stimulates on noradrenaline release". *Naturinssenschaften*, 1971, 58: 420-7.
- Stein L., Wise C.D.: "Possible Etiology of schizophrenia: progressive damage to the noradrenergic reward system by 6-hydroxydopamine". *Science*, 1971; 171: 1032-1036.
- Steiner A.L., Pagliara A.S., Chase L.R., Kipnis D.M.: "Radioimmunoassay for cyclic Nucleotides II". *J. Biol. Chem.*, 1972; 247: 1114-1120.
- Stone R.A., Kirshner N., Robinson R.R.: "Changes of plasma dopamine-beta-hydroxylase activity and other plasma constituents during the cold-pressor test". *Life. Sci.*, 1974; 14: 1797-1805.
- Strada S.J., Duman R.S., Enna S.J.: "Analysis of neurotransmitter receptor-coupled cyclic nucleotide systems". *Methods in neurotransmitter receptor analysis*, edited by Henry I, Yamamura y cols. Raven Press. Ltd, New York. 1990.
- Strader C.D., Candelore M.R., Hill W.S., Dixon A.F., Sigal I.S.: "Identification of two serine residues involved in agonist activation of the  $\beta$ -adrenergic receptor". *J. Biol. Chem.*, 1989; 264: 13572-13580.
- Strader C.D., Fong T.M., Tota M.R., Underwood D.: "Structure and function of G-protein-coupled receptors". *Annu. Rev. Biochem.*, 1994; 63: 101-32.
- Strange P.G.: "G-protein coupled receptors: conformations and states". *Biochem. Pharmacol.*, 1999; 58: 1081-88.
- Strasser R.H., Lefkowitz R.J.: "Homologous desensitisation of  $\beta$ -adrenergic receptor coupled adenylate cyclase". *J. Biol.Chem.*, 1985; 260 (7): 4561-4.
- Strasser R.H., Stiles G.L., Lefkowitz R.J.: "Translocation and uncoupling of the beta-adrenergic receptor in rat lung after catecholamines promoted desensitization in vivo". *Endocrinol.*, 1984; 115: 1392-1400.
- Summers R.J., Kompa A., Roberts S.J.: " $\beta$ -adrenoceptor subtypes and their desensitization mechanisms". *J. Aut. Pharm.*, 1997; 17 (6): 331-43.
- Sutherland E.W., Oye I., Butcher R.W.: "The action of epinephrine and the role of the adenyl cyclase in hormone action". *Recent. Prog. Horm. Res.*, 1965; 21: 623-46.
- Sutherland E.W., Rall T.W., Menon T.: "Adenyl cyclase. I. Distribution, preparation, and properties". *J. Biol. Chem.*, 1962; 237: 1220-7.
- Sutherland E.W.: *In cyclic AMP 5-13* (Academic Press, New York, 1971).
- Szentivanyi A.: "The beta-adrenergic theory of the atopic abnormality in bronchial asthma". *J. Allergy.*, 1968; 42: 203-32.
- Tadashi I., Kazuhiko O., Teruhiro S., Masahiro S., Ryohichi N., Makoto Y., Atsushi T., Kyuichi T.: "Noninvasive hemodynamic measurements of superior mesenteric artery in the prediction of portal pressure response to propranolol". *J. Hepatol.*, 1998; 28 (5): 847-55.

- Tage-Jensen U., Henriksen J.H., Christensen E., Widding A., Ring-Larsen H., Christensen N.J.: "Plasma catecholamines level and portal venous pressure as guide to prognosis in patients with cirrhosis". *J. Hepatol.*, 1988; 6 (3): 350-8.
- Teramoto T., Satonaka K., Kitazawa S., Fujimori T.: "p53 gene abnormalities are closely relate to hepatoviral infections and occur at a late stage of hepatocarcinogenesis". *Cancer. Res.*, 1994; 54: 231-5.
- Teran J.C., Imperiale T.F., Mullen K.D., Tavill A.S., McCullough A.J.: "Primary prophylaxis of variceal bleeding in cirrhosis: a cost-effectiveness analysis". *Gastroenterol.*, 1997; 112: 473-482.
- Thornton J.R., Dean H.G., Losowsky M.S.: "Do increased catecholamines and plasma methionine enkephalin in cirrhosis promote bleeding oesophageal varices?". *Quarterly Journal of Medicine* 1988, New series 68; 255: 541-551.
- Trevisani F., Sica G., Mainqua P., Santese G., De Notariis S., Caraceni D., Domenicali M., Zaca F., Grazi G.L., Mazziotti A., Cavallari A.: "Autonomic dysfunction and hyperdynamic circulation in cirrhosis with ascites". *Hepatol.*, 1999; 30 (6): 1387-92.
- Tromm A., Micklefield G.H., Huppe D.: "Bronchopulmonary manifestations of gastroenterologic and hepatic diseases". *Med. Klin. (Munich)*, 1997 Dec 15; 92 (12): 720-5.
- Tuvia S., Moses A., Gulayev N., Levin S., Korenstein R.: "β-adrenergic agonists regulate cell membrane fluctuations of human erythrocytes". *J. Physiol.*, 1999; 516 (3): 781-92.
- Ulmer A.J., Flad H.D.: "Discontinuous density gradient separation of human mononuclear leukocyte using Percoll as a gradient medium". *J. Immunol. Methods.*, 1979; 30: 1-10.
- Vallance P., Moncada S.: "Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide?". *Lancet*, 1991; 337: 776-8.
- Vatner D.E., Kuniya A., Mitsunori I., Ishikawa Y., Richard P., Charles J., Homcy C.P., Vatner S.F.: "Beta-adrenergic receptor-g protein-adenylyl cyclase signal transduction in the failing heart". *Am. J. Cardiol.*, 1999; 83: 80H-85H.
- Vaziri C., Downes P.: "G-protein-mediated activation of turkey erythrocyte phospholipase C by β-adrenergic and P<sub>2y</sub>-purinergic receptors". *Biochem. J.*, 1992; 284: 917-22.
- Venter J.C., Fraser C.M., Harrison L.C.: "Autoantibodies to β<sub>2</sub>-adrenergic receptors: a possible cause of adrenergic hyporesponsiveness in allergic rhinitis and asthma". *Science*, 1980; 207: 1361-3.
- Venter J.C.: "β-adrenoceptors, adenylyl cyclase, and the adrenergic control of cardiac contractility". In *adrenoceptors and catecholamines action*. Vol 1, part A. Editado por G. Kunos, John Wiley, 1981: 213-245.
- Vermeir M., Rodes E., Burvenich C.: "3HCGP-12177 binding to beta-adrenoceptors of intact bovine mononuclear leukocytes". *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 1993; 321: 103-11.
- Viallet A., Marleau D., Huet M.: "Hemodynamic evaluation of patients with intrahepatic portal hypertension. Relationship between bleeding varices and the portohepatic gradients". *Gastroenterol.*, 1975; 69 (6): 1297-1300.
- Villanueva C., Balanzo J., Novella MT.: "Nadolol plus isosorbide mononitrate compared with sclerotherapy for the prevention of variceal rebleeding". *N. Engl. J. Med.*, 1996; 334: 1624-1629.
- Villanueva C., Miñana J., Ortiz J., Gallego A., Soriano G, Torras X, Sainz S, Boadas J, Cusso X, Guarner C, Balanzo J.: "Endoscopic ligation compared with

- combined Treatment with nadolol and isosorbide mononitrate to prevent recurrent variceal bleeding". *N. Engl. J. Med.*, 2001; 345: 647-55.
- Viveros O.H., Arqueros L., Kirshner N.: "Release of catecholamines and dopamine beta-hydroxylase from the adrenal medulla". *Life. Sci.*, 1968; 7: 609-618.
  - Vlachogiannakos J., Goulis J., Patch D., Burroughs A.K.: "Review article: primary prophylaxis for portal hypertensive bleeding in cirrhosis". *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2000; 14 (7): 1-14.
  - Vorobioff J., Picabea E., Gamen M., Villavicencio R., Bordato J., Bessone F., Tanno H., Palazzi J., Sarano H., Pozzoli L.: "Propranolol compared with propranolol plus isosorbide dinitrate in portal hypertensive patients: long-term hemodynamic and renal effects". *Hepatology*, 1993; 18: 477-84.
  - Waldo G.L., Northup J.K., Perkins J.P., Harden T.K.: "Characterization of an altered membrane form of the  $\beta$ -adrenergic receptor produced during agonist-induced desensitization". *J. Biol. Chem.*, 1983; 258: 13900-8.
  - Walker J.K.L., Fong A.M., Lawson B.L., Savov J.D., Patel D.D., Schwartz D.A., Lefkowitz R.J.: " $\beta$ -arrestin-2 regulates the development of allergic asthma". *J. Clin. Invest.*, 2003; 112: 566-74.
  - Wei J., Ramchand C.N., Hemmings G.P.: "Possible control of dopamine beta-hydroxylase via a codominant mechanism associated with the polymorphic repeat at its gene locus in healthy individuals". *Hum. Genet.*, 1997; 99: 52-55.
  - Weiner N.: "Norepinephrine, epinephrine, and the sympathomimetic amines". En: Goodman-Gilman A., Goodman L.S., Gilman A., eds. *The pharmacological basis of therapeutics*. 7<sup>th</sup> edn. New York: MacMillan, 1985: 145-181.
  - Weinshilboum R., Axelrod J.: "Serum dopamine-beta-hydroxylase activity". *Circ. Res.*, 1971A ; 28: 307-315.
  - Weinshilboum R.M., Thoa N.B., Johnson D.G., Kopin, I.J., Axelrod J.: "Proportional release of norepinephrine and dopamine- $\beta$ -hydroxylase from sympathetic nerves". *Science*, 1971B; 174: 1349-1351.
  - Weinshilboum R.M.: "Serum dopamine beta-hydroxylase". *Pharmacol. Rev.*, 1978; 30: 133- 166.
  - Wieland K., Zuurmond H.M., Krasel C., Ijzerman A.P., Lohse M.J.: "Involvement of Asn-293 in stereospecific agonist recognition and in activation of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor". *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1996; 93: 9276-81.
  - Wiest R., Shah V., Sessa W.C., Groszmann R.J.: "NO overproduction by eNOS precedes hyperdynamic splanchnic circulation in portal hypertensive rats". *Am. J. Physiol.*, 1999; 276: G1043-G1051.
  - Williams L.T., Lefkowitz R. T.: "Receptor binding studies in adrenergic pharmacology". Editado por Raven Press. New. York , 1978.
  - Williams L.T., Snyderman R., Lefkowitz R.J.: "Identification of beta-adrenergic receptors in human lymphocytes by (-)(3H)alprenolol binding". *J. Clin. Invest.*, 1976; 57: 149-55.
  - Winer N., Carter C.: "Effect of cold pressor stimulation on plasma norepinephrine, dopamine beta-hydroxylase, and renin activity". *Life Sci*, 1977; 20: 887-894.
  - Wolf B., Harden K., Molinoff P.B.: "In vitro study of beta-adrenergic receptors". *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1977; 17: 575-604.
  - Wolf D.: "The management of variceal bleeding: past, present and future". *Grand Rounds*, 1999; 66 (1): 1-13.

- Wu T.C., Tong M.J., Hwang B., Les S.D., Hu M.M.: “Primary hepatocellular carcinoma and hepatitis E virus infection during childhood”. *Hepatology*, 1987; 7: 46-8.
- Yoshida T., Ninomiya K., Matsumoto T., Baatar D., Bandoh T.: “Glucagon and insulin metabolism in cirrhotic patients”. *Hepatogastroenterol.*, 1998 Mar-Apr; 45 (20): 468-71.
- Zabetian C.P., Anderson G.M., Buxbaum S.G., Cubells J.F.: “ A quantitative-trait analysis of human plasma-dopamine-beta-hydroxylase activity: evidence for a major functional polymorphism at the DBH locus”. *An. J. Hum. Genet.*, 2001; 68: 515-522.
- Zojajy H., Ahmadzadeh S.: “Assessment of autonomic nervous system function in patients with non-alcoholic cirrhosis”. *J. Kerman University of Medical Sciences*, 1994; 1(4): 155-160.



