



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Biociències

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia

2011

**PAPER DEL RECEPTOR DE CANNABINOIDES 1 (CB1) A LA
CIRROSI EXPERIMENTAL. EFECTE DEL BLOQUEIG DE CB1
SOBRE LES COMPLICACIONS DE LA CIRROSI**

Gemma Òdena Garcia

Memòria de la Tesi Doctoral presentada per optar al grau de Doctor en Biologia
Cel·lular per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Directors: Dr. Ramon Bartolí i Dr. Ramon Planas

Aquest estudi ha estat finançat amb ajuts del *Ministerio de Ciencia e Innovación* (FIS PI080809) així com amb fons del *Centro de Investigación Biomédica en Red en el Área temática de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (Ciberehd)*.

Als meus pares, pel seu suport incondicional
i per estimar-me tal i com sóc.

Abreviacions

2-AG	2-araquidonil glicerol
ADH	Hormona antidiürètica
ADN	Àcid desoxiribonucleic
AEA	Araquidonil-etanolamida o anandamida
ALT	Alaninaaminotransferasa
AST	Aspartataminotransferasa
CB1	Receptor de cannabinoides 1
CB2	Receptor de cannabinoides 2
CCl₃	Triclorur de carboni
CCl₄	Tetraclorur de carboni
ECM	Matriu extracel·lular (De l'anglès <i>extracellular matrix</i>)
EGF	Factor de creixement epidèrmic (De l'anglès <i>epidermal growth factor</i>)
FAAH	Amido hidrolasa dels àcids grassos (De l'anglès <i>fatty acid amino hidrolase</i>)
GALT	Teixit limfoide associat a l'intestí (De l'anglès <i>gut-associated lymphoid tissue</i>)
GLM	Ganglis limfàtics mesentèrics
GPCR	Receptors cel·lulars associats a proteïna G (De l'anglès <i>G-protein coupled receptor</i>)
HSC	Cèl·lules hepàtiques estelades (De l'anglès <i>hepatic stellate cells</i>)
Ig A	Immunoglobulina A
KC	Cèl·lules de Kupffer (De l'anglès <i>Kupffer cells</i>)
kDa	kilo daltons (unitats de massa atòmica)
LBP	Proteïna transportadora de lipopolisacàrid (De l'anglès <i>lipopolisaccharide binding protein</i>)
LPS	Lipopolisacàrid o endotoxina
MAGL	Lipasa de monoacilglicèrids (De l'anglès <i>monoacylglycerol lipase</i>)
mmHg	Mil·límetres de mercuri
NK	Cèl·lules NK o cèl·lules citocides naturals (De l'anglès <i>natural killer</i>)
NADA	N-araquidonil-dopamina
NMDA	N-metil-D-aspartat

Noladina	2-araquidonil glicerol
PBS	Tampó fosfat salí (De l'anglès <i>phosphate buffered saline</i>)
PBS-T	Tampó fosfat salí amb polisorbato (Del nom comercial en anglès del polisorbato <i>Tween</i>)
SDS-PAGE	Electroforesi en gel de poliacrilamida amb dodecilsulfat sòdic (De l'anglès <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SEC	Cèl·lules endotelials sinusoïdals (De l'anglès <i>sinusoïdal endothelial cells</i>)
SES	Sistema endocannabinoide de senyalització
SMA	α actina del múscul llis (De l'anglès <i>smooth muscle α-actin</i>)
SNC	Sistema nerviós central
TB	Translocació bacteriana
TGF-β1	Factor de creixement transformant β 1 (De l'anglès <i>transforming growth factor β1</i>)
THC	Δ -9-tetrahidrocannabinol
TNF-α	Factor de necrosi tumoral α (De l'anglès <i>tumor necrosis factor-α</i>)
TRPV1	Receptor vanilloide tipus 1 (De l'anglès <i>transient receptor potential vanilloid receptor 1</i>)
UFC	Unitats formadores de colònies
Virodamina	O-araquidonil etanolamina
vs.	Versus

Índex de continguts

Abreviacions	vi
Llista de figures	xiv
Llista de taules	xvi
Introducció	1
Cirrosi	3
1. Definició i aspectes generals	3
2. Etiologia i Classificació	4
3. Epidemiologia	5
4. Organització del fetge	6
5. Fisiopatologia de la cirrosi	9
6. Complicacions associades a la cirrosi	14
7. Model animal de cirrosi per tetraclorur de carboni	23
Sistema endocannabinoide de senyalització	28
1. Definició	28
2. Receptors de cannabinoides	29
3. Endocannabinoides	31
4. Lligands exògens dels receptors de cannabinoides	32
5. Funcions fisiològiques del sistema endocannabinoide de senyalització	34
6. Sistema endocannabinoide de senyalització a la malaltia hepàtica	35
Objectius	39
Hipòtesi	41
Objectius	41

Material i mètodes	43
Estudi <i>in vivo</i>	45
1. Animals i estabulació	45
2. Disseny Experimental	45
3. Inducció de la cirrosi	46
4. Temps de trànsit intestinal	47
5. Determinació de la pressió arterial	48
6. Laparotomia i recollida de mostres	48
7. Determinació de la pressió portal	48
8. Grau de derivació portosistèmica	48
9. Paràmetres analítics de funció hepàtica	50
10. Incidència de translocació bacteriana	50
11. Contingut bacterià ileal	50
12. Determinació dels nivells d'amoni a plasma i cervell	51
13. Edema cerebral de baix grau	51
14. Histologia del fetge i quantificació de la fibrosi	51
15. Estadística	53
Estudi <i>in vitro</i>	54
1. Animals i estabulació	54
2. Disseny Experimental	54
3. Aïllament i establiment dels cultiu primaris d'hepatòcits	55
4. Assaig a cultius primaris d'hepatòcits amb l'antagonista de CB1 rimonabant	56
5. Extracció de proteïnes totals	57
6. Determinació de CB1 i TGF- β per <i>Western Blot</i>	58
7. Determinació de TGF- β a plasma i sobrenedant d'hepatòcits	59
8. Determinació de TNF- α	59

Resultats	61
Estudi <i>in vivo</i>	63
1. Efecte de rimonabant sobre la histologia del fetge	63
2. Efecte de rimonabant sobre l'hemodinàmica portal i sistèmica	64
3. Efecte de rimonabant sobre la funció hepàtica	66
4. Efecte de rimonabant sobre la translocació bacteriana i els seus paràmetres associats	68
5. Efecte de rimonabant sobre paràmetres associats a l'encefalopatia hepàtica	70
Estudi <i>in vitro</i>	72
1. Efecte de rimonabant sobre l'expressió de CB1	72
2. Efecte de rimonabant sobre l'expressió de TGF- β	73
3. Efecte de rimonabant sobre l'expressió de TNF-alpha	75
Discussió	77
Conclusions	85
Bibliografia	89
Annex	107

Llista de figures

Figura 1: Comparació histològica d'un fetge sa i un fetge cirròtic.	3
Figura 2: Representació histològica de l'evolució de fetge normal fins a cirròtic.	4
Figura 3: Classificació de la cirrosi.	5
Figura 4: Estructura del lobel hepàtic.	6
Figura 5: Estructura del sinusoides hepàtic.	7
Figura 6: Activitats del miofibroblast activat.	9
Figura 7: Possibles orígens del miofibroblasts hepàtics.	10
Figura 8: Patogènia de la progressió a cirrosi hepàtica.	11
Figura 9: Dipòsit d'ECM al voltant dels hepatòcits.	11
Figura 10: Fisiopatologia de la hipertensió portal.	12
Figura 11: Patogènesi de la formació d'ascites.	15
Figura 12: Barrera de la mucosa intestinal i mecanismes de translocació bacteriana.	17
Figura 13: Classificació de l'encefalopatia hepàtica.	20
Figura 14: Mecanisme d'acció del CCl ₄ sobre l'hepatòcit.	24
Figura 15: Estructura química dels endocannabinoides.	29
Figura 16: Representació esquemàtica dels receptors CB1 i CB2.	30
Figura 17: Esquema del disseny experimental de l'estudi <i>in vivo</i> .	46
Figura 18: Disseny experimental de l'estudi <i>in vitro</i> .	54
Figura 19: Disseny de l'assaig <i>in vitro</i> en cultius primaris d'hepatòcits.	57
Figura 20: Efecte de rimonabant sobre la fibrosi hepàtica.	63
Figura 21: Talls histològics representatius de cada grup.	64
Figura 22: Efecte de rimonabant sobre la pressió arterial mitja.	65
Figura 23: Efecte de rimonabant sobre les derivacions portosistèmiques.	65
Figura 24: Efecte de rimonabant sobre la pressió portal.	66
Figura 25: Efecte de rimonabant sobre la diferència de pes corporal.	67
Figura 26: Efecte de rimonabant sobre la incidència de translocació bacteriana.	68
Figura 27: Contingut bacterià jejunal.	69
Figura 28: Trànsit intestinal.	69
Figura 29: Efecte de rimonabant sobre els nivells d'amoni plasmàtic.	70
Figura 30: Efecte de rimonabant sobre els nivells d'amoni cerebral.	71

Figura 31: Efecte de rimonabant sobre l'edema cerebral de baix grau.	71
Figura 32: Expressió del receptor de cannabinoides CB1 a teixit hepàtic.	72
Figura 33: Expressió de receptor de cannabinoides CB1 a cultius primaris d'hepatòcits.	73
Figura 34: Efecte de rimonabant sobre els nivells d'expressió de TGF- β a teixit hepàtic.	74
Figura 35: Efecte de rimonabant sobre els nivells plasmàtics de TGF- β .	74
Figura 36: Nivells de TGF- β a sobrenedants de cultius primaris d'hepatòcits.	75
Figura 37: Efecte de rimonabant sobre els nivells de TNF- α a teixit hepàtic.	76
Figura 38: Nivells de TNF- α a sobrenedants de cultius primaris d'hepatòcits de 24h.	76

Llista de taules

Taula 1: Taxa de mortalitat per cirrosi hepàtica.	6
Taula 2: Graus clínics d'encefalopatia hepàtica.	20
Taula 3: Dosi de CCl ₄ segons el període de tractament.	47
Taula 4: Classificació de Scheuer	52
Taula 5: Efecte de rimonabant sobre diferents paràmetres bioquímics de funció hepàtica.	67

Introducció

Cirrosi

1. Definició i aspectes generals

La cirrosi és una malaltia crònica, difusa i considerada generalment irreversible, caracteritzada per l'alteració de l'arquitectura vascular hepàtica provocada pel reemplaçament del teixit parenquimàtic del fetge per teixit fibròtic, així com per l'aparició de nòduls de regeneració com a resultat del procés de substitució del teixit danyat. Aquesta destrucció del teixit hepàtic i la seva substitució per teixit fibrós provoca un augment marcat de la resistència al flux de la vena porta, així com una greu alteració de la funció hepàtica (Figura 1).

A més d'un risc augmentat d'aparició de càncer hepàtic, les complicacions més freqüents i potencialment mortals de la cirrosi, associades a la hipertensió portal, són l'hemorràgia digestiva, l'ascites i els trastorns de la funció renal, les infeccions bacterianes i l'encefalopatia hepàtica (Pardo et al. 2000, Dbouk, McGuire 2006, Llovet et al. 1996). De fet l'acumulació de fluid a la cavitat abdominal, coneguda com ascites és una de les complicacions més comunes a la cirrosi i està associada a un elevat risc d'infeccions (bacterièmies i peritonitis bacteriana espontània), en les quals el sobrecreixement bacterià i la translocació de bacteris intestinals i endotoxines des de la llum intestinal a la circulació sistèmica, juguen un paper important .

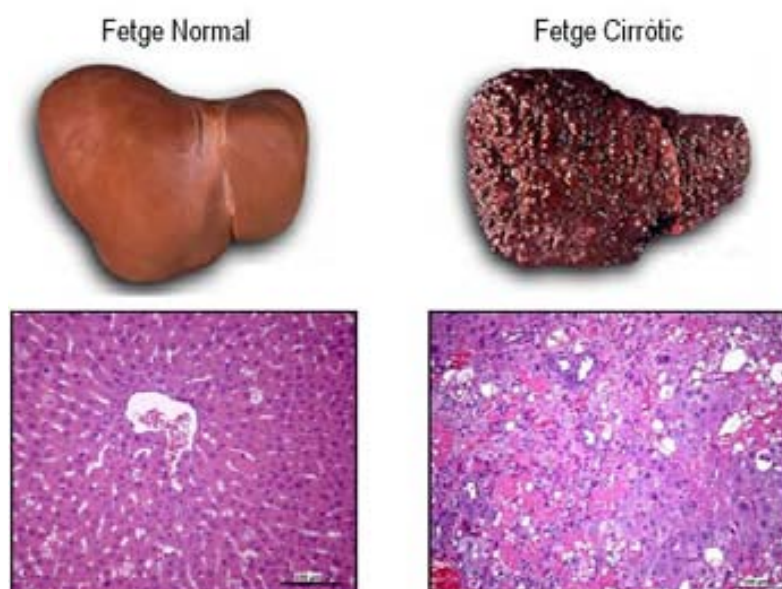


Figura 1: Comparació histològica d'un fetge sa i un fetge cirròtic.

2. Etiologia i Classificació

Les causes més freqüents de la malaltia al nostre país són, per aquest ordre: virus de l'hepatitis C (50% dels casos), ingesta excessiva d'alcohol (40%) i virus de l'hepatitis B (5%). Etiologies menys freqüents són altres infeccions (virus de l'hepatitis D), l'esteatohepatitis no alcohòlica, malalties autoimmunes, desordres metabòlics (malaltia de Wilson, hemocromatosi, dèficit d'alfa-1-antitripsina, glicogenòlisi, galactosèmia), malalties biliars (cirrosi biliar primària i colangitis esclerosant primària), Síndrome de Budd-Chiari i toxicitat produïda per toxines o fàrmacs. Actualment està augmentant la freqüència d'esteatohepatitis no alcohòlica causada per sobrepès o per alguna alteració metabòlica (diabetis o hipercolesterolèmia) en coincidència amb l'augment de l'obesitat al món desenvolupat. També augmenta el nombre d'hepatitis tòxiques, especialment causades per medicaments.

En resposta al dany hepatocel·lular provocat per les diverses etiologies s'inicia al fetge una resposta inflamatòria per tal de reparar el teixit hepàtic. Aquesta resposta inflamatòria si es perpetua en el temps pot desencadenar un procés de fibrosi. La fibrosi hepàtica és un procés de remodelació tissular que comporta canvis en la formació, composició i degradació de la matriu extracel·lular (ECM) al fetge. Si el dany hepàtic perdura i el procés esdevé crònic, s'altera el dipòsit de matriu extracel·lular, es dona necrosi hepatocel·lular i s'altera l'estructura parenquimàtica del fetge, amb l'aparició de nòduls de regeneració, conduint a l'aparició de la cirrosi (Figura 2).

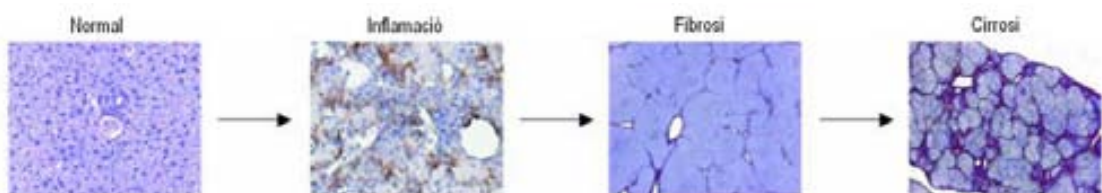


Figura 2: Representació histològica de l'evolució de fetge normal fins a cirròtic.

(Adaptació de Iredale 2007).

A mida que la malaltia progressa i com a conseqüència de la desorganització cel·lular es desencadena insuficiència hepàtica i hipertensió portal. Aquests són els responsables al seu torn de l'aparició de les complicacions associades a la cirrosi esmentades anteriorment. Si la cirrosi no s'associa a complicacions s'anomena cirrosi compensada i en el cas de l'aparició d'una o més complicacions s'anomena cirrosi descompensada. La cirrosi compensada pot ser asimptomàtica,

ara bé, si hi ha una descompensació de la cirrosi el pronòstic empitjora i la supervivència disminueix (Figura 3).

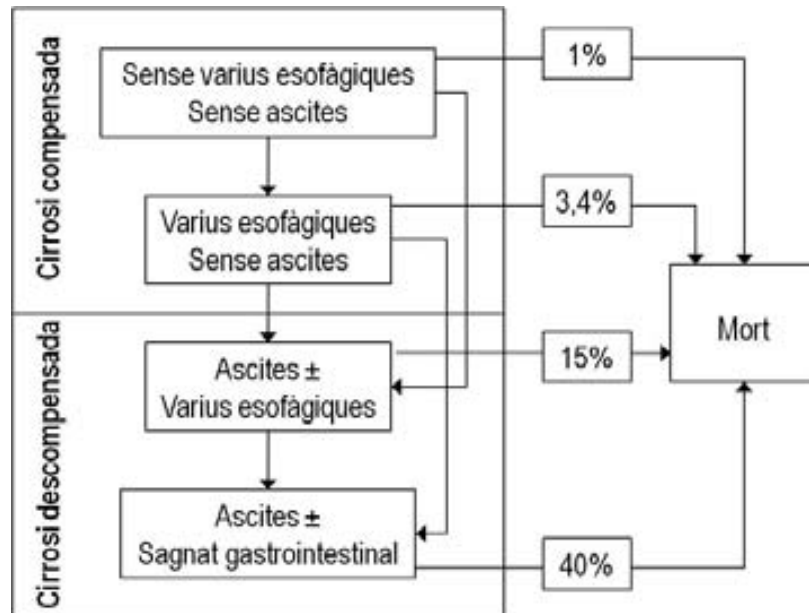


Figura 3: Classificació de la cirrosi i diferents probabilitats de mort a l'any de seguiment.

3. Epidemiologia

La mortalitat per cirrosi és un important problema de salut pública. A Europa, al 2002, van morir 95,609 homes i 53,123 dones per cirrosi, produint-se un gran percentatge d'aquestes morts en la franja d'edat dels 20 als 64 anys. Els estudis sobre les característiques dels pacients al moment del diagnòstic indiquen que la mitjana d'edat es situa al voltant dels 60 anys i que la majoria dels pacients són homes amb unes relacions de mortalitat per sexe que varien de país a país i que oscil·len de 2-6 homes/dona. La incidència varia segons el país i la regió i reflecteix les contribucions relatives de diferents factors de risc. Així, en aquells països on el consum d'alcohol és habitual, la cirrosi alcohòlica és el principal contribuent a la prevalença total de la cirrosi, mentre que en països amb un baix consum d'alcohol els principals contribuents són els virus de l'hepatitis. De fet les taxes de mortalitat per cirrosi alcohòlica han anat disminuint a tot el món, a excepció d'alguns països de l'Europa de l'Est i Anglaterra. A Estats Units per exemple, hi ha hagut un augment de la proporció de pacients amb virus de l'hepatitis C en comparació amb el nombre de pacients amb cirrosi alcohòlica (Nguyen, Segev & Thuluvath 2007). A Espanya també s'ha observat aquesta tendència a la disminució de la mortalitat (Taula 1), probablement

associada a la disminució en el consum d'alcohol durant els darrers 30 anys (Zatonski et al. 2010, Bosetti et al. 2007).

	1963–1965	1973–1975	1983–1985	1993–1995	2000–2002
Homes	24,8	32,1	30,1	21,1	14,1
Dones	10,2	10,5	8,5	5,4	3,5

Taula 1: Taxa de mortalitat per cirrosi/100.000 habitants amb edats entre 20-64 anys a Espanya de 1963 a 2002

4. Organització del fetge

El lobel hepàtic constitueix la unitat funcional del fetge. Constitueix una organització hexagonal estructurada al voltant d'una vena central a partir de la qual irradien columnes d'hepatòcits distribuïts en forma de cordons (Figura 4). La vena central desemboca a la vena hepàtica i aquesta a la vena cava inferior. Entre els cordons d'hepatòcits trobem capil·lars venosos, anomenats sinusoides, que reben sang de la vena porta (amb nutrients, poc oxigenada, provinent de l'estómac) i de l'artèria hepàtica (oxigenada, provinent del cor) i que conflueixen en la vena central. Les àrees triangulars situades als angles dels lobels hepàtics, es denominen espai porta o tríades portals. Estan constituïdes per estroma conjuntiu i contenen una branca de l'artèria hepàtica, una branca de la vena porta, un capil·lar limfàtic i un conducte biliar.

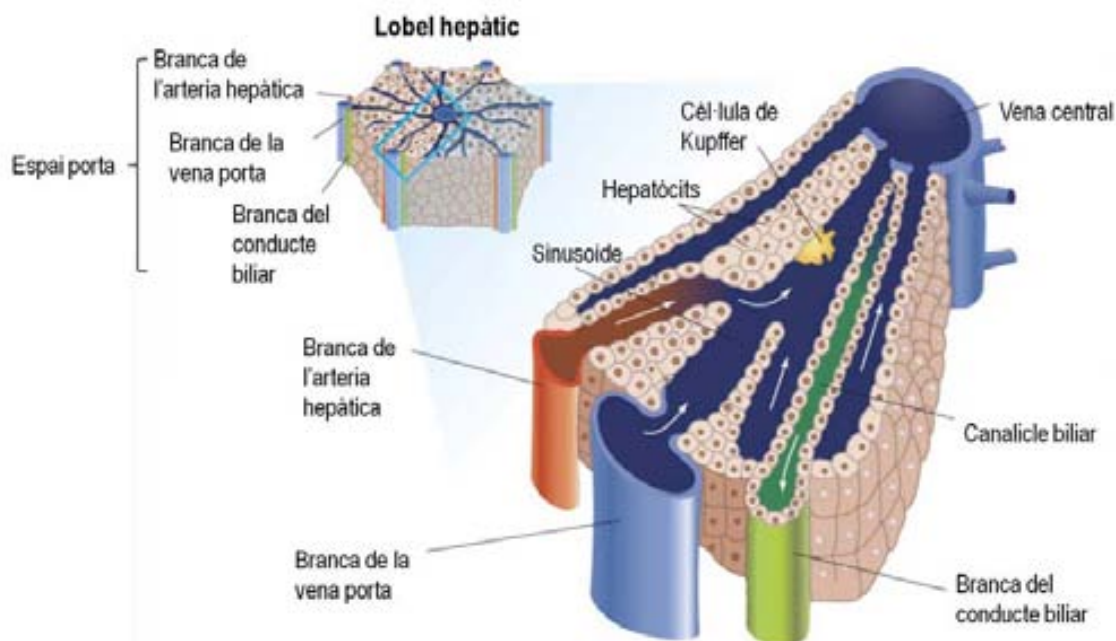


Figura 4: Estructura del lobel hepàtic. (Adaptació de Cunningham, Van Horn 2003)

La circulació de la sang al lobel hepàtic és centrípeta, circulant des de l'espai porta, a través dels sinusoides, cap a la vena central. En canvi la bilis produïda pels hepatòcits s'aboca a una xarxa de canalicles entre els cordons de hepatòcits i flueix de forma centrípeta cap als conductes biliars dels espais porta.

Les cèl·lules que conformen el lobel hepàtic es classifiquen com a cèl·lules parenquimàtiques, els hepatòcits, o com a cèl·lules no parenquimàtiques entre les quals trobem les cèl·lules hepàtiques estelades (HSC), cèl·lules endotelials sinusoïdals (SEC), cèl·lules de Kupffer (KC) i cèl·lules citotòxiques (*pit cells*). Aquests tipus cel·lulars ocupen determinades posicions respecte al sinusoide hepàtic. Així trobem que el sinusoide hepàtic és l'espai vascular delimitat per fileres d'hepatòcits i està constituït per cèl·lules endotelials sinusoïdals fenestrades disposades en línia i sense membrana basal. Al lumen del sinusoide hepàtic es localitzen les cèl·lules residents del sistema immunitari (KC i cèl·lules citotòxiques o *pit cells*) el qual es troba separat dels hepatòcits per l'espai de Disse a on trobem les HSC (Figura 5).

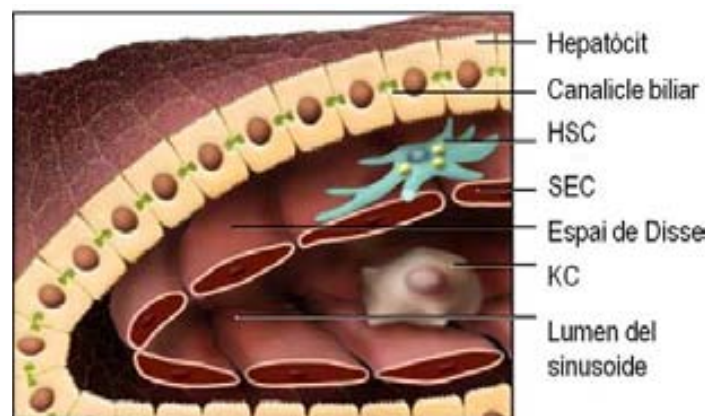


Figura 5: Estructura del sinusoide hepàtic. (Adaptació de Bataller, Brenner 2005).

Els hepatòcits són les cèl·lules parenquimàtiques del fetge i constitueixen més del 80% del volum hepàtic. Estructuralment s'agrupen en dobles fileres o cadenes d'hepatòcits anomenades cordons de Remark entre els sinusoides hepàtics. De forma polièdrica, sovint binucleats, la seva membrana plasmàtica presenta un domini sinusoïdal amb microvellositats orientat a l'espai de Disse i un domini lateral orientat a l'hepatòcit contigu. D'aquesta manera cada hepatòcit està en contacte amb els hepatòcits adjacents, el sinusoide hepàtic i el canalicle biliar (les membranes plasmàtiques de dos hepatòcits contigus delimiten un canalicle a on es secreta la bilis). Els hepatòcits realitzen la seva funció endocrina (metabolisme de carbohidrats i

lípidis i síntesi de proteïnes i factors de coagulació) a través del domini sinusoïdal, mentre que a través del domini lateral realitzen la seva funció exocrina (producció de bilis i metabolisme de productes tòxics).

Les cèl·lules endotelials sinusoïdals constitueixen aproximadament el 50% del total de cèl·lules no parenquimàtiques del fetge. Delimiten l'estructura del sinusoides hepàtic i dels vasos sanguinis i regulen la circulació. Entre elles existeixen fenestracions que permeten l'intercanvi de fluids i composts macromoleculars entre el sinusoides i l'espai de Disse.

Les cèl·lules de Kupffer representen gairebé el 30% de les cèl·lules no parenquimàtiques i són els macròfags residents del fetge. Es localitzen al lumen sinusoïdal, situades sobre les cèl·lules endotelials sinusoïdals des d'on emeten prolongacions citoplasmàtiques cap a l'espai de Disse. Així estan en contacte directe amb els hepatòcits i les cèl·lules estelades hepàtiques. En condicions fisiològiques fagociten partícules estranyes o alterades, alliberen mediadors citotòxics, participen en metabolisme de les lipoproteïnes i estan implicades en la captació i destoxicació de les endotoxines.

Les cèl·lules estelades hepàtiques representen el 20% del total de cèl·lules no parenquimàtiques i es localitzen a l'espai de Disse. Participen a l'homeòstasi d'aquest últim i en la regulació del flux sanguini del sinusoides hepàtic. Presenten un gran contingut de grànuls de vitamina A essent el reservori més gran d'aquesta a l'organisme. A més sintetitzen proteïnes de la matriu extracel·lular, actuen com a mediadors en processos de reparació del teixit hepàtic i poden promoure i amplificar la resposta inflamatòria en diverses patologies hepàtiques.

Les cèl·lules citotòxiques o pit cells representen al voltant del 3% de les cèl·lules no parenquimàtiques del fetge i són limfòcits granulars de gran grandària. Es caracteritzen com les cèl·lules NK (*natural killer*) residents de fetge i com a tals indueixen l'apoptosi en cèl·lules infectades o transformades.

5. Fisiopatologia de la cirrosi

5.1. Alteracions histològiques

Inflamació hepàtica

En resposta al dany hepatocel·lular s'inicia al fetge una resposta inflamatòria per tal de reparar el teixit hepàtic. La finalitat d'aquesta resposta és la reparació de la lesió i l'eliminació de cèl·lules i teixit necròtic. Els hepatòcits danyats alliberen citocines proinflamatòries (TNF- α , TGF- β 1, EGF) i espècies reactives d'oxigen. Aquests mediadors inflamatoris indueixen l'activació de la resta de cèl·lules hepàtiques, principalment cèl·lules de Kupffer, alhora que condueixen al reclutament de leucòcits del torrent sanguini. Aquestes activacions cel·lulars, juntament amb les citocines, activen la transformació de les HSCs d'un estat quiescent cap a la seva diferenciació en miofibroblasts (Figura 7). En el procés de transformació es perden els grànuls de vitamina A característics i els miofibroblasts expressen alfa actina del múscul llis (SMA) i esdevenen contràctils, secreten col·lagen i citocines proinflamatòries (Figura 6). Aquesta activació i la secreció de citocines afavoreix la infiltració de leucòcits del sistema immune i d'aquesta manera s'assoleix un estat inflamatori al fetge (Bataller, Brenner 2005, Ramadori et al. 2008, Friedman 2000, Friedman 2000).

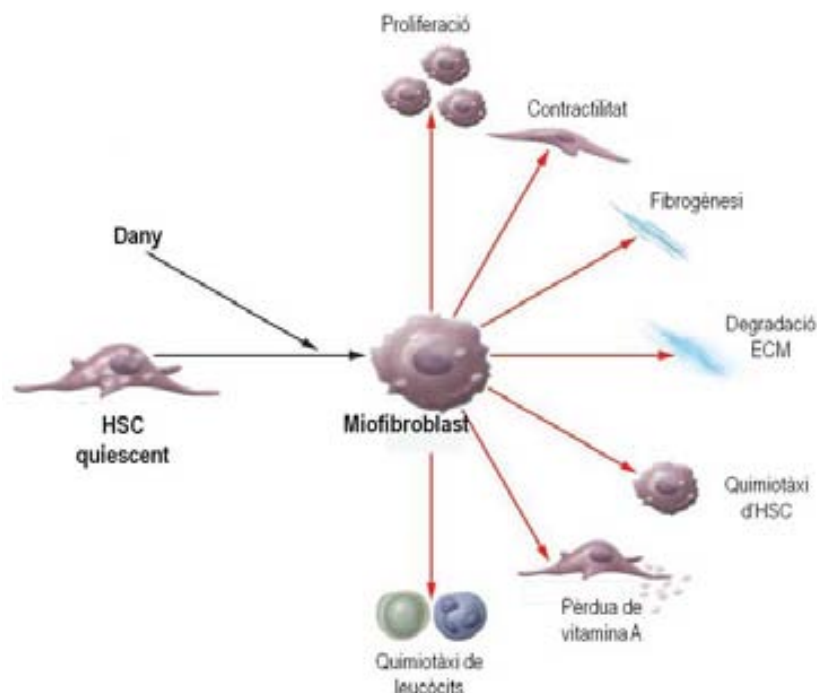


Figura 6: Activitats del miofibroblast activat. (Adaptació de Friedman 2000)

Tot i que amb les dades que es disposaven fins ara es creia que la població de miofibroblasts hepàtics provenia exclusivament de la transformació de cèl·lules estelades quiescents, estudis recents mostren que miofibroblasts portals i cèl·lules mare del moll de l'os també contribueixen a aquesta població. Actualment s'està estudiant la possibilitat que també es produeixi transformació d'hepatòcits i cèl·lules biliars epitelials cap a miofibroblasts hepàtics, contribuint d'aquesta manera a la població cel·lular fibrogènica a fetge (Iredale 2007).

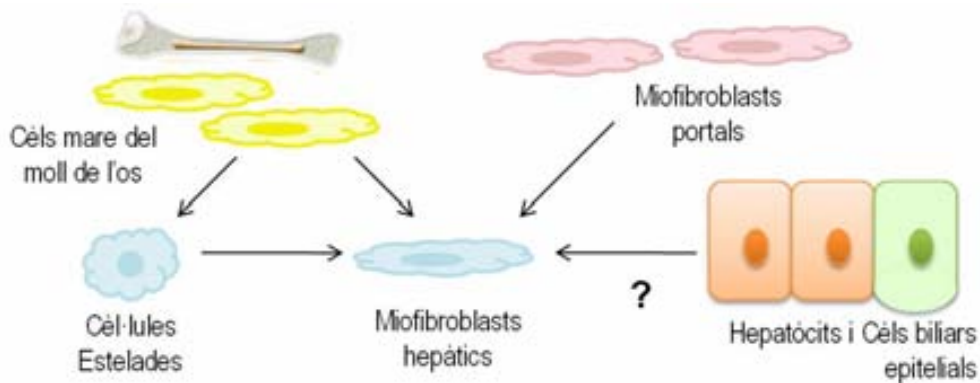


Figura 7: Possibles orígens del miofibroblasts hepàtics. (Adaptació de Iredale 2007)

Fibrosi

Si la presència de l'agent hepatotòxic es manté s'inicia el procés de la fibrogènesi. La fibrogènesi consisteix en un procés de reparació del dany hepàtic altament regulat, a través d'alteracions en la formació, la composició i la degradació de la matriu extracel·lular a l'espai de Disse dels lobels hepàtics. Durant aquest procés es produeix una acumulació d'ECM que genera barreres per la difusió de l'oxigen i els nutrients.

En aquesta fase els miofibroblasts activats proliferen i es produeix l'apoptosi dels hepatòcits que torna a estimular al seu torn la proliferació de miofibroblasts (Figura 8). La major presència de miofibroblasts secretors de col·lagen resulta en el dipòsit excessiu d'ECM. Els mecanismes de degradació d'ECM i de regeneració hepàtica no poden contrarestar aquesta acumulació i es passa així d'un estat inflamatori a un estat fibrogènic, en que els hepatòcits són substituïts per miofibroblasts que perpetuen la inflamació, augmenten la producció i el dipòsit de col·lagen i inhibeixen la degradació de col·lagen, conduint a un augment de la matriu extracel·lular i desorganitzant l'estructura del fetge. L'acumulació d'ECM contribueix a la pèrdua de microvellositats pels hepatòcits així com a la pèrdua de fenestracions per part de les cèl·lules endotelials, afavorint el deteriorament de la funció hepàtica (Bataller, Brenner 2005).

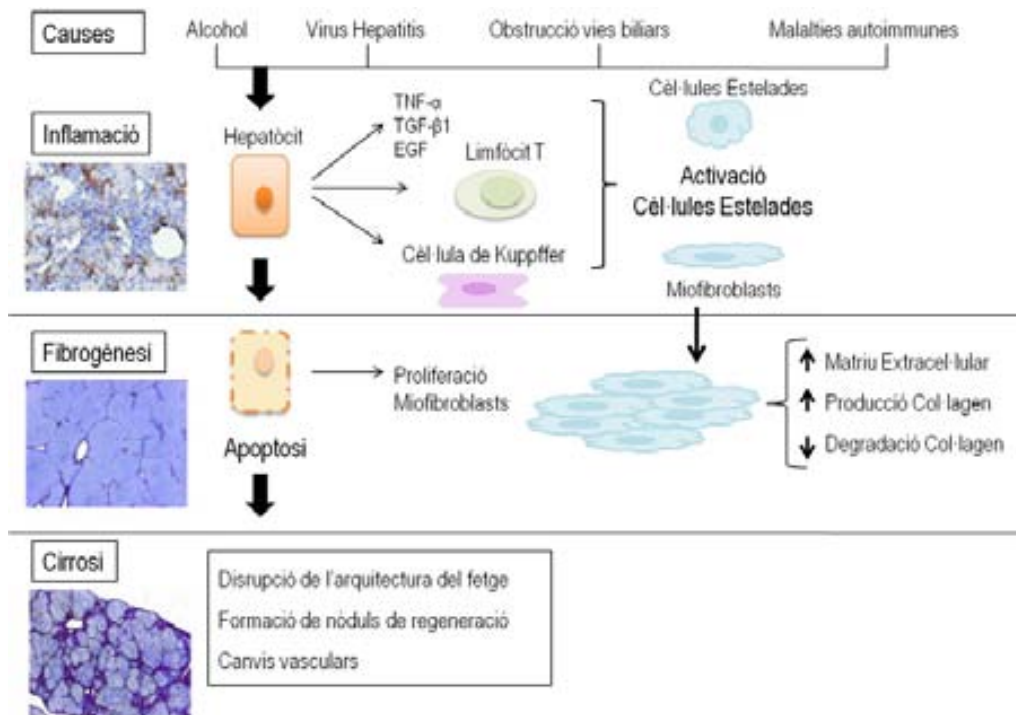


Figura 8: Patogènia de la progressió a cirrosi hepàtica. (Adaptació de Bataller, Brenner 2005).

Cirrosi

En les fases més avançades de la fibrosi, si l'hepatotòxic persisteix i el procés de reparació per fibrosi s'altera repetint-se el cicle d'inflamació i dipòsit de matriu extracel·lular a través de la proliferació desmesurada de miofibroblasts, es produeix la disrupció de l'arquitectura del fetge donant lloc a la cirrosi. El contingut total d'ECM augmenta de 3 a 5 vegades no només per l'augment en la seva síntesi si no també per la disminució de la seva degradació (Figura 9). Simultàniament, es donen canvis en la tipologia de l'ECM, passant d'una membrana basal de baixa densitat a una membrana rica en fibres de col·lagen. D'aquesta manera, disminueixen les fenestracions dels sinusoides i així es dificulta l'intercanvi entre aquests i l'espai de Disse.

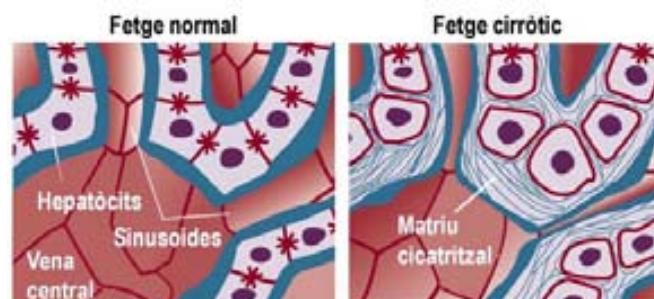


Figura 9: Dipòsit d'ECM al voltant dels hepatòcits. (Adaptació de Friedman 1997)

A més de la regeneració aberrant dels hepatòcits, es formen de nòduls de regeneració i canvis vasculars, impeding la consecució de les principals funcions del fetge arribant a un estat

cirròtic del fetge, a priori irreversible, que es caracteritza per la formació de septes i anells de fibra que rodegen els nòduls hepàtics.

5.2. Alteracions hemodinàmiques

Hipertensió portal

La hipertensió portal és la manifestació clínica més freqüent en la cirrosi. Es caracteritza per l'augment patològic del gradient de pressió entre la vena porta i la vena cava inferior (gradient de pressió portal) per sobre del seu interval de normalitat d'1-5 mmHg, la qual cosa origina la formació d'una xarxa extensa de vasos col·laterals que deriven part del flux sanguini portal cap a la circulació sistèmica i impedeixen el seu pas a través del fetge. Com a conseqüència d'aquest síndrome, poden aparèixer algunes de les complicacions més importants de la cirrosi com són les varices esofàgiques o l'ascites (Bosch, Garcia-Pagan 2000). El gradient de pressió portal depèn del flux sanguini i de la resistència vascular del sistema venós portal (Figura 10). Així la hipertensió portal s'inicia per un increment de la resistència al flux sanguini portal que es veu agreujat per un increment en l'aportació de sang portal venosa. L'origen de l'increment de la resistència al flux sanguini pot ser prehepàtic (trombosi de la vena porta), intrahepàtic (cirrosi) o posthepàtic (trombosi de la vena hepàtica o malaltia cardíaca) i els factors que hi contribueixen són principalment: la reducció en l'alliberament de vasodilatadors endògens (Gupta et al. 1998) i l'increment de l'activitat vasoconstrictora endògena (Bosch, Garcia-Pagan 2000).

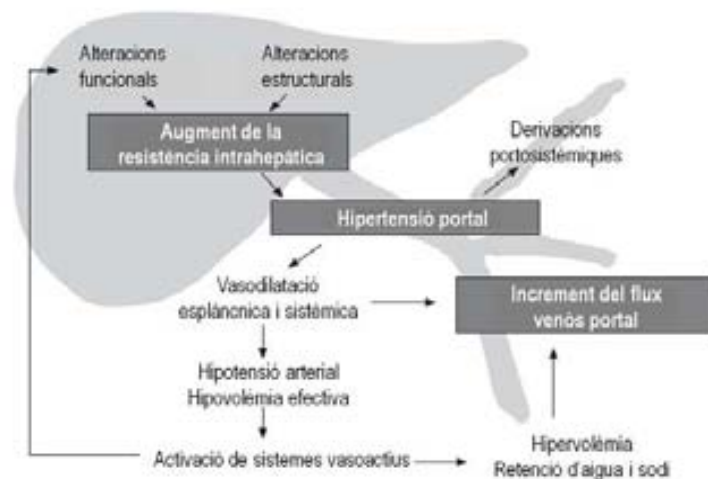


Figura 10: Fisiopatologia de la hipertensió portal. (Adaptació de Abralde, Garcia-Pagan & Bosch 2004)

A la cirrosi es dona un augment de la resistència intrahepàtica degut a la disrupció de l'arquitectura vascular hepàtica (Shibayama, Nakata 1985). Aquest és un component fix de resistència intrahepàtica. No obstant, una part d'aquest augment és dinàmic i, per tant, potencialment reversible, ja que es produeix per un augment del to vascular intrahepàtic (Bhathal, Grossman 1985). Els miofibroblasts responen amb contracció o relaxació a diverses substàncies vasoactives i podrien generar forces de tracció al teixit cicatricial, disminuint el diàmetre de les vèdules portals i afectant d'aquesta manera a la resistència intrahepàtica (Pinzani, Gentilini 1999).

A més d'aquestes alteracions estructurals, la resistència intrahepàtica es pot modular per diverses substàncies vasoconstrictores i vasodilatadores. Aquestes substàncies poden ser d'origen hepàtic (òxid nítric, prostaciclina, endotelina, tromboxà, leucotriens), neural (noradrenalina) o provenir de la circulació sistèmica (angiotensina II, vasopressina). A la cirrosi es produeix un desequilibri que comporta un excés de substàncies vasoconstrictores i un dèficit de substàncies vasodilatadores, a més d'una resposta augmentada a les primeres i disminuïda a les darreres.

Derivacions portosistèmiques. La seva aparició és crucial pel desenvolupament de les complicacions associades a la hipertensió portal, com l'hemorràgia per varices esofàgiques i l'encefalopatia hepàtica. S'originen com a conseqüència de la hipertensió portal, proporcionant una ruta cap a territoris de menor pressió i es formarien tant per l'obertura de canals ja preexistents com per formació *de novo* de vasos sanguinis. Fins a un 90% del flux sanguini portal pot circular a través d'aquests vasos. Tot i això, aquesta descompressió esdevé ineficaç i els graus màxims de derivacions portosistèmiques s'associen amb màxims d'hipertensió portal.

Circulació hiperdinàmica

La síndrome de circulació hiperdinàmica a la cirrosi es caracteritza per una reducció de les resistències vasculars sistèmiques, així com per hipotensió arterial i augment de la despesa cardíaca (Reuben 2003). També es produeix un augment del flux sanguini a través de les derivacions portosistèmiques (Vorobioff, Bredfeldt & Groszmann 1984). Aquestes alteracions són responsables de l'aparició de diferents complicacions com l'ascites, la síndrome hepatorenal i la síndrome hepatopulmonar.

La circulació hiperdinàmica es produeix com a conseqüència de la vasodilatació de la circulació perifèrica i esplàncnica, així com per l'expansió del volum plasmàtic. S'han de produir tots dos fenòmens per tal que s'estableixi la circulació hiperdinàmica.

L'augment del flux sanguini portosistèmic és una de les seves principals manifestacions, i es produeix per la vasodilatació arteriolar als òrgans esplàncnics que drenen al sistema venós portal. Aquesta vasodilatació condueix a una situació en que l'insuficient cabdal relatiu de la circulació arterial activa els baroreceptors, alhora que s'activen el sistema nerviós simpàtic i el sistema renina-angiotensina-aldosterona i es secreta vasopressina. L'activació d'aquests sistemes produeix retenció de sodi i aigua per part del ronyó, i d'aquesta manera augmenta el volum plasmàtic (Schrier et al. 1988).

6. Complicacions associades a la cirrosi

6.1. Ascites

L'ascites es defineix com l'acumulació de líquid a la cavitat peritoneal. És la complicació més freqüent de la cirrosi i la seva aparició implica un mal pronòstic a mig termini. Aproximadament la meitat de pacients cirròtics desenvolupen ascites en els 10 anys següents al diagnòstic de la malaltia si no es tracta el factor desencadenant i la taxa de mortalitat a un any és del 15% i del 44% als 5 anys (Planas et al. 2006). L'ascites és un indicador de descompensació de la cirrosi, alhora que predisposa a l'aparició d'altres complicacions com el desenvolupament de peritonitis bacteriana espontània, d'hiponatremia dilucional i de la síndrome hepatorenal.

La formació d'ascites està relacionada principalment amb dos mecanismes patogènics: la hipertensió portal i la retenció renal de sodi (Figura 11). La hipertensió portal conduiria a una vasodilatació arteriolar esplàncnica, que al seu torn es traduiria en una disminució de la resistència vascular perifèrica total donant lloc a una reducció del volum plasmàtic efectiu. Aquesta alteració al volum plasmàtic activa els baroreceptors, estimulants el sistema renina-angiotensina-aldosterona i el sistema nerviós simpàtic, alhora que provoca una hipersecreció d'hormona antidiürètica. Es produeix retenció renal de sodi i aigua i d'aquesta manera s'augmenta el volum plasmàtic. Aquest augment és suficient per compensar la vasodilatació esplàncnica a les fases inicials, però no en fases avançades on persisteix l'activació dels sistemes vasoactius, mantenint-se la retenció renal de sodi i aigua i agreujant-se la hipertensió portal degut a l'augment del flux esplàncnic. La principal conseqüència d'aquestes alteracions és l'alliberament de fluid del sinusoides hepàtics (degut a l'augment de pressió) i dels capil·lars

esplàncics (degut a l'augment del flux sanguini) cap a l'espai intersticial. Aquest alliberament es compensa inicialment per un increment en el retorn de fluid a la circulació sistèmica a través de del sistema limfàtic. Però a mida que progressa la cirrosi l'alliberament de fluid supera el retorn limfàtic provocant-ne una acumulació progressiva a la cavitat peritoneal que s'acompanya d'una activació del mecanisme de reabsorció de sodi i aigua que perpetua la formació d'ascites (Schrier et al. 1988).

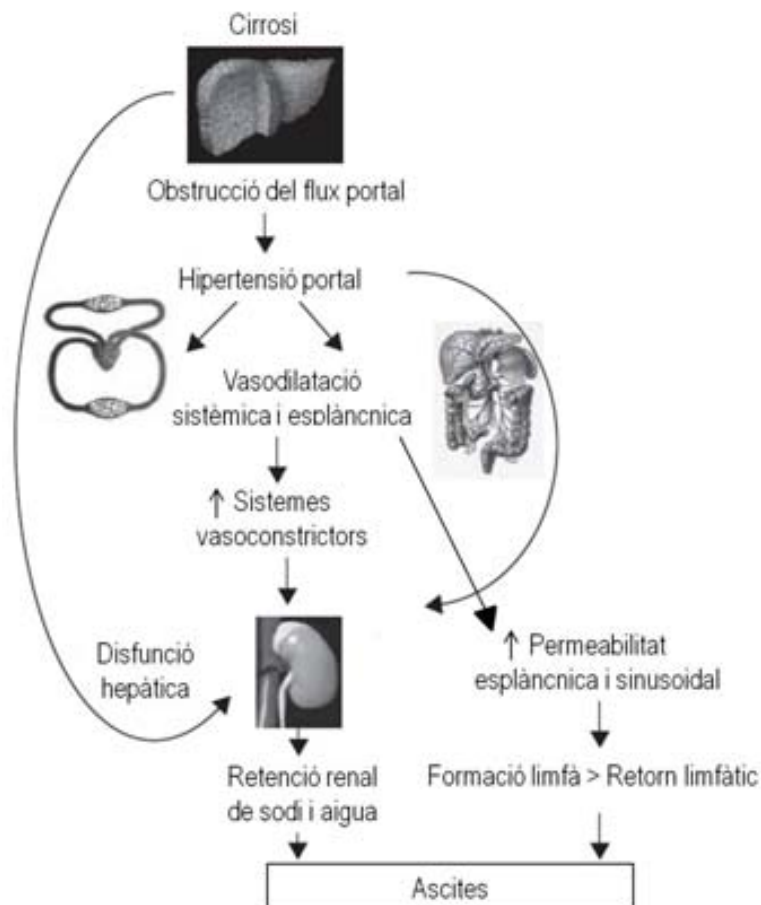


Figura 11: Patogènesi de la formació d'ascites. (Adaptació de Leung, Wong 2011)

6.2. Translocació bacteriana

La translocació bacteriana (TB) es defineix com el pas de bacteris viables des de la llum intestinal fins als ganglis mesentèrics o altres vísceres de l'organisme (Berg, Garlington 1979). Aquest pas de bacteris és un fenomen fisiològic normal donat que el sistema immunitari elimina els pocs gèrmens que arriben als ganglis limfàtics mesentèrics (GLM). En canvi quan el pas de bacteris s'associa a una resposta inflamatòria local o sistèmica, o bé, si es produeix una

disseminació de bacteris cap a la sang o la limfa, llavors la translocació bacteriana esdevé un fenomen patològic.

En models experimentals la translocació bacteriana es pot definir com el cultiu bacterià positiu als GLM. Ara bé, aquesta definició es basa en la presència de bacteris viables als GLM obviant que moltes de les conseqüències de la translocació bacteriana són desencadenades per productes bacterians com la endotoxina o lipopolisacàrid (LPS) (Gonzalez Alonso, Gonzalez Garcia & Albillos Martinez 2007). A nivell clínic però, no hi ha mètodes no invasius pel diagnòstic dels GLM i molts dels episodis de bacterièmia no es diagnostiquen. Per aquest motiu, alguns estudis (Albillos et al. 2003, Such et al. 2002) proposen com a marcadors alternatius de translocació bacteriana la detecció d'ADN bacterià en sèrum i líquid ascític, així com un augment de la concentració sèrica de la proteïna transportadora de LPS (LBP).

Mecanisme de la translocació bacteriana

La hipòtesi més àmpliament acceptada sobre el mecanisme de translocació postula l'existència de dos processos diferenciats: un lent, per endocitosi dels bacteris, i un altre ràpid, per pas a través de solucions de continuïtat de la mucosa intestinal (Wells, Maddaus & Simmons 1988).

En el procés lent, els bacteris del tracte intestinal s'adhereixen a la mucosa intestinal abans d'iniciar-ne la penetració. Aquesta unió es produeix, probablement, mitjançant el glicocàlix del bacteri i el de les microvellositats de l'enteròcit (Alexander et al. 1990). Les plaques de Peyer intestinals i les cèl·lules M (enteròcits especialitzats en la captació d'antígens luminals) facilitarien el pas dels bacteris intestinals a través de la mucosa. Es creu que aquest pas es produeix, principalment, per un mecanisme d'endocitosi tot i que no es pot descartar, que els bacteris accedeixin per un pas intercel·lular a través de les unions estretes, si la barrera està suficientment alterada (Figura 12).

La translocació ràpida succeeix quan hi ha una lesió molt evident de la mucosa, amb pas massiu de gèrmens a la làmina pròpia. Només en aquesta situació s'ha documentat la translocació de gèrmens anaerobis intestinals, fet del tot infreqüent. Tot i que els bacteris anaeròbics són superiors als bacteris aeròbics en una proporció de 100 o 1000 a 1, són els bacteris aeròbics els que majoritàriament transloquen l'epiteli intestinal (Wiest, Garcia-Tsao 2005).

En condicions normals, un cop els bacteris han accedit a la làmina pròpia o bé són destruïts pels macròfags o pels limfòcits del teixit limfoide associat a l'intestí (GALT), o bé són transportats als ganglis mesentèrics locals. En alguns casos, però, degut a alteracions immunitàries, a un excés de gèrmens o per d'altres causes, els macròfags es limiten a transportar al seu interior els bacteris cap els ganglis mesentèrics sense lisar-los. Els bacteris llavors proliferen als GLM provocant una reacció inflamatòria en aquests, amb l'alliberament de citocines proinflamatòries i amb la posterior disseminació de bacteris al torrent circulatori. El germen translocat pot seguir una ruta o bé limfàtica o bé portal depenent de múltiples factors (Balzan et al. 2007). Alguns autors especulen que la translocació lenta és principalment limfàtica, mentre que en la translocació ràpida l'excés de gèrmens fa que accedeixin a la circulació general per un drenatge predominantment portal (Alexander et al. 1990).

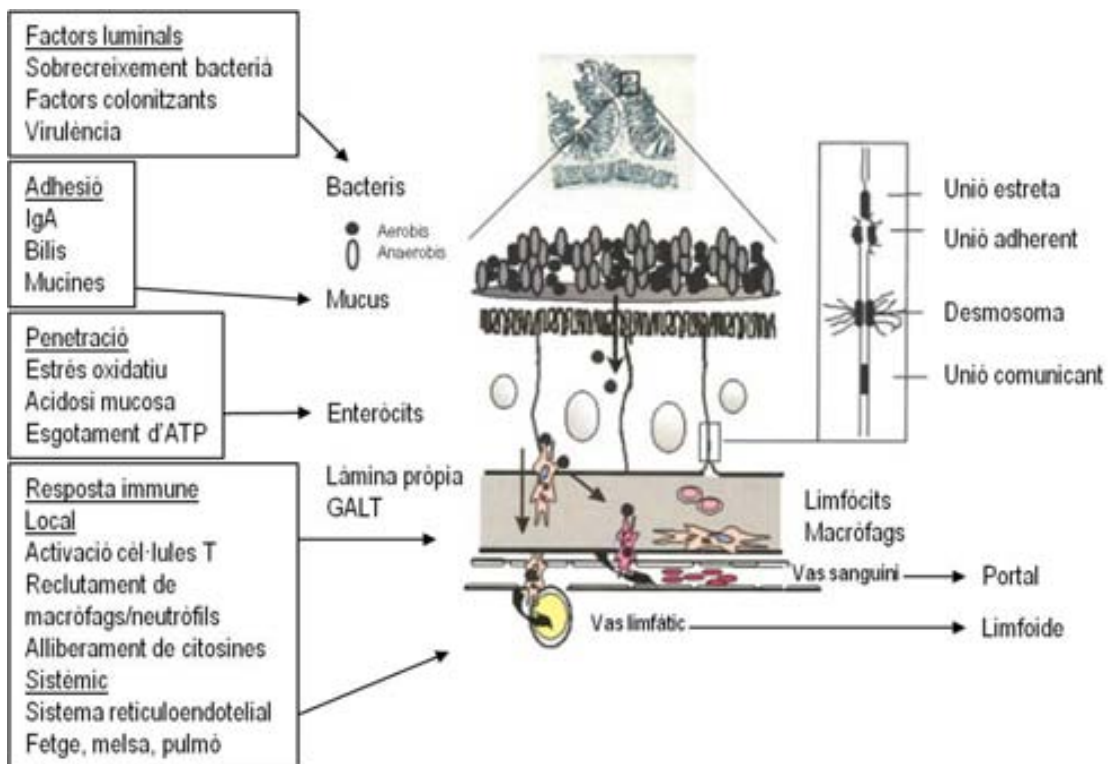


Figura 12: Barrera de la mucosa intestinal i mecanismes de translocació bacteriana.

(Adaptació de Wiest, Garcia-Tsao 2005)

Patogènesi de la translocació bacteriana

La translocació bacteriana es produeix quan hi ha una alteració marcada d'un o més dels mecanismes que fan de la mucosa intestinal una barrera mecànica i immunitària contra els bacteris intestinals. Aquests mecanismes són, principalment, la presència d'una microflora que impedeixi el sobrecreixement bacterià, la integritat de la barrera epitelial intestinal i la integritat

del sistema immunitari (Gonzalez Alonso, Gonzalez Garcia & Albillos Martinez 2007, Almeida et al. 2006).

Alteració de la flora intestinal. El budell prim pot considerar-se, en condicions normals, un medi pràcticament estèril. L'activitat motora intestinal exerceix una funció reguladora fonamental del contingut bacterià del budell prim. Així, la seva alteració pot afavorir la proliferació bacteriana intestinal fins arribar a proporcions anormals, és a dir es dona un sobrecreixement bacterià intestinal. De fet, en estudis experimentals en animals amb cirrosi estratègies per incrementar la motilitat intestinal, com el tractament amb cisapride o propanolol, han mostrat una reducció del sobrecreixement bacterià, així com de la translocació bacteriana (Pardo et al. 2000, Perez-Paramo et al. 2000). El sobrecreixement bacterià s'observa en un 20-70% dels pacients cirròtics i els gèrmens entèrics gramnegatius són els causants més habituals d'infecció en la cirrosi.

Disrupció directa de la mucosa intestinal. Les lesions de l'epiteli intestinal són, potser, el factor més clar desencadenant de translocació. Morehouse et al. 1986 van observar, després de l'administració oral d'àcid ricinoleic a rates, l'aparició de solucions de continuïtat a la mucosa duodenal i ileal amb fàcil accés dels bacteris, a la làmina pròpia i, posteriorment, als ganglis mesentèrics. Fenòmens semblants s'han descrit també en humans, amb patologies que *per se* presenten úlceres intestinals, com ara la malaltia de Crohn i les neoplàsies de colon, en les quals la TB és un fenomen documentat (Lescut et al. 1990, Ambrose et al. 1984).

La isquèmia intestinal ha resultat ser un dels factors més àmpliament avaluats en els estudis de translocació bacteriana. La hipoperfusió i la hipoxèmia intestinal poden ser produïdes per múltiples causes, entre les que destaquen el xoc hipovolèmic, l'endotoxèmia, i la inestabilitat hemodinàmica pròpia de les situacions crítiques (politraumatismes, grans cremats) (Deitch et al. 1990b, van Deventer, ten Cate & Tytgat 1988).

Alteració de la immunitat local i sistèmica. Atès que els bacteris intestinals són els responsables de nombroses infeccions en pacients immunodeprimits, sembla lògic assumir que les disfuncions immunitàries poden ser factors potencialment afavoridors de la translocació bacteriana. Així, estudis experimentals mostren que les cèl·lules plasmàtiques (secretores d'Ig A) juguen un paper important en el control del primer pas dels microorganismes a través de la mucosa intestinal, observant-se una correlació inversa entre el nombre de cèl·lules plasmàtiques

a la làmina pròpia cecal i la incidència de translocació bacteriana (Wells, Maddaus & Simmons 1988).

L'alteració en el funcionalisme dels macròfags també afavoreix la translocació bacteriana. Els macròfags de la mucosa intestinal, o les cèl·lules M de les plaques de Peyer, fagociten i destrueixen els bacteris i els condueixen fins als ganglis mesentèrics. Tanmateix, quan hi ha una alteració en la destrucció intracel·lular dels macròfags, els gèrmens quedaran lliures en els conductes limfàtics o en els propis ganglis mesentèrics (Alexander et al. 1990).

Pel que fa a la immunitat sistèmica, tant les alteracions de la immunitat cel·lular com l'administració d'immunosupressors o immunomoduladors sistèmics (quimioteràpia o corticoides) predisposen a l'aparició de translocació bacteriana.

Malnutrició. La malnutrició també s'ha implicat en l'aparició de translocació bacteriana. En models experimentals la malnutrició altera la flora cecal afavorint el sobrecreixement de gèrmens gramnegatius (Deitch et al. 1990a). A més, alguns estudis mostren que altera la integritat de la mucosa intestinal, atrofiant-la i disminuint l'alçada de les vellositats i el gruix i profunditat de les criptes (Katayama et al. 1997). En darrer terme, la malnutrició s'ha associat a una sèrie d'alteracions immunitàries, com la disminució d'Ig A-secretora dels sucres intestinals, la disminució de les poblacions limfocítiques sistèmiques i l'alteració en la capacitat fagocítica i bactericida dels polimorfonuclears enfront dels bacteris i fongs (Napolitano et al. 1995). Totes aquestes alteracions, juntament amb l'evidència d'un major risc d'infeccions en els malalts desnodrits (O'Keefe et al. 1980), suggereixen que la malnutrició predisposaria a la translocació bacteriana encara que no hi ha en l'actualitat evidències directes que documentin aquesta hipòtesi (Deitch, Winterton & Berg 1987).

6.3. Encefalopatia hepàtica

L'encefalopatia hepàtica (EH) es defineix com els canvis produïts a la funció neurològica com a conseqüència d'una malaltia hepàtica. Engloba una àmplia gama de símptomes neurològics i neuropsíquics que presenten els malalts amb insuficiència hepàtica greu, aguda o crònica i que no es poden atribuir a d'altres malalties o a malalties hepàtiques associades a símptomes neurològics com la malaltia de Wilson. Aquesta complicació és especialment freqüent en pacients cirròtics, estant present fins en un 50-70% dels casos (Blei 2001, Riordan, Williams

1997). Tot i que es tracta d'un trastorn potencialment reversible, la seva presència és un marcador de mal pronòstic donat que implica una escassa reserva hepàtica funcional.

Les manifestacions clíniques de la EH comprenen una ampla gama d'alteracions neuropsíquiques de diversa gravetat com ara alteracions psicomotrius, intel·lectuals, cognitives, emocionals, de comportament i sobre les funcions motores fines (Taula 2).

Grau I	Falta de consciència, eufòria o ansietat i temps reduït d'atenció
Grau II	Letargia, apatia, desorientació mínima del temps i l'espai, canvis de personalitat i comportament inadequat
Grau III	Somnolència, confusió i desorientació
Grau IV	Coma

Taula 2: Graus clínics d'encefalopatia hepàtica.

Al Congrés Mundial d'Encefalopatia Hepàtica del 1998, es va proposar una classificació tenint en compte el seu origen o causa (Figura 13). Així el tipus A estaria associat a una lesió hepàtica aguda, mentre que el tipus B, estaria relacionat amb derivacions portosistèmiques i el tipus C es relacionaria amb cirrosi i hipertensió portal amb derivacions portosistèmiques. Cal fer menció especial de l'encefalopatia hepàtica mínima en que, a diferència de l'EH establerta, presenta un estatus neurològic normal a nivell clínic però és detectable mitjançant els resultats anormals d'alguns tests psicomètrics específics.

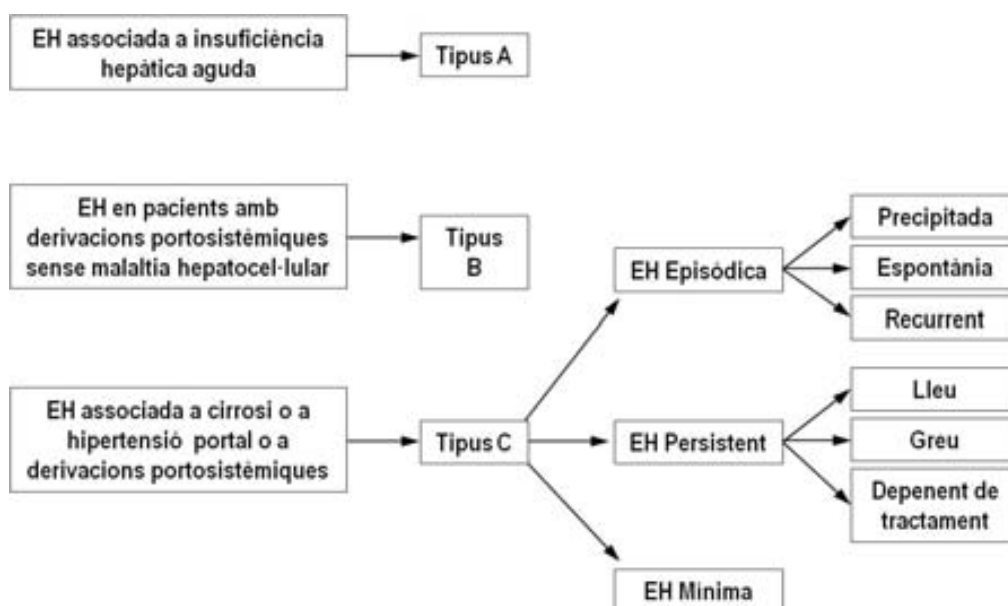


Figura 13: Classificació de l'encefalopatia hepàtica proposada al Congrés Mundial d'Encefalopatia Hepàtica del 1998. (Adaptació de Prakash, Mullen 2010)

Patogènesi de l'encefalopatia hepàtica

La patogènesi de la EH actualment no està clarament definida i sembla que pot existir més d'un factor independent interactuant entre si o provocant un efecte sinèrgic. El consens general es que nivells elevats d'amoni en sinèrgia amb una resposta inflamatòria causarien l'inflor dels astròcits i edema cerebral. Ara bé, els mecanismes pels quals es produirien aquest canvis morfològics encara estan per determinar (Prakash, Mullen 2010, Marquez-Aguirre et al. 2010). A continuació detallem alguns dels factors que potencialment podrien estar involucrats en l'aparició de la EH.

Neurotoxines

Amoni. És una neurotoxina clau en la patogènesi de la EH. És un subproducte del metabolisme dels composts nitrogenats i està involucrat en nombroses reaccions metabòliques. Ara bé, a elevades concentracions és tòxic, així que és eliminant mitjançant la formació d'urea al fetge en condicions fisiològiques. Es considera que el fetge metabolitza per aquesta via el 90% de l'amoni que li arriba a través de la vena porta. En canvi, la capacitat de sintetitzar urea està disminuïda en els pacients cirròtics degut a la disfunció hepàtica i a les derivacions portosistèmiques. Així el fetge perdria en part aquesta capacitat i el cervell, el teixit muscular i els ronyons intervindrien, com a via d'eliminació alternativa, utilitzant el glutamat per eliminar l'amoni, convertint-lo en glutamina. Arrel de l'increment dels nivells plasmàtics d'amoni es produiria un augment en la concentració d'amoni al sistema nerviós central degut probablement a trastorns a la microcirculació cerebral.

Els astròcits són les úniques cèl·lules del cervell amb capacitat per metabolitzar l'amoni. Tenen una gran activitat metabòlica i la seva funció principal és regular el microambient cerebral mitjançant un control estricte de la concentració de substàncies del compartiment intersticial. L'amoni indueix canvis als astròcits com l'augment de glutamina intracel·lular, que comporta l'entrada d'aigua per compensar la pressió osmòtica i produeix l'inflor dels astròcits. Alhora aquest gradient osmòtic a través de la barrera hematoencefàlica condueix a l'aparició d'edema cerebral, altera la neurotransmissió glutamatèrgica per l'alliberament de glutamina i augmenta l'expressió de l'òxid nítric sintetasa. Els canvis morfològics als astròcits són propis d'astròcits tipus II d'Alzheimer i podrien ocasionar alteracions neuronals que causarien les manifestacions neurològiques de la EH (Martin et al. 1987, Haussinger et al. 2000).

Manganès. És una neurotoxina que s'acumula preferentment als ganglis basal, on es creu que promouria la formació d'astròcits tipus II d'Alzheimer. El seu metabolisme encara no és del tot conegut, però sembla que en pacients cirròtics l'increment en els nivells de manganès es produiria per la derivació de sang portosistèmica i per una eliminació biliar deficient. El seu augment podria ser responsable dels símptomes extrapiramidals observats en la progressió de la malaltia hepàtica degut a que la seva neurotoxicitat afectaria principalment la neurotransmissió dopaminèrgica (Butterworth et al. 1995)

Estrès oxidatiu. Tot i que en l'actualitat hi ha encara poques evidències directes en pacients de la implicació de l'estrès oxidatiu a la EH, sembla que tindria un paper a la seva patogènesi, ja que s'han observat efectes positius en el tractament amb antioxidants (Ryter, Choi 2002) L'estrès oxidatiu està associat a la inflor dels astròcits, així com a la inducció de la transició de permeabilitat mitocondrial, un fenomen relacionat amb la falta d'energia mitocondrial. És probable que altres alteracions d'un estat hiperamonièmic tinguin relació amb l'estrès oxidatiu

Disfunció de la neurotransmissió

Glutamatérgica. El glutamat és una aminoàcid i un dels neurotransmissors aminoacídics al cervell amb efecte excitador sobre les neurones. Estaria implicat en el procés de desintoxicació de l'amoni a través de la producció de glutamina. En casos de EH s'ha observat una disminució dels nivells cerebrals de glutamat, així com alteracions en els seus transportadors i receptors. (Lavoie et al. 1987)

Gabaérgica. L'àcid gamma-aminobutíric (GABA) és el neurotransmissor inhibitori predominant al sistema nerviós central. La seva alteració està implicada en la fisiopatologia de diverses malalties neurològiques i neuropsiquiàtriques. El metabolisme de GABA està relacionat amb el glutamat i la glutamina i per tant en l'eliminació d'amoni. A la EH es dona un augment del to GABAérgic probablement degut a l'augment a la biodisponibilitat de GABA extracel·lular.

Dopaminérgica. La dopamina és un important neurotransmissor als ganglis basals del sistema nerviós central, tot i que també actua perifèricament fonamentalment sobre els sistemes cardiovascular i renal. Un enzim clau en la seva síntesi és la tirosina-hidroxilasa. Aquest enzim estaria alterat en els casos de EH promovent la síntesi d'amines amb una menor activitat intrínseca que competirien amb la dopamina pels seus receptors. Això donaria lloc a una disminució del to simpàtic.

7. Model animal de cirrosi per tetraclorur de carboni

En els darrers anys, els estudis experimentals en animals cirròtics han experimentat un augment molt considerable. Poder treballar amb animals que desenvolupin aquesta patologia és molt interessant ja que es poden realitzar una sèrie d'estudis impossibles de fer en humans i que aporten unes dades molt valuoses a l'hora de comprendre la seva patogènia i, a partir d'aquí, el diagnòstic, el tractament i la profilaxi.

Els models animals constitueixen una important eina d'estudi però cal no oblidar que són models que intenten imitar la patologia humana i en tant que aproximacions a la realitat, presenten limitacions ben conegudes com ara: diferències en la clínica de la malaltia, condicions experimentals, tècniques emprades i la pròpia biologia de l'animal, entre d'altres. Per tant, cal ser molt prudent a l'hora de valorar els resultats obtinguts amb els models experimentals.

En aquest apartat tractarem sobre el model d'hipertensió portal intrahepàtica acompanyada d'ascites en rates provocada per la inoculació de tetraclorur de carboni ja que és el model utilitzat en els nostres estudis.

7.1. Mecanisme d'acció del tetraclorur de carboni

El tetraclorur de carboni (CCl_4) és una substància d'elevada hepatotoxicitat. L'acció del tòxic sobre l'hepatòcit es produeix a dos nivells: una acció inicial i directa danyant la membrana i una segona fase deguda a la toxicitat induïda pels metabòlits del tetraclorur de carboni generats pel citocrom P_{450} (Figura 14).

La primera acció del CCl_4 es produeix als pocs minuts d'estar en contacte amb l'hepatòcit i és deguda a la destrucció de les membranes d'aquest i l'afectació dels mitocondris i lisosomes alterant-ne la funcionalitat. Així doncs, les membranes es tornen altament permeables provocant la pèrdua de potassi i altres enzims. Es produeix una acumulació intracel·lular de calci, sodi i aigua. El dany provocat sobre el mitocondri interromp la fosforilació oxidativa agreujant la necrosi cel·lular. Així mateix, l'abocament dels enzims lisosòmics acceleren encara més aquest procés necròtic. La necrosi produïda en aquest moment és encara parcialment reversible, dependent de la seva extensió. Es tracta, per tant, d'una necrosi dosi-dependent provocada exclusivament per l'acció del tetraclorur de carboni (Krahenbuhl et al. 1990).

La segona fase del procés, ja aparent a les poques hores, és deguda als metabòlits produïts pel citocrom P_{450} . Els radicals lliures que es generen sembla que interactuen amb els

àcids grassos insaturats de les membranes. Es produeix una peroxidació lipídica i un entrecruament d'aquests àcids grassos. El primer producte del metabolisme del CCl_4 pel sistema enzimàtic del citocrom P_{450} és el radical lliure tricolor de carboni (CCl_3), substància que interactua amb els lípids, proteïnes i ADN provocant-ne la peroxidació. La reacció del CCl_3 amb lípids insaturats genera radicals lliures secundaris que provoquen més destrucció cel·lular i subcel·lular (mitocondris i lisosomes).

El fet que s'hagi observat en animals d'experimentació que l'eficiència per metabolitzar el CCl_4 estigui directament relacionada amb la gravetat de la lesió, fa pensar que efectivament són aquests radicals lliures generats, els principals responsables de la necrosi de l'hepatòcit.

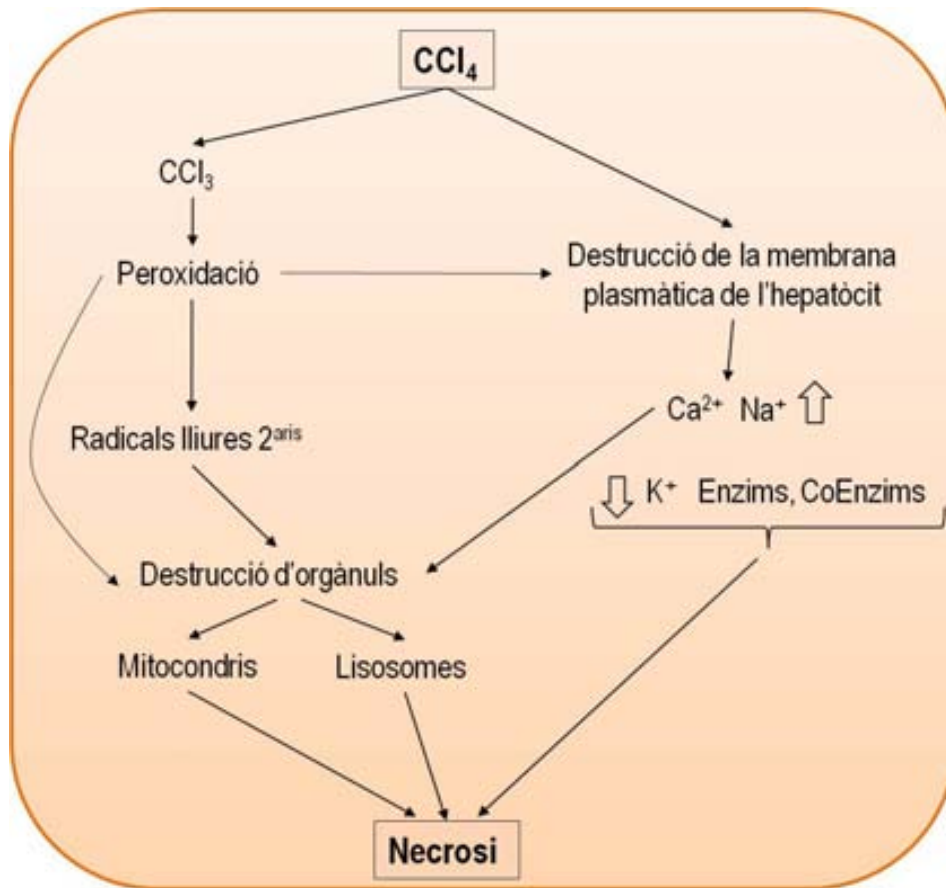


Figura 14: Mecanisme d'acció del CCl_4 sobre l'hepatòcit.

7.2. Metodologia del model

Des de que Cameron i col·laboradors, l'any 36 utilitzessin el CCl_4 per induir cirrosi en un model experimental en gossos, aquest s'ha utilitzat àmpliament en rates i, més rarament, en ratolins, porcs, conills porquins, primats i gossos (Perez Tamayo 1983). S'han descrit diferents mètodes segons la via d'administració del tòxic: injecció subcutània, intramuscular o intraperitoneal, administració orogàstrica o per inhalació. La dosi de CCl_4 i l'interval de temps entre cada administració varia segons la via d'administració. Generalment la cirrosi apareix més ràpidament quan el tòxic s'administra en dosis més altes i en un interval de temps més curt. Com a contrapartida la mortalitat és més elevada.

La majoria d'aquests models utilitzen, simultàniament amb l'administració del tetraclorur de carboni, un inductor enzimàtic del citocrom P_{450} com és el fenobarbital. Aquest fàrmac provoca un increment en la mida del fetge que pot arribar a ser màxima (un 43% més gran del normal) a les 6 setmanes de vida, quan l'animal pesa uns 150 g. Augmenta també el reticle endoplasmàtic llis. Aquest augment en la mida del fetge provoca també un augment en l'activitat del citocrom P_{450} (Chatamra, Proctor 1981). D'aquesta manera l'acció del CCl_4 és més efectiva, tal com hem vist en el mecanisme d'acció.

L'administració orogàstrica de CCl_4 és possiblement el mètode que en els darrers anys s'ha generalitzat més, sobretot en l'estudi de les infeccions associades a la cirrosi. Tot i aquesta acceptació, un dels inconvenients més importants que es presenta és la gran variabilitat en la resposta dels animals al tòxic variant des d'una cirrosi ben establerta fins a lesions mínimes. Sembla doncs que és força important adequar la dosi a cada animal.

En aquest sentit, Proctor, Chatamra 1982 descriu un model en rates *Wistar* en el qual administra fenobarbital a l'aigua de beguda i CCl_4 orogàstric simultàniament

Runyon et al. 1991 modifiquen el model de Proctor optimitzant les dosis a administrar del tòxic al tenir en compte la variació del pes de l'animal, aconseguint així una alta taxa d'ascites i, per primera vegada, descriu l'aparició de PBE en un model experimental de cirrosi hepàtica. Aquest és el model que vàrem escollir per als nostres estudis.

En aquest model s'utilitzen rates Sprague-Dawley de 100-120 g de pes a les que s'administra fenobarbital a l'aigua de beguda a una dosi de 1,5 mmol/L. Quan els animals arriben als 200 g de pes es comença a administrar CCl_4 a una dosi inicial de 20 μl /setmana, que es modifica segons les variacions del pes a les 48 hores d'haver administrat el tòxic. Una vegada s'ha establert l'aparició d'ascites, els animals reben una dosi de CCl_4 de manteniment de 40

μ l/setmana. Amb aquesta individualització de la dosi s'aconsegueix que entre el 62-100% dels animals desenvolupin cirrosi amb presència d'ascites entre les setmanes 7 - 26. De tota manera la mortalitat és força elevada (50% - 55%) i es concentra pràcticament durant les primeres 4-5 setmanes d'administració com a conseqüència de una toxicitat aguda del CCl₄ (Llovet et al. 1994).

7.3. Alteracions histològiques i fisiopatològiques del model

Cirrosi micronodular irreversible. En el model de cirrosi per CCl₄ s'observa la presència d'una cirrosi ben establerta. Apareix una afecció nodular difusa amb petits nòduls (2-4 mm) amb una càpsula engruixida. Microscòpicament es caracteritza per uns septes fibrosos que travessen els lòbuls hepàtics i per una regeneració hiperplàsica nodular (cirrosi micronodular). Aquests nòduls de regeneració presenten una fibrosi irregular i els tractes portals apareixen interconnectats per bandes de teixit fibrós. Les àrees portals presenten bandes de teixit connectiu que comprimeixen els vasos sanguinis. Hi ha un augment de conductes biliars. Les cèl·lules de Kupffer, prominents, apareixen extensament distribuïdes per la zona periportal. Així mateix, s'observa un lleuger infiltrat inflamatori al voltant dels septes connectius.

Macroscòpicament, el fetge té una consistència dura amb una superfície granular, encara que en els casos més avançats la massa hepàtica es redueix apareixent a la superfície un aspecte nodular.

Hipertensió portal associada a canvis histològics intestinals. Els animals pateixen importants canvis en la circulació intrahepàtica i esplàncnica que acaben desembocant en el desenvolupament d'hipertensió portal i ascites, així com en l'aparició d'importants alteracions en la hemodinàmica sistèmica (hipotensió arterial, augment del volum sanguini) i la reactivitat vascular (Kravetz et al. 1987). D'altra banda, desenvolupen diferents graus de derivacions portosistèmiques com conseqüència de la hipertensió portal. Les primeres manifestacions d'hipertensió portal apareixen a les 4 o 6 setmanes d'administració de CCl₄ però els trastorns a l'hemodinàmica no són del tot evidents fins que l'animal té la cirrosi ben establerta.

Els canvis histològics intestinals es concreten en l'aparició d'edema submucós cecal extens, limfangiectasi ileal i infiltrat inflamatori crònic.

Esplenomegàlia. En aquest model els animals desenvolupament un grau elevat d'esplenomegàlia, de entre 3 a 5 vegades del pes d'animals sans.

Atrofia testicular. A les 12-13 setmanes d'administració de CCl₄ es pot donar una atrofia de fins a la meitat del pes.

Anàlisi sanguínia. S'evidencia una disminució significativa dels nivell d'albumina i proteïnes totals, així com un augment significatiu del recompte de leucòcits i dels nivells de bilirubina, comparat amb els animals control.

Ascites. Els aspectes fisiopatològics referents a la aparició d'ascites en aquests animals han estat extensament estudiats. S'ha observat que prèvia a l'aparició de l'ascites hi ha una retenció important de sodi. Els animals no presenten disminució en el filtratge glomerular, considerant-se per tant, que la retenció del sodi és deguda a una reabsorció tubular renal. Existeix una relació directa i cronològica entre aquests dos fets i l'activació del sistema renina-aldosterona, hipersecreció no osmòtica d'hormona antidiürètica (ADH) i augment dels nivells plasmàtics del factor natriurètic atrial (Jimenez et al. 1985).

Sistema endocannabinoide de senyalització

1. Definició

El sistema endocannabinoide de senyalització (SES) és un important sistema de modulació de diverses respostes fisiològiques tant a nivell central com perifèric i està constituït per una sèrie de receptors cannabinoides, lligands endògens i enzims involucrats a la biosíntesi i degradació d'aquests lligands.

Tot i que els cannabinoides obtinguts de *Cannabis sativa* s'han usat com a planta medicinal des de fa milers d'anys pel tractament de diverses afeccions, l'estructura química del seu compost actiu principal, el Δ -9-tetrahidrocannabinol (THC), no es va identificar fins la meitat del segle XX per Mechoulam, Gaoni 1965. De fet, degut a les seves propietats altament lipofíliques es va trigar a determinar el seu mecanisme d'acció, considerant-lo com un mecanisme d'acció inespecífic mitjançant l'alteració de les membranes cel·lulars. A mida però que es van anar refinant les metodologies disponibles per l'estudi d'aquest tipus de compostos i es van observar diferències en l'activitat de substrats molt semblants estructuralment al THC, es va qüestionar aquesta explicació.

En aquest punt, es planteja la hipòtesi que els derivats del cànnabis actuarien sobre un lloc d'unió específic a la membrana, suggerint la presència de receptors al sistema nerviós central. Aquesta hipòtesi es confirmaria per la clonació del primer receptor de cannabinoides, el receptor de cannabinoides 1 (CB1) per Matsuda et al. 1990 i per la clonació del receptor de cannabinoides 2 (CB2) per Munro, Thomas & Abu-Shaar 1993.

El descobriment d'aquests receptors va fer pensar en l'existència de cannabinoides de síntesi endògena i, efectivament, es van identificar l'araquidonil-etanolamida o anandamida (AEA) (Devane et al. 1992) i el 2-araquidonil glicerol (2-AG) (Mechoulam et al. 1995, Sugiura et al. 1995), molècules lipídiques derivades de l'àcid araquidònic, com a lligands endògens dels receptors de cannabinoides. Més recentment també s'han identificat l'èter del 2-araquidonil glicerol (èter de noladina) (Hanus et al. 2001), la O-araquidonil etanolamina (Virodamina) (Porter et al. 2002), i la N-araquidonil-dopamina (NADA) (Huang et al. 2002) com a endocannabinoides. (Figura 15)

Arrel d'aquests descobriments el coneixement sobre la complexitat del sistema endocannabinoide de senyalització ha anat creixent. Aquest sistema es troba distribuït en gran part dels teixits corporals. De tota manera en el sistema nerviós central la seva distribució és molt

més complexa i estructurada, reflectint la seva importància en la transmissió sinàptica, intervenint en processos d'analgèsia, regulació de la ingesta i sacietat, percepció del dolor i la son. També ha estat àmpliament estudiat en la regulació de la immunitat, proliferació i mort cel·lular, inflamació, així com pels seus efectes sobre la vasodilatació arterial.

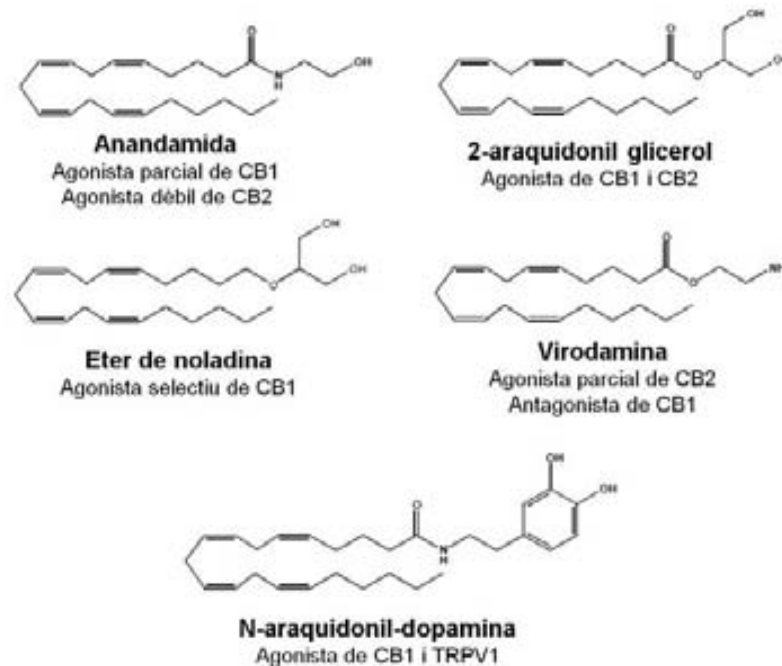


Figura 15: Estructura química dels endocannabinoides. (Adaptació de Bisogno, Ligresti & Di Marzo 2005)

2. Receptors de cannabinoides

Els endocannabinoides exerceixen la seva acció farmacològica a través de l'activació de receptors de la superfamília de 7 dominis transmembrana de receptors cel·lulars associats a proteïna G (GPCR). A l'actualitat els dos receptors més ben caracteritzats són els receptors de cannabinoides CB1 i CB2, tot i que recentment s'ha acceptat el receptor orfe GPR55 com a receptor amb activitat cannabinoide (Baker et al. 2006, Ryberg et al. 2007) hi ha evidències de que poden existir d'altres receptors encara no caracteritzats (Baker et al. 2006, Begg et al. 2005, Brown 2007).

A més, els endocannabinoides també poden modular l'activitat d'altres tipus de receptors com ara: els receptors opioides (Pugh et al. 1996), els receptors de N-metil-D-aspartat (NMDA) (Hampson et al. 1998), els receptors de serotonina (Barann et al. 2002) i els receptors vanilloides tipus 1 (TRPV1) (Dannert et al. 2007).

2.1. Receptor de cannabinoides 1 (CB1)

El receptor CB1 és un polipèptid de 476 aminoàcids i un pes molecular de 60kDa, altament conservant entre aquelles espècies en las que s'ha clonat (humà, rata i ratolí; 97-99%). S'expressa preferentment al sistema nerviós central (SNC) i s'ha localitzat a hipocamp, escorça, ganglis basals i cerebel en concentracions elevades (Herkenham et al. 1991, Mailleux, Vanderhaeghen 1992, Tsou et al. 1998). Aquesta distribució explicaria els efectes dels cannabinoides sobre l'activitat motora i la memòria. No obstant, el receptor CB1 també es localitza en òrgans i teixits perifèrics com a melsa, pulmó, endoteli vascular, múscul llis, adipòcits, pàncrees, tracte gastrointestinal i a fetge, exercint un rellevant paper modulador (Pertwee 2001, Howlett 2002, Bermudez-Silva et al. 2008).

2.2. Receptor de cannabinoides 2 (CB2)

El receptor CB2 és un polipèptid de 360 aminoàcids i un pes molecular de 45kDa. Aquest receptor exhibeix una homologia global del 44% amb el receptor CB1, que augmenta fins al 68% en les regions transmembrana (Figura 16). Es localitza preferentment a cèl·lules del sistema immune, així com a melsa, timus, amígdales, medulla òssia, pàncrees, cor i a cèl·lules mieloides (Howlett 2002, Pertwee 1997). En els darrers anys s'ha suggerit la seva presència a sistema nerviós, a neurones i diferents zones del cervell (Onaivi et al. 2006). El receptor CB2 podria participar en el mecanisme pel qual els cannabinoides interaccionen amb el sistema immune, produint un efecte globalment immunosupressor.

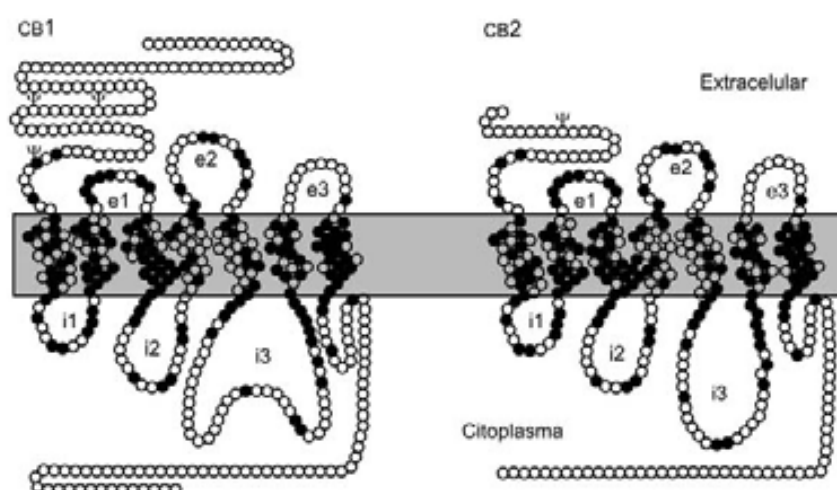


Figura 16: Representació esquemàtica dels receptors CB1 i CB2. Els aminoàcids comuns a tots dos receptors es representen en negre.

3. Endocannabinoides

S'anomenen endocannabinoides als lligands endògens dels receptors de cannabinoides. Són molècules lipídiques de la família dels icosanoides, derivades de l'àcid araquidònic present a la membrana cel·lular. Els més representatius són l'anandamida i el 2-AG, els primers en ser identificats i els més estudiats, tot i que n'hi ha d'altres com l'èter de noladina, la virodamina i la NADA. Es van detectar inicialment al sistema nerviós, però actualment es coneix que realitzen funcions també als sistemes immune, endocrí, gastrointestinal i circulatori (Pagotto et al. 2006, Bellocchio et al. 2008).

En general els nivells d'endocannabinoides a l'organisme són baixos, de l'ordre de pmol/mg de teixit. Es sintetitzen sota demanda i actuen a prop del seu lloc d'alliberació (Di Marzo et al. 1994) i un cop han realitzat la seva acció són ràpidament inactivats per enzims específics de degradació (Piomelli 2003).

En el cas d'anandamida, la seva síntesi es realitza a partir de la fosfatidiletanolamina, molècula present a la membrana cel·lular, mitjançant l'acció dels enzims N-acetiltransferasa i fosfolipasa D. Després de la seva síntesi, s'allibera a l'espai extracel·lular per realitzar la seva acció que queda determinada pels mecanismes que en limiten la disponibilitat. Aquests mecanismes de control consisteixen en el transport a l'interior cel·lular i en la hidròlisi enzimàtica d'anandamida. El transport es pot donar per difusió passiva o a través d'un transportador selectiu que encara no s'hauria clonat (Piomelli 2003). Pel que fa a la hidròlisi es produiria a través de l'acció de l'enzim amido hidrolasa dels àcids grassos (FAAH) (Cravatt et al. 1996) i de la lipasa de monoacilglicèrids (MAGL) (Dinh et al. 2002).

Pel que fa al 2-AG la seva síntesi es realitza majoritàriament per la fosfolipasa C. La seva degradació també es fa a través del mateix sistema de transport que en el cas d'anandamida, però en canvi tot i que el 2-AG també funciona com a substrat de l'enzim FAAH, es l'enzim MAGL el que està més implicat en la seva (Dinh et al. 2002).

D'altres mecanismes d'inactivació dels endocannabinoides, que s'activen per degradar la virodamina, l'èter de noladina i la NADA (resistents a la degradació per FAAH) consisteixen en l'esterificació de fosfoglicèrids mitjançant acilases i fosforilases (Di Marzo et al. 1999, Fezza et al. 2002) i l'oxidació enzimàtica del motiu araquidonoil per lipoxigenases, ciclooxigenasa-2 i el citocrom p450 (Kozak, Marnett 2002).

4. Lligands exògens dels receptors de cannabinoides

Existeixen nombrosos lligands exògens tant naturals com sintètics amb activitat cannabinoide. Aquests compostos han contribuït a ampliar el coneixement sobre el sistema endocannabinoide de senyalització alhora que han permès assajar possibles tractaments de diverses malalties.

4.1. Agonistes

Entre els lligands agonistes destaquen els cannabinoides naturals derivats de *Cannabis sativa*, dels quals s'han descrit més de seixanta compostos actius, com ara el THC, el Δ -8-tetrahidrocannabinol o el cannabidiol (Pertwee 2008).

A partir dels estudis als cannabinoides naturals, s'han pogut sintetitzar molècules capaces d'unir-se selectivament als receptors de cannabinoides, algunes amb característiques que els hi confereixen potencial terapèutic. Aquests cannabinoides sintètics es poden classificar segons la seva estructura química en:

- Cannabinoides clàssics

Són composts sintètics anàlegs de THC, amb estructura de dibenzopirà. Dins aquesta categoria trobem com el 11-OH-8-THCdimetilheptil (HU-210), el 11-OH-hexahidrocannabinol-dimetilheptil (HU-243), el 1-deoxi-11-hidroxi- Δ 8-THC-dimetilheptilo i el JWH-133 entre d'altres.

- Cannabinoides no clàssics

Són composts anàlegs del THC bicíclics i tricíclics que no tenen anell pirà. En aquest grup trobem el CP55,940, el CP55,244, el CP50,556 (levonantradol) i el desacetilevonantradol.

- Aminoalquilindols

Són molècules que presenten una estructura química derivada de la pravadolina. El compost d'aquest tipus més estudiat és el WIN-2 (Pacheco et al. 1991) que té una selectivitat 7 vegades més gran pel receptor CB2 que per CB1. A partir d'aquest compost s'han desenvolupat noves molècules com JWH-015 i L-768242. A més, dins aquesta categoria també trobem l'enantiòmer inactiu WIN-3 que ha estat d'utilitat en la caracterització del funcionament dels receptors.

- Icosanoides

En aquest grup s'inclouen modificacions estructurals dels endocannabinoides, amb estructures derivades de l'àcid araquidònic, com ara la R-(+)-metanandamida, la araquidonil-2.-cloroetilamida (ACEA), la araquidonilciclopropilamida (ACPA) i el O-1812.

4.2. Antagonistes

Els estudis sobre l'estructura i l'activitat del sistema endocannabinoide de senyalització també han permès el desenvolupament d'antagonistes selectius pels receptors de cannabinoides.

En aquesta categoria, la molècula més potent i més àmpliament utilitzada fins el moment com antagonista del receptor de cannabinoides CB1 és el SR141716A també denominat rimonabant. Rimonabant exhibeix una marcada selectivitat pel receptor de cannabinoides CB1 en front del receptor de cannabinoides CB2 i d'altres receptors. D'aquesta manera es capaç de prevenir o revertir les accions dels endocannabinoides i d'altres antagonistes que actuïn a través de CB1 (Pertwee 1997). A partir de l'estructura de rimonabant s'han desenvolupat els anàlegs AM251 i AM281 que també bloquegen el receptor de cannabinoides CB1. També existeixen antagonistes competitiu de CB1 que difereixen estructuralment de rimonabant com per exemple el LY320135.

En relació amb els receptors de cannabinoides CB2 el compost més potent i millor caracteritzat és el SR144528 (Rinaldi-Carmona et al. 1998), tot i que també existeixen d'altres antagonistes selectius com són AM630 i O1184.

A més d'actuar com antagonistes pels receptors cannabinoides, algunes d'aquestes molècules són capaces de provocar per si mateixes efectes contraris als produïts pels agonistes dels receptors de cannabinoides, comportant-se com agonistes inversos en alguns sistemes. Així s'ha descrit la capacitat d'actuar com a agonistes inversos a rimonabant, SR144528, AM281, LY320135, AM630 i O1184.

5. Funcions fisiològiques del sistema endocannabinoide de senyalització

Tot i que es no es coneixen amb precisió quines són les funcions fisiològiques del sistema endocannabinoide de senyalització, la distribució dels seus receptors, així com els resultats de diverses investigacions bàsiques, suggereixen que participaria en la regulació de diverses funcions del sistema nerviós central i perifèric, el sistema immunològic, l'aparell cardiovascular, l'aparell digestiu, la reproducció i la proliferació cel·lular.

Concretament al sistema nerviós central, el SES participaria en la coordinació i el control del moviment (Giuffrida, Piomelli 2000) en funcions cognitives superiors (sobretot relacionades amb l'aprenentatge i la memòria) (Lichtman 2000), en la resposta a l'estrès i al dolor (Pertwee 1997), en la regulació del son (Mechoulam et al. 1997) i en els mecanismes de recompensa (Solinas, Yasar & Goldberg 2007). També interviendria en la regulació de la temperatura corporal i de la gana (Di Marzo et al. 2001, Kirkham, Williams 2001). A més alguns endocannabinoides com l'anandamida han mostrat efecte neuroprotector *in vitro* (Mechoulam, Panikashvili & Shohami 2002).

Els efectes del sistema endocannabinoide sobre el sistema immunològic no estan ben establerts encara. Alguns estudis experimentals mostren que l'anandamida i el 2-AG tenen efecte immunomodulador, de manera que poden incrementar certes respostes humerals i cel·lulars (proliferació dels limfòcits B, limfòcits T i alliberament de citocines). Aquest efecte sembla que estaria mediat majoritàriament pels receptors CB2 (Berdyshev 2000, Klein, Newton & Friedman 2001).

Al sistema cardiovascular, el SES participaria en la regulació de la pressió arterial. Els endocannabinoides es comportarien com a vasodilatadors sistèmics i vasoconstrictors pulmonars (Wagner et al. 2001b, Wahn et al. 2005) a través de l'alliberació d'adrenalina des dels nervis simpàtics o de l'activació directa dels receptors CB1 a cèl·lules endotelials (Wagner, Varga & Kunos 1998). També s'ha suggerit la implicació de la via ciclooxygenasa 2 (COX 2).

Pel que fa a les funcions del SES a l'aparell digestiu estudis d'experimentació amb animals suggereixen que tindria un paper en la inhibició del buidat gàstric i el peristaltisme intestinal mediat pels receptors CB1 (Vigna 2003). A més alguns endocannabinoides a través de l'activació de CB1 mostrarien efectes antidiarreics (Izzo et al. 2003) i sembla que el SES estaria implicat en processos d'inflamació intestinal (Izzo et al. 2001).

En el sistema reproductor el SES participaria en mecanismes de fertilitat durant el període de preimplantació embrionària (Paria, Dey 2000), així com en la regulació de la gestació a terme (Maccarrone et al. 2000).

Finalment, el SES també actuaria a la regulació de la proliferació cel·lular ja que alguns endocannabinoides com anandamida tindrien un efecte antiproliferatiu dosi depenent (Ligresti et al. 2003). Així doncs, sembla que els endocannabinoides participarien en la inhibició del creixement de les cèl·lules tumorals (Guzman 2003).

6. Sistema endocannabinoide de senyalització a la malaltia hepàtica

El fetge ha estat un objectiu emergent, on els endocannabinoides han estat implicats tant en el mateix procés fibròtic com en les conseqüències hemodinàmiques de la cirrosi. Recentment s'ha evidenciat que els endocannabinoides poden estar implicats en la patogènia i progressió de la malaltia hepàtica crònica. En aquest sentit s'han publicat diversos estudis en els quals s'ha valorat l'efecte dels endocannabinoides i l'ús d'agonistes o antagonistes pels receptors CB1 i CB2 en la fisiopatologia de la fibrosi i cirrosi, així com de les seves complicacions.

Els resultats que s'han obtingut sobre el paper pro o antifibròtic del sistema endocannabinoide de senyalització són, de moment, contradictoris. Així, en estudis *in vitro* en cèl·lules estelades hepàtiques activades s'ha observat que anandamida i 2-AG en altes concentracions tindrien efectes antifibròtics, actuant de forma independent dels receptors de cannabinoides (Siegmund et al. 2007, Yang et al. 2010). En canvi, en un estudi *in vivo* en tres models de fibrosi en ratolins la inactivació de CB1 mitjançant l'administració de l'antagonista rimonabant (dosi de 10 mg/kg de pes de l'animal) actuaria com antifibròtic, disminuint l'acumulació de miofibroblasts hepàtics derivats de cèl·lules estelades o incrementant l'apoptosi dels mateixos, així com per la reducció en la síntesi de la citocina profibròtica TGF- β 1 (Teixeira-Clerc et al. 2006). En aquest estudi el tractament amb rimonabant es va iniciar abans de la inducció del dany hepàtic i es va mantenir durant l'estudi. Per altra banda, els mateixos autors han demostrat que l'activació del receptor CB2 limitaria la progressió de la fibrosi hepàtica en un model d'hepatopatia aguda al reduir l'expressió de TGF- β 1, així com la inhibició del creixement dels miofibroblasts hepàtics (Julien et al. 2005). Així doncs, dos receptors diferents

per un mateix lligand tindrien efectes contraposats. Aquesta contradicció es reflecteix en els resultats d'un estudi epidemiològic en que s'ha observat que el consum diari de marihuana és un factor de risc per la progressió de la fibrosi en individus amb hepatitis C crònica (Hezode et al. 2005). Semblaria doncs que l'efecte de resposta profibrogènica a través de l'activació del receptor CB1 seria predominant sobre l'efecte antifibrogènic del receptor CB2 en el cas de lligands amb capacitat per activar tant CB1 com CB2, com és el cas del THC.

L'expressió de receptors de cannabinoides s'ha detectat *in vitro*, tant a hepatòcits com a cèl·lules estelades, cèl·lules de Kupffer i miofibroblasts (Tam et al. 2011). A més, els hepatòcits expressen FAAH en altes concentracions assolint-se a fetge els mateixos nivells d'expressió que a cervell. Sembla doncs que els hepatòcits jugarien un paper important en limitar la concentració d'endocannabinoides a fetge.

Inicialment es van associar els efectes dels endocannabinoides sobre la fibrosi, a l'activació o bloqueig d'aquests receptors a cèl·lules estelades i cèl·lules de Kupffer, degut a que la seva expressió en aquestes cèl·lules estaria augmentada en fetges cirròtics (Munoz-Luque et al. 2008). Ara bé, a mida que es van ampliar els estudis sobre el paper del sistema endocannabinoide de senyalització a la cirrosi, el paper dels hepatòcits va anar adquirint importància. Els hepatòcits podrien estar implicats en la fisiopatologia de la cirrosi actuant en la iniciació i progressió de la fibrosi a dos nivells: en primer lloc, per un efecte paracrí dels endocannabinoides alliberats per cèl·lules estelades que activarien els receptors CB1 dels hepatòcits augmentant l'expressió de gens lipogènics que induirien una primera fase d'esteatosi hepàtica (Jeong et al. 2008, Osei-Hyiaman et al. 2005; i en segon lloc, com a font de cèl·lules precursoras que es transformarien en miofibroblasts (Iredale 2007).

Apart d'aquests efectes sobre la progressió de la fibrosi al fetge, sembla que el sistema endocannabinoide de senyalització estaria implicat a d'altres paràmetres de la malaltia.

D'una banda, pel que fa als efectes dels endocannabinoides sobre les alteracions hemodinàmiques, en un model experimental de xoc endotòxic per administració de LPS, la hipotensió produïda per les endotoxines es va poder evitar mitjançant el pretractament amb un antagonista pel receptor CB1 dels cannabinoides (Varga et al. 1998). De fet, diversos estudis recolzen la hipòtesi de que l'estat de vasodilatació mesentèrica associada a la cirrosi estaria afavorit per l'activació dels receptors CB1 endotelials per endocannabinoides provinents de macròfags i plaquetes estimulades per LPS (Wagner et al. 1997, Wagner et al. 2001a Wagner et al. 2001b, Wagner et al. 1997). En aquest sentit, s'ha observat un augment en la presència de

receptors CB1 a les cèl·lules endotelials de pacients cirròtics (Batkai et al. 2001) així com a les arteries mesentèriques (Moezi et al. 2006, Ros et al. 2002). A més, s'ha observat que anandamida indueix un augment de la resistència intrahepàtica dels fetges cirròtics, a través de l'augment a la producció d'icosanoides (principalment tromboxà A2), derivats de l'activitat COX (Yang et al. 2006). Aquest fet, afegit a l'increment de la producció d'endocannabinoides produïda per l'acció de LPS sobre macròfags i plaquetes i a la vasodilatació sistèmica, contribuiria al manteniment de la hipertensió portal i al desenvolupament d'ascites.

D'altra banda, en diferents estudis s'ha observat que els endocannabinoides exercirien un efecte inhibidor reduint la motilitat intestinal (Izzo et al. 2001, Massa, Storr & Lutz 2005) i, per tant, podrien afavorir el desenvolupament de sobrecreixement bacterià, facilitant la translocació bacteriana i l'endotoxèmia (Pertwee 2001).

Pel que fa a l'encefalopatia hepàtica, els efectes dels endocannabinoides s'han estudiat en un model experimental d'insuficiència hepàtica fulminant induït per tioacetamida en ratolins (Avraham et al. 2006). S'ha observat que l'administració de rimonabant, així com l'administració de 2-AG, produirien una millora en la puntuació neurològica avaluada i en l'activitat i la funció cognitiva. En estudis posteriors del mateix grup, van observar que en aquest model s'induiria l'expressió de CB2 a cervell així com l'activació de la proteïna quinasa activada pel monofosfat d'adenosina (Dagon et al. 2007). Aquests resultats suggereixen, doncs, que els endocannabinoides podrien tenir un paper important en la patogènia de l'encefalopatia hepàtica.

Encara que les dades experimentals han demostrat efectes beneficiosos de l'antagonisme de CB1 en la cirrosi i algunes de les seves complicacions, la majoria d'aquests resultats s'obtenen en estudis de pre-tractament i/o d'administració aguda de tòxics però manquen estudis experimentals amb tractaments a més llarg termini i en models de cirrosi avançada (Kunos et al. 2006). De fet, l'efecte del tractament a llarg termini amb rimonabant en les alteracions hemodinàmiques relacionades amb cirrosi encara està poc estudiat. A més, no hi ha dades disponibles fins el moment dels efectes l'antagonisme de CB1 sobre la hiperamonièmia i la formació d'edema cerebral, el grau de derivació portosistèmica ni la translocació bacteriana.

Objectius

Hipòtesi

Tenint en compte que l'activació del receptor CB1 de les cèl·lules de Kupffer i de les cèl·lules estelades afavoreix la proliferació de miofibroblasts, sembla lògic que el seu bloqueig mitjançant l'administració a llarg termini de rimonabant s'acompanyi d'una reducció de la progressió de la fibrosi. D'aquesta manera es reduiria la pressió portal i, per tant, disminuirien les derivacions portosistèmiques, amb la conseqüent disminució dels nivells d'amoní i d'endotoxina a la circulació sistèmica. A més, el bloqueig del receptor CB1, en disminuir la pressió intrahepàtica, s'acompanyaria d'una reducció de la pressió portal.

Tot i que l'expressió de CB1 de cèl·lules de Kupffer i estelades està augmentada en fetges cirròtics, podria ser que els hepatòcits també estiguessin implicats de manera rellevant a través de l'activació dels seus receptors CB1 a la progressió de la fibrosi.

Una altra conseqüència previsible del bloqueig del receptor CB1 seria la normalització del trànsit intestinal lent que acostuma a existir a la cirrosi i que en part està afavorit per l'activació del receptor CB1 a l'epiteli intestinal. D'aquesta manera s'aconseguiria normalitzar el trànsit intestinal, disminuir el sobrecreixement i, per tant, eliminar un dels principals factors que afavoreixen la translocació bacteriana. D'aquesta manera podria disminuir el risc de desenvolupament de bacterièmia i de peritonitis bacteriana espontània. Per últim, la reducció del sobrecreixement bacterià, juntament amb la disminució de la pressió portal i de les derivacions portosistèmiques comportaria una reducció de la quantitat d'amoní plasmàtic i, per tant, disminuiria la probabilitat de desenvolupar encefalopatia hepàtica.

Objectius

- Avaluar si l'administració de l'antagonista per CB1 a la cirrosi experimental és capaç de:
 - a) Reduir la progressió de la cirrosi i millorar l'estat hemodinàmic.
 - b) Millorar el trànsit intestinal, disminuir el sobrecreixement bacterià intestinal i la translocació bacteriana.
 - c) Evitar el desenvolupament d'encefalopatia hepàtica

- Establir el paper del receptor CB1 dels hepatòcits sobre la progressió de la fibrosi en administrar l'antagonista SR141716A determinant l'expressió de:
 - a) El receptor d'endocannabinoides 1 (CB1) a teixit hepàtic i cultiu cel·lular d'hepatòcits
 - b) TGF- β a teixit hepàtic, plasma i sobrenedant de cultiu cel·lular d'hepatòcits.
 - c) TNF- α a teixit hepàtic i a sobrenedant de cultiu.

Material i mètodes

Estudi *in vivo*

1. Animals i estabulació

Es van utilitzar un total de 70 rates Sprague-Dawley mascles (Harlan Ibérica) amb un pes inicial de 100-120 g. Els animals van ser estabulats en gàbies de metacrilat i mantinguts a una temperatura constant de 20-22°C amb un cicle de llum/fosc de 12/12h. A aquests animals se'ls hi va administrar una dieta estàndard de manteniment (Teklad Global 2014, Harlan Ibérica) i aigua de beguda *ad libitum*, a la es va afegir fenobarbital (Luminal, Kern Pharma) com a inductor enzimàtic de citocrom P₄₅₀ hepàtic per tal que es normalitzés la seva disponibilitat entre administracions de CCl₄, a una dosi de 1,5 mmol/L.

L'estudi es va realitzar seguint la normativa de la Guia pel Benestar i Ús dels Animals de Laboratori amb l'autorització del Comitè Ètic d'Experimentació Animal de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol de Badalona.

2. Disseny Experimental

Es van utilitzar 70 rates Sprague-Dawley mascles (Harlan Ibérica) dels quals a 50 se'ls hi va induir cirrosi mitjançant CCl₄ i 20 es van utilitzar com a controls sans. Dels animals als que es va induir cirrosi, degut a l'elevada mortalitat del model, només en van sobreviure 19 que es van distribuir aleatòriament en dos grups de tractament (Figura 17). Així doncs, a l'estudi es van avaluar els quatre grups experimentals següents:

- **Grup Cirrosi+Vehicle**: Animals als quals es va induir cirrosi fins al desenvolupament d'ascites. En el moment del diagnòstic d'ascites se'ls hi va administrar vehicle durant 10 dies. (n=9)
- **Grup Cirrosi+Rimonabant**: Animals als quals es va induir cirrosi fins al desenvolupament d'ascites. En el moment del diagnòstic d'ascites es va iniciar l'administració oral de rimonabant (Acomplia®, Sanofi Aventis) a una dosi de 3 mg/kg/dia durant 10 dies. (n=10)
- **Grup Sa+Vehicle**: Animals sans als quals no se'ls va induir cirrosi però als que igualment se'ls va administrar fenobarbital a l'aigua de beguda. En arribar a un pes equivalent al que assolien els animals amb ascites, se'ls hi va administrar vehicle durant 10 dies. (n=10)

- **Grup Sa+Rimonabant:** Animals sans als quals no se'ls va induir cirrosi però als que igualment se'ls va administrar fenobarbital a l'aigua de beguda. En arribar a un pes equivalent al que assolien els animals amb ascites (aproximadament 350g), es va iniciar l'administració de rimonabant a una dosi de 3 mg/kg/dia durant 10 dies. (n=10)

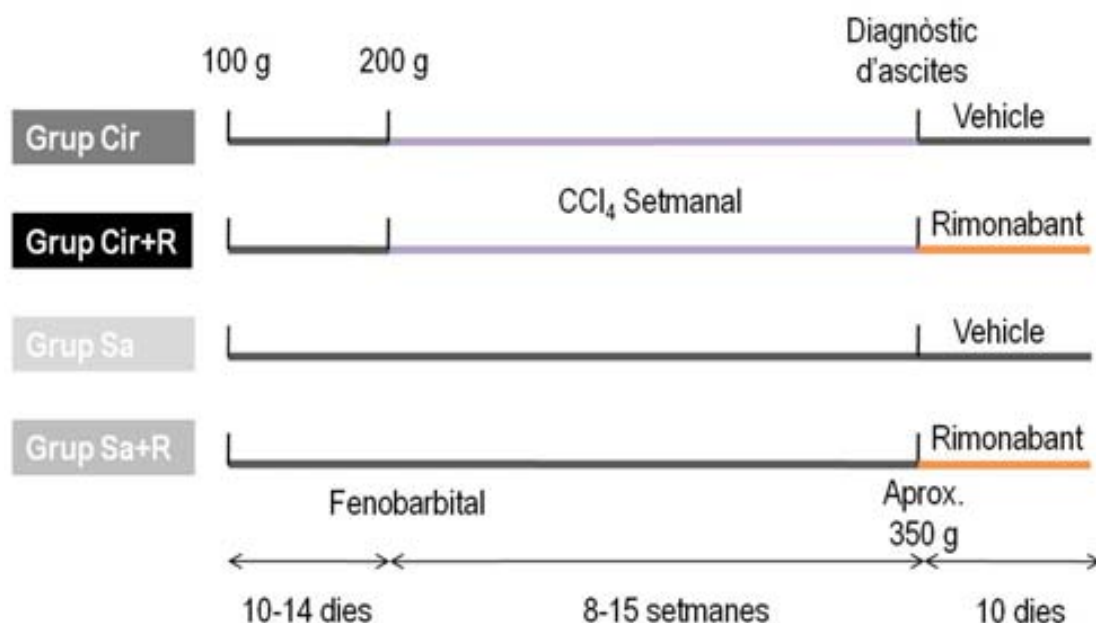


Figura 17: Esquema del disseny experimental de l'estudi *in vivo*.

La presència d'ascites en els animals dels grups cirròtics es va confirmar mitjançant paracentesi exploradora de la cavitat peritoneal mitjançant punció amb xeringa de tipus insulina. Els animals sans es van sacrificar paral·lelament als animals cirròtics.

3. Inducció de la cirrosi

La inducció de cirrosi es va iniciar als 10-14 dies d'administració de fenobarbital, quan els animals pesaven 200 g. En aquest moment es va iniciar l'administració del compost hepatotòxic tetraclorur de carboni (CCl₄, Sigma-Aldrich) per via orogàstrica, amb sonda de metall (Popper and Sons), un cop per setmana amb una dosi inicial de 20 µL CCl₄/200 g de pes de l'animal.

Les dosis posteriors es van ajustar d'acord amb l'augment/disminució del pes de l'animal a les 48h de l'administració de la darrera dosi de CCl₄, segons el mètode descrit per Runyon et al. 1991, fins a l'aparició d'ascites. De la mateixa manera, el càlcul de la dosi també es va ajustar

segons el període de tractament, essent diferents les variacions durant les 6 primeres setmanes de tractament respecte a les setmanes posteriors (Taula 3).

Canvi de pes a les 48h de la darrera dosi de CCl ₄	≤6 setmanes de tractament	>6 setmanes de tractament
Estable o increment de pes	Augment en 60 µL	Augment en 80 µl
Pèrdua de pes de 2%-5,9%	Augment en 40 µL	Augment en 60 µL
Pèrdua de pes de 6%-10%	Augment en 20 µL	Augment en 40 µL
Pèrdua de pes de 10,1%-15%	Dosi estable	Dosi estable
Pèrdua de pes >15%	Disminució 40µL	Disminució 40µL

Taula 3: Dosi de CCl₄ segons el període de tractament

El CCl₄ és una substància d'elevada hepatotoxicitat que s'ha utilitzat en diferents models animals d'inducció de cirrosi des de l'any 1936 i que requereix de l'administració de repetides dosis en intervals curts de temps. Aquesta administració elevada i continuada implica com a contrapartida una elevada mortalitat en aquest model que es situa entre el 50-55%. Així mateix, la variabilitat dels animals en la resposta al tòxic implica variacions en l'interval de temps necessari per l'establiment de la cirrosi amb ascites, oscil·lant aquest entre les 8-15 setmanes.

4. Temps de trànsit intestinal

Per tal de valorar el trànsit a l'intestí prim, 1 hora abans del sacrifici es va administrar als animals, per via orogàstrica, colorant alimentari (negre brillant E151, Sigma-Aldrich) en una concentració de 150 mg de colorant per kg de pes de l'animal dissolts en 1 mL de sèrum fisiològic. Durant el sacrifici, es va extreure la totalitat de l'intestí prim i es va mesurar el recorregut del colorant. El percentatge de recorregut del colorant es va adoptar com a mesura del temps de trànsit intestinal, segons la fórmula següent:

$$\% \text{ Trànsit intestinal} = \left[\frac{\text{Recorregut del colorant a l'intestí prim en cm}}{\text{Mida total de l'intestí prim en cm}} \right] \times 100$$

5. Determinació de la pressió arterial

En acabar el període de tractament els animals s'immobilitzaven en una trampa de metacrilat i es van mantenir durant 30 minuts a la foscor per tal d'estabilitzar les mesures posteriors. Mitjançant un llum d'infrarojos es va fer un monitoratge de la temperatura de l'animal i es va mesurar la pressió arterial mitja a través de la cua utilitzant un sensor connectat a un mesurador de pressió *Lectromed High Gain Pre-amplifier type 5240* (Lectromed, Letchworth, UK). Com a valor de pressió arterial es va utilitzar la mitja de tres mesures de pressió consecutives.

6. Laparotomia i recollida de mostres

En finalitzar el període de tractament i després d'haver mesurat la pressió arterial es va procedir a realitzar-los una laparotomia per tal de mesurar la pressió portal i d'extreure les mostres necessàries per l'estudi. La laparotomia es va realitzar amb l'animal en dejú i sota anestèsia general en estrictes condicions d'asèpsia. Com a anestèsic es va utilitzar una solució de ketamina (Ketolar®; Pfizer), atropina (Braun) i diazepam (Valium®; Roche), administrada per via intramuscular.

7. Determinació de la pressió portal

En fer la laparotomia, es va identificar la vena mesentèrica superior i es va cateteritzar amb un catèter de polietilè (Abbocath®-T 20G; ø 1.1 mm, 64 mL/min, L 32mm; Abbott, Sligo, Ireland). Aquest catèter es va connectar a un mesurador de pressió *Lectromed High Gain Pre-amplifier type 5240* (Lectromed, Letchworth, UK) i es va procedir a mesurar la pressió portal dels animals.

8. Grau de derivació portosistèmica

Immediatament després de determinar la pressió portal es va procedir a injectar 40.000 microesferes fluorescents (FluoSpheres® polystyrene microspheres, 15 µm, red fluorescent, Invitrogen, Carlsbad, California) en 0,2 mL de solució salina a través del mateix catèter de polietilè per tal d'avaluar el grau de derivació portosistèmica. En aquest moment es va procedir al sacrifici dels animals mitjançant una toracotomia total. D'aquesta manera es van poder recollir

mostres de fetge i de pulmó que van ser pesades i processades per tal de recuperar les microesferes fluorescents injectades. Es van recollir mostres de fetge com a representació de la circulació portal i mostres de pulmó com a representació de la circulació sistèmica.

Per processar les mostres vam adaptar el protocol del Fluorescent Microspheres Research Center 1999. Tant les mostres de fetge com les de pulmó es van introduir en tubs de polipropilè durant 2 setmanes en que els teixits experimentaven autòlisi. Posteriorment es van afegir 8 mL d'una solució d'hidròxid potàssic etanolic al 2,3 molar (hidròxid potàssic i etanol, Sigma-Aldrich) amb polisorbat 80 al 0,5% (Tween® 80, Sigma-Aldrich) i es van agitar les mostres breument en un agitador tipus vòrtex abans d'incubar-les a 50°C en un bany agitador durant 24 hores. Es va repetir el procediment d'agitació i posterior incubació en agitació durant 24 hores, així que en total les mostres es van incubar durant 48 hores. Després es van agitar breument abans de centrifugar-les a una acceleració de 2000 g durant 20 minuts. Es va descartar gairebé tot el sobrenedant deixant només aproximadament uns 1,5 mL per mostra juntament amb el precipitat. Es van afegir 8 mL de tritó X-100 (Sigma-Aldrich) i es van agitar breument les mostres abans de centrifugar-les a una acceleració de 2000 g durant 20 minuts. Es van descartar gairebé tots el sobrenedants deixant només aproximadament 1 mL per mostra juntament amb el precipitat. Es van afegir 7 mL de tampó fosfat salí (PBS) i es van agitar breument les mostres abans de centrifugar-les a una acceleració de 2000 g durant 20 minuts. Es van descartar gairebé tots el sobrenedants deixant com a molt 150 µL per mostra juntament amb el precipitat. Es van afegir 3 mL de 2-etoxietil acetat i es van agitar les mostres en un agitador tipus vòrtex fins a resuspendre el precipitat. Es van mantenir llavors durant 48 hores a la foscor i a temperatura ambient. Passat aquest temps es van tornar a agitar fins a resuspendre el precipitat i es van mantenir a la foscor durant 72 hores. Es van agitar les mostres fins a resuspendre el precipitat i es van centrifugar a una acceleració de 2000 g durant 20 minuts. Finalment es van recollir els sobrenedants, es van descartar els precipitats i es va procedir a lectura de la fluorimetria utilitzant un fluorímetre (*Varioskan Flash Multimode Reader*; Thermo Fisher Scientific). El percentatge de derivació portosistèmica per cada animal es va calcular segons la següent fórmula:

$$\% \text{ Derivació portosistèmica} = \left[\frac{\text{Fluorescència de la mostra de pulmó}}{\text{Fluorescència Total (mostra de pulmó + mostra de fetge)}} \right] \times 100$$

9. Paràmetres analítics de funció hepàtica

Es van recollir mostres de sang de la vena cava inferior al moment del sacrifici. Amb aquestes mostres es va procedir a la determinació bioquímica de: aspartataminotransferasa (AST), alaninaaminotransferasa (ALT), bilirubina, albúmina, triglicèrids urea i glucosa. Les determinacions es van obtenir mitjançant un autoanalitzador (*Dimension Clinical chemistry syste*.; Dade Behring-Siemens, Madrid, Espanya).

10. Incidència de translocació bacteriana

Es van recollir com a mínim 3 nòduls mesentèrics, particularment aquells que drenaven limfa de l'ili i el cec, es van netejar amb solució salina estèril, pesar i immediatament es van homogeneïtzar i sembrar en medi de cultiu (*Brain Heart Infusion Agar*) durant 24 hores. Posteriorment es sembraren dues alíquotes, una en plaques agar sang i l'altra en placa MacConkey.

11. Contingut bacterià ileal

Durant la laparotomia i després de recollir totes les mostres abans mencionades, es va identificar la regió ileal i es van obtenir 1 mL de contingut ileal. A aquestes mostres se'ls hi van afegir el triple de pes en volum d'aigua destil·lada i es van agitar en un agitador tipus vòrtex fins la seva homogeneïtzació. A continuació es van diluir 100 µL d'aquestes mostres en 900 µL d'aigua bidestil·lada (dilució 1/40) homogeneïtzant novament les mostres. D'aquesta dilució 1/40 es van diluir 50 µL de mostra diluïda en 950 µL d'aigua bidestil·lada (dilució 1/800) i finalment es va fer una darrera dilució de 50 µL de la mostra diluïda 1/800 en 950 µL d'aigua bidestil·lada, per arribar a una dilució final 1/16.000. Es van sembrar 100 µL de les dilucions 1/800 i 1/16.000 en plaques d'agar sang, per triplicat, obtenint una dilució final de la mostra de 1/8000 i 1/160.000 respectivament. Les plaques d'agar sang es van incubar en una estufa (Indelab C1-36L) durant 48 hores a 37°C. Passat aquest temps d'incubació es va fer el recompte de les unitats formadores de colònies per mil·lilitre de contingut ileal (UFC/mL). El recompte es va dur a terme en les plaques de menor dilució (1/8000) sempre que va ser possible. En aquells casos en que no es van poder diferenciar les colònies a la placa es va procedir a fer el recompte en les plaques de major dilució (1/160.000). Es va considerar sobrecreixement bacterià el recompte superior a la mitja + 2 desviacions estàndard dels controls (Guarner et al. 1997).

12. Determinació dels nivells d'amoni a plasma i cervell

Els nivells d'amoni es van mesurar a plasma i a còrtex cerebral. Per obtenir plasma es van extreure 150 µL de sang en tubs heparinitzats de la vena cava inferior dels animals, els quals es van centrifugar a una acceleració de 1000 g durant 10 minuts per obtenir-ne el plasma. Les mostres de plasma es van emmagatzemar a -80°C fins l'anàlisi posterior.

De manera semblant, es van prendre mostres dels cervells dels animals que es van pesar i es van desproteïnitzar. Així, es van afegir 5 volums d'àcid perclòric fred al 6% a les mostres de còrtex i es van homogeneïtzar amb un homogeneïtzador (Bio-Gen Pro200, Pro Scientific Inc.). Posteriorment les mostres es van centrifugar a una acceleració de 12.000 g durant 20 minuts i es van recollir els sobrenedants. Aquests es van neutralitzar amb bicarbonat de potassi al 25% pes/volum. Un cop processades les mostres es van emmagatzemar a -80°C fins el seu anàlisi. Tant les mostres processades de plasma com les de còrtex cerebral es van analitzar mitjançant el kit comercial *Ammonia Assay Kit* (Sigma-Aldrich; veure Annex).

13. Edema cerebral de baix grau

Es va considerar el contingut hídic cerebral com a mesura de l'edema cerebral de baix grau. Es van extirpar mostres de l'hemisferi frontal esquerra del cervell. Les mostres es van pesar i posteriorment es van situar en un forn Pasteur a 90°C durant 48 hores per tal d'evaporar tot el contingut d'aigua. Transcorregut aquest temps les mostres es van tornar a pesar. La diferència entre el pes inicial i el pes final de les mostres es va considerar com el seu contingut hídic (Vogels et al. 1997).

$$\% \text{ Contingut hídic cerebral} = \left[\frac{(\text{Pes mostra cerebral fresca}) - (\text{Pes mostra cerebral seca})}{(\text{Pes mostra cerebral fresca})} \right] \times 100$$

14. Histologia del fetge i quantificació de la fibrosi

Es van recollir mostres de fetge pel seu examen histològic, així com mostres pel següent estudi *in vitro* que es van emmagatzemar a -80°C fins la seva posterior utilització. Les mostres per l'estudi histològic es van submergir en formaldehid al 4% i, posteriorment, es van embeure en parafina i se'n van obtenir seccions de 5 µm de gruix. Els canvis a la histopatologia al fetge es van determinar mitjançant la tinció de les seccions en hematoxilina-eosina i per tricròmic de

Masson, a una ampliació de 10x. Les mostres de fetge tenyides per hematoxilina-eosina es van avaluar utilitzant el sistema de puntuació de Scheuer (Scheuer 1991)(Taula 4). La part superior de la taula valora el grau d'activitat inflamatòria i necròtica de l'hepatitis crònica. La part inferior avalua el grau de fibrosi i de cirrosis.

La tinció per tricròmic de Masson es basa en la utilització de tres tincions. Primerament una tinció amb hematoxilina que tenyeix els nuclis. A continuació, s'utilitza una tinció àcida que s'uneix als components acidòfils del teixit (citoplasma, múscul, col·lagen), seguida d'un tractament amb fosfoàcids, que fa que els components ja tenyits però menys permeables retenguin la tinció anterior mentre que el col·lagen el difon i queda sense tenyir però impregnat de grups àcids i, per tant, amb capacitat per unir-se a tincions bàsiques. Així, la tercera tinció és una tinció bàsica que tenyeix les fibres de col·lagen. D'aquesta manera s'obtenen les preparacions tenyides de la següent manera: nuclis negres, citoplasma, queratina i fibres musculars roses i fibres de col·lagen en blau. Pel que fa a la quantificació de l'àrea fibrosa, es va mesurar en quatre camps per cada mostra utilitzant el software *ImageJ* (NIH, USA) i es va fer la mitja dels quatre camps per cada mostra. La fibrosi es va expressar com a un percentatge de l'àrea total.

Grau	Activitat portal/perportal	Activitat lobular
0	Inexistent, mínima	Inexistent
1	Inflamació portal	Inflamació però sense necrosi
2	Necrosi parcel·lar perifèrica lleu	Necrosi focal amb cossos acidòfils
3	Necrosi parcel·lar perifèrica moderada	Lesió focal greu
4	Necrosi parcel·lar perifèrica greu	Dany difús incloent necrosi amb ponts
Estat	Criteris de Fibrosis	
0	Inexistent	
1	Tractes fibrosos de l'espai porta engruixits (fibrosi portal)	
2	Septes periportals o porto-portals amb arquitectura intacta	
3	Fibrosis amb distorsió de l'arquitectura però sense evidència de cirrosi	
4	Probable o definitiva cirrosi	

Taula 4: Classificació de Scheuer

15. Estadística

L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant el programa SPSS 15.0 per Windows (SPSS Inc.). Els resultats s'expressaren com a mitja \pm error estàndard o proporcions segons es requeria. Per les comparacions entre grups es va utilitzar el test ANOVA d'una variable o el test no paramètric corresponent, Kruskal-Wallis. Les comparacions *post hoc* per identificar parelles de grups diferents fins al nivell de 0,05 es van realitzar mitjançant el test de Duncan o el test U de Mann-Whitney, respectivament. Les comparacions de les proporcions entre grups es van fer mitjançant el test χ^2 .

El criteri adoptat de significació estadística va ser $p < 0,05$, excepte per les correlacions un a un que va ser de $p < 0,01$.

Estudi *in vitro*

1. Animals i estabulació

Es van utilitzar un total de 17 rates Sprague-Dawley mascles (Harlan Ibérica) amb un pes inicial de 100-120 g. Els animals van ser estabulats en les mateixes condicions que a l'estudi *in vivo* (Veure apartat 1 de l'estudi *in vivo*).

L'estudi es va realitzar seguint la normativa de la Guia pel Benestar i Ús dels Animals de Laboratori amb l'autorització del Comitè Ètic d'Experimentació Animal de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol de Badalona.

2. Disseny Experimental

Per una banda, es van utilitzar 17 rates Sprague-Dawley mascles (Harlan Ibérica) dels quals a 12 se'ls hi va induir cirrosi mitjançant CCl_4 i 5 es van utilitzar com a controls sans. Dels animals als que es va induir cirrosi (Veure apartat 3 de l'estudi *in vivo*), degut a l'elevada mortalitat del model, només en van sobreviure 5. Així doncs, a l'estudi es van avaluar els grups experimentals següents (Figura 18):

- **Grup Sa:** Animals sans als quals no se'ls va induir cirrosi però als que igualment se'ls va administrar fenobarbital a l'aigua de beguda. (n=5)
- **Grup Cirrosi:** Animals als quals es va induir cirrosi fins al desenvolupament d'ascites. (n=5)

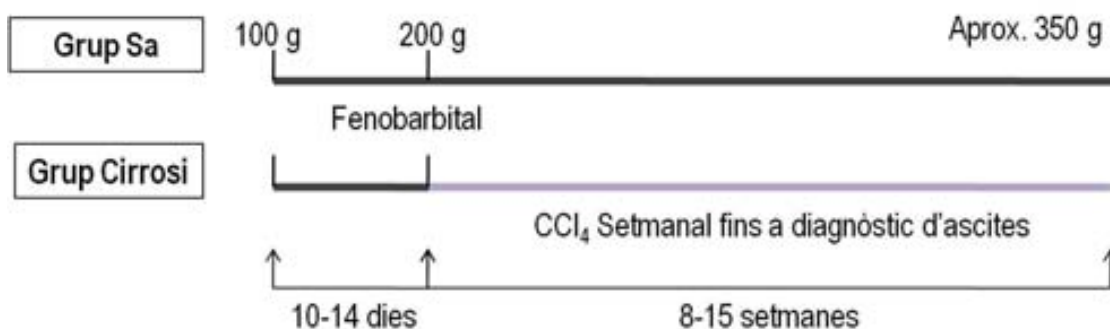


Figura 18: Disseny experimental de l'estudi *in vitro*.

Amb aquests grups, un cop diagnosticada l'ascites per paracentesi exploradora, o en arribar els animals del grup Sa a un pes equivalent de 350g, es va procedir a fer una laparotomia

per tal d'extreure'n els fetges. Aquests fetges es van utilitzar per aïllar-ne els hepatòcits i establir un cultiu primari d'hepatòcits, tant de fetges d'animals sans com cirròtics.

D'altra banda, en aquest estudi també es van utilitzar mostres de l'estudi anterior *in vivo*, concretament mostres de teixit hepàtic, que es van extreure durant el curs de la laparotomia i es van congelar a -80°C fins la seva utilització. Així doncs, vam disposar de mostres de teixit hepàtic dels mateixos grups que a l'estudi *in vivo* (Veure apartat 2 de l'estudi *in vivo*):

- **Grup Cirrosi+Vehicle** (n=9)
- **Grup Cirrosi+Rimonabant** (n=10)
- **Grup Sa+Vehicle** (n=10)
- **Grup Sa+Rimonabant** (n=10)

3. Aïllament i establiment dels cultiu primaris d'hepatòcits

Es van aïllar els hepatòcits dels fetges dels dos grups d'animals inclosos de nou per l'estudi *in vitro*, es a dir, vam aïllar hepatòcits dels fetges d'animals del grup Cirrosi i del grup Sa. Per establir cada cultiu primari es va utilitzar el fetge sencer de l'animal i per cada grup es van establir 5 cultius primaris.

Els hepatòcits es van aïllar del total del fetge mitjançant perfusió amb col·lagenasa. Es van anestesiari els animals i sota campana de flux se'ls hi va practicar una laparotomia. Per dur a terme la perfusió es va utilitzar medi Hanks amb heparina i sense calci (veure Annex) amb el que es va perfondre el fetge a través de la vena porta. Per la perfusió es va preparar una lligadura a la vena cava (per sobre de l'alçada dels ronyons) i es va utilitzar una cànula per injectar el medi a través de la vena porta amb l'ajut d'una bomba peristàtica (Gilson Minipuls3). Un cop iniciada la perfusió es va tallar la vena cava inferior per sota dels ronyons i es va procedir a sacrificar l'animal. D'aquesta manera es va perfondre el fetge amb 200mL medi Hanks amb heparina i sense calci a 37°C a 20mL/min. El medi entrava a través de la vena porta i sortia per la vena cava. Seguidament es va perfondre el fetge amb 200mL de medi Hanks amb clorur de calci i l'enzim col·lagenasa (0,15g/L pels fetges sans i 0,2g/L pels cirròtics; Col·lagenasa tipus II, Invitrogen) inicialment a un ritme de 10mL/min. Passats 5 minuts es va procedir a lligar la vena cava per sobre dels ronyons amb la lligadura que estava preparada. Un cop lligada la vena cava es va continuar perfonent el medi Hanks amb clorur de calci i col·lagenasa a 5mL/min. En acabar la perfusió es va extreure el fetge de l'animal i es va continuar la resta del procés sota campana de flux laminar al laboratori de cultius.

Es va procedir a la disgregació mecànica del fetge a una placa de petri i es va fer una segona incubació en 100mL de medi Hanks amb clorur de calci i col·lagenasa (0,1g/L per tots els fetges) durant 10 minuts a 37°C en agitació. Seguidament es va fer passar la suspensió resultant per un filtre de niló de 100 µm estèril (Cell strainer, BD) i es va resuspendre amb medi de Krebs i posteriorment es va centrifugar a 50 g durant 3 minuts. Es va descartar el sobrenedant i vam conservar el precipitat, el qual van tornar a rentar amb medi de Krebs i centrifugar a 50 g durant 90 segons, dues vegades més. Finalment vam descartar el sobrenedant i vam conservar el precipitat que contenia els hepatòcits.

Es va valorar la viabilitat cel·lular mitjançant tinció amb blau de tripà i es van sembrar al menys 1.000.000 cèl·lules/pou en plaques de cultiu de 6 pous recobertes amb matrigel (BD) amb medi de cultiu Williams E suplementat (veure Annex). A las 2 hores de la sembra, es van retirar les cèl·lules no adherides i es va reemplaçar el medi de cultiu per medi Williams E sense sèrum i amb ricina A (Sigma-Aldrich) a una concentració 10ng/mL. La ricina A és un inhibidor de la síntesi de proteïnes que és absorbit selectivament per les cèl·lules no parenquimals al fetge, així que només exerceix la seva toxicitat sobre aquestes cèl·lules però no sobre els hepatòcits (Johnston, Jasuja 1994). Es va utilitzar la ricina A per assegurar la puresa dels cultius d'hepatòcits. Passada una hora de tractament amb ricina A es va canviar el medi per medi Williams E amb sèrum boví fetal.

4. Assaig a cultius primaris d'hepatòcits amb l'antagonista de CB1 rimonabant

Un cop establerts els cultius primaris d'hepatòcits es va procedir a l'assaig *in vitro* amb rimonabant. Per realitzar l'estudi es van fer servir 5 cultius primaris d'hepatòcits provinents de fetges d'animals sans i 5 cultius primaris d'hepatòcits provinents d'animals cirròtics.

Per cada cultiu primari es van sembrar una placa de 6 pous de 1.000.000 de cèl·lules que es van cultivar amb medi Williams E suplementat (veure Annex). D'aquests 6 pous, es van establir 3 temps de cultiu (24 hores, 72 hores i 7 dies) i 2 grups de tractament (rimonabant i vehicle). La concentració de rimobant utilitzada en el tractament va ser de 0,1 µM (Figura 19).

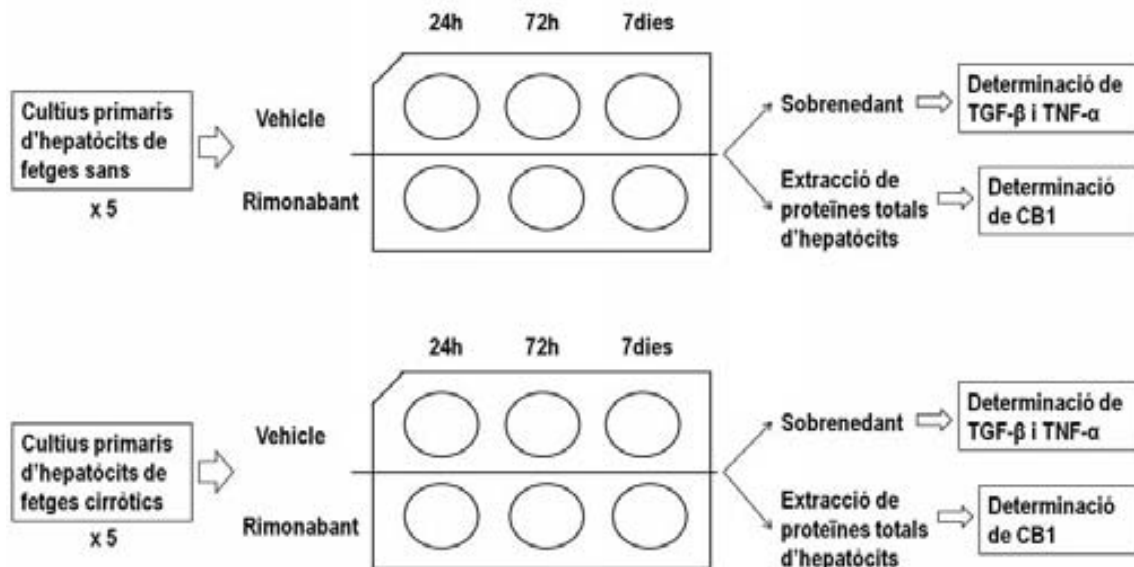


Figura 19: Disseny de l'assaig *in vitro* en cultius primaris d'hepatòcits.

Passades 24h es van extreure els sobrenedants així com les proteïnes dels hepatòcits dels pous corresponents. I així a les 72h i als 7 dies. Les mostres de sobrenedants es van emmagatzemar a -80°C fins la seva utilització. L'extracció de les proteïnes dels hepatòcits es va fer segons es detalla a l'apartat següent i es van emmagatzemar també a -80°C fins el seu processament posterior.

5. Extracció de proteïnes totals

Es van extreure les proteïnes totals tant de mostres de teixit hepàtic com dels cultius primaris d'hepatòcits per realitzar les determinacions de CB1 i TGF- β corresponents. Vam utilitzar solució de lisi RIPA (formulació a l'annex) al que es va afegir un còctel inhibidor de proteases (Complete Mini, Roche).

En el cas de les mostres de teixit hepàtic es va homogeneïtzar 5mg de teixit en 300 μL de solució de lisi (Bio-Gen Pro200, Pro Scientific Inc.). Un cop homogeneïtzades en solució de lisi es van mantenir en agitació constant 2 hores a 4°C .

Pel que fa a les mostres de cultius primaris d'hepatòcits primerament es va descartar el medi de cultiu i es va procedir a fer un raspall de la superfície de cultiu per desenganxar les cèl·lules. Es van resuspendre les cèl·lules en 300 μL de solució de lisi RIPA. Un cop vam tenir les cèl·lules en suspensió en la solució de lisi es van mantenir en agitació constant 30 minuts a 4°C .

Posteriorment, tant les mostres de teixit com de cultius primaris es van centrifugar durant 20 minuts a 12000 rpm a 4°C i se'n van recollir els sobrenedants contenint les proteïnes.

Finalment, un cop recollida la mostra es va fer un assaig de BCA (Pierce; veure Annex) per determinar la concentració de proteïna total i es va procedir a congelar-la a -80°C.

6. Determinació de CB1 i TGF- β per *Western Blot*

Per tal de determinar i quantificar la presència de CB1 als hepatòcits i de CB1 i TGF- β a teixit hepàtic, vam procedir a analitzar les mostres de proteïna total per *Western Blot*.

Primerament vam descongelar les mostres, emmagatzemades a -80°C. Per dur a terme l'assaig, vam utilitzar la mateixa quantitat de cada mostra (20 μ g de proteïna) desnaturalitzades amb agent reductor (*Reducing Agent*, Invitrogen) durant 10 minuts a 70 °C. Es van carregar dos carrils per cada mostra. Les proteïnes es van fraccionar mitjançant electroforesis en gel de poliacrilamida amb dodecilsulfat sòdic (SDS-PAGE) utilitzant gels NuPAGE Novex Bis-Tris en gradient de 4 a 12% (Invitrogen).

Posteriorment es van transferir a membrana de nitrocel·lulosa Protran 0.45 μ M (Whatman) per transferència semi-seca (Biometra Fast Blot B32) a 15 volts durant 30 minuts. Es va comprovar la transferència per tinció amb solució Ponceau (Sigma-Aldrich). Les membranes es van rentar amb PBS i després bloquejar amb PBS amb 5% de llet desnatada durant 1 hora. Seguidament es van rentar amb PBS per incubar-les durant la nit a 4°C amb els anticossos primaris diluïts en PBS amb 0.5 % de polisorbitat (PBS-T). Els anticossos primaris utilitzats van ser anticòs anti-receptor CB1 (*rabbit anti-CB1R*; dilució 1:150; Affinity BioReagents), anticòs anti-receptor TGF- β (*mouse anti-TGF- β* ; dilució 1:1000; Chemicon Millipore) i anticòs anti- β -actina (*mouse anti- β -actin*; dilució 1:4.000; Sigma-Aldrich) com a control de càrrega.

Les membranes es van netejar repetidament amb PBS-T i es va procedir a la incubació amb els anticossos secundaris marcats amb fluorescència durant 1 hora a temperatura ambient i en foscor, diluïts en PBS-T amb 0.5 % de llet desnatada. Els anticossos secundaris utilitzats van ser anticòs *anti-rabbit* (IRDye 680 *Goat Anti-Rabbit IgG*; dilució 1:25.000; Li-Cor Biosciences) i anticòs *anti-mouse* (IRDye 800CW *Donkey Anti-Mouse IgG*; dilució 1:25.000; Li-Cor Biosciences).

Seguidament es van rentar les membranes repetidament amb PBS-T en foscor i finalment es van rentar amb PBS. L'expressió relativa de CB1 es va quantificar per escanejat de fluorescència a l'infraroig mitjançant *Odyssey Infrared Imaging System* (Li-Cor Biosciences). Els

valors es van expressar en intensitat integrada (o volum de píxels) que correspon a la suma dels valors d'intensitat de tots els píxels d'una banda (als que s'ha restat els píxels corresponents al fons), multiplicada per l'àrea de la banda.

7. Determinació de TGF- β a plasma i sobredant d'hepatòcits

Per la determinació dels nivells de TGF- β a plasma i a sobredant es va utilitzar un kit ELISA, seguint les instruccions del fabricant (Diaclone; veure Annex). Els resultats obtinguts es van expressar en $\mu\text{g/mL}$ i pg/mL respectivament.

8. Determinació de TNF- α

Per la determinació dels nivells de TNF- α a teixit hepàtic i a sobredant es va utilitzar un kit ELISA, seguint les instruccions del fabricant (Invitrogen; veure Annex). Les mostres de teixit hepàtic es van preparar prèviament homogeneïtzant 50mg de teixit en 1mL d'aigua utilitzant un homogenitzador (Bio-Gen Pro200, Pro Scientific Inc.). Els resultats obtinguts es van expressar en ng/g i pg/mL , respectivament.

Resultats

Estudi *in vivo*

A l'estudi *in vivo* la majoria dels paràmetres avaluats estaven significativament alterats al model de cirrosi experimental per CCl₄. Així doncs, el grup d'estudi Cirrosi va ser significativament diferent dels grups sans a la majoria de paràmetres, tal i com s'indica a la següent exposició de resultats.

1. Efecte de rimonabant sobre la histologia del fetge

Tots els animals diagnosticats amb ascites presentaven cirrosi amb nòduls de regeneració. Així tant el grup Cirrosi com el grup Cirrosi+Rimonabant van obtenir valoracions del 3 al 4 segons la classificació de Scheuer, sense observar diferències entre ells. Els corresponents grups controls van obtenir valoracions de 0 a la mateixa classificació i, per tant, no presentaven alteracions histològiques.

Pel que fa a la quantificació de l'àrea fibrosa a fetge, el tractament amb rimonabant sí que va ser capaç de disminuir el grau de fibrosi de manera significativa. En efecte, mentre que l'àrea de fibrosi va ser del 24,14%±9,23 en el grup Cirrosi, aquesta va disminuir significativament fins al 11,29%±4,63 en el grup Cirrosi+Rimonabant (Figures 20 i 21).

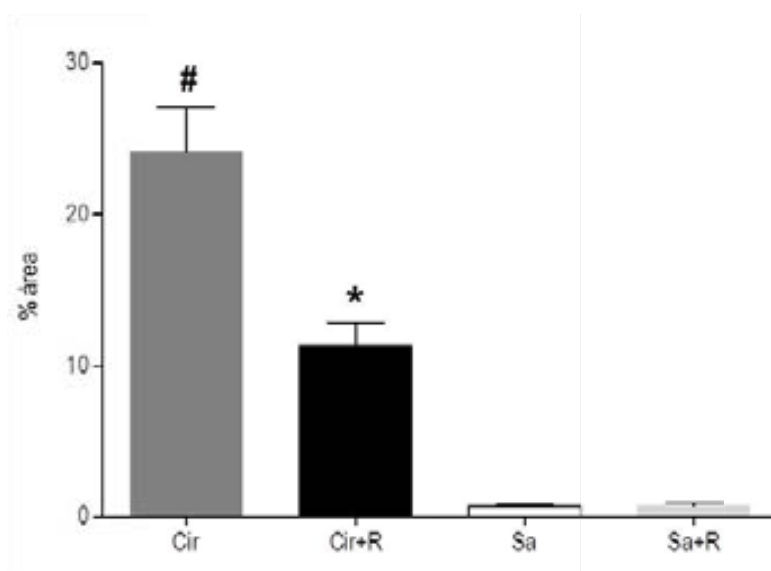


Figura 20: Efecte de rimonabant sobre la fibrosi hepàtica. Quantificació de l'àrea fibrosa mitjançant tinció per Tricromic de Mason expressada en percentatge. * P<0,05 vs. tots els grups; # P<0,05 vs. els grups Sa i Sa+R.

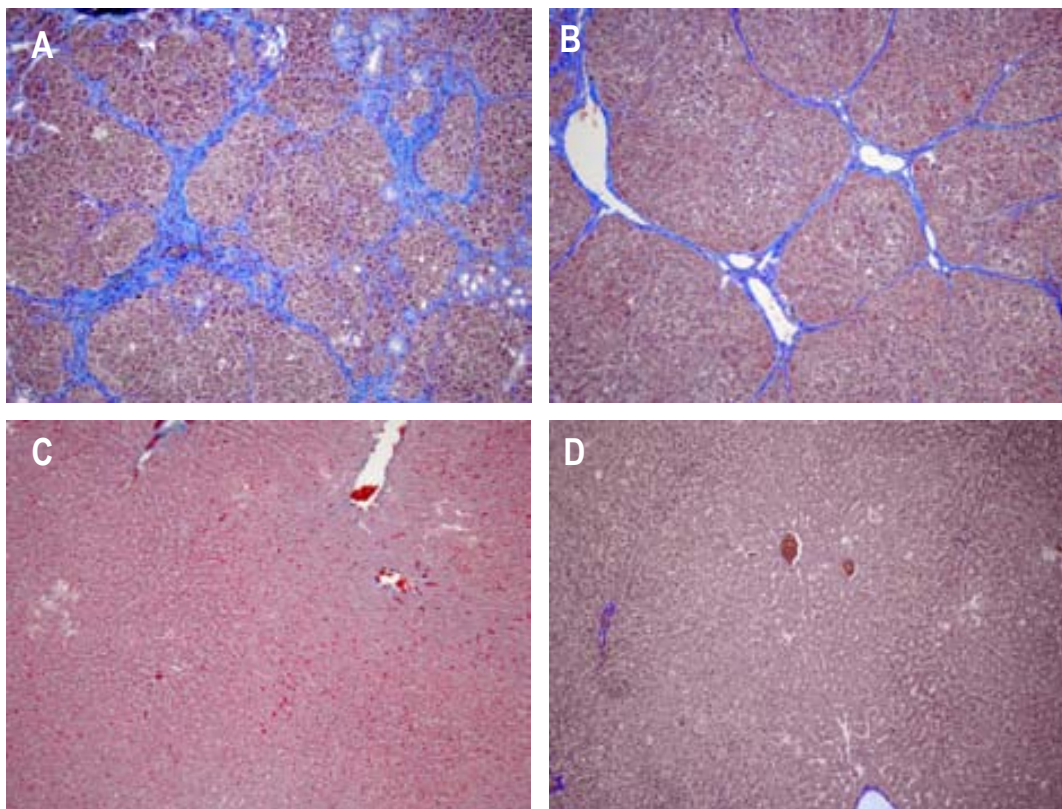


Figura 21: Talls histològics representatius de cada grup. Tinció per Tricromic de Mason amb les fibres de col·lagen tenyides de color blau. A: Cirrosi; B: Cirrosi+Rimonabant; C: Sa; D:Sa+Rimonabant. El dipòsit de col·lagen va ser menor en el grup tractat amb rimonabant (B) mentre que en els grups sans no s'observa acumulació de col·lagen.

2. Efecte de rimonabant sobre l'hemodinàmica portal i sistèmica

L'administració de rimonabant a llarg termini va ser capaç d'augmentar fins a normalitzar els valors de pressió arterial mitja. Efectivament, els valors de pressió expressats en mil·límetres de mercuri (mmHg), observats al grup Cirrosi+Rimonabant ($136,2 \pm 5,36$) van ser similars als observats als grups Sa ($137,5 \pm 2,84$) i Sa+Rimonabant ($145,7 \pm 2,68$) i significativament superiors dels valors observats al grup Cirrosi ($116 \pm 2,08$) (Figura 22).

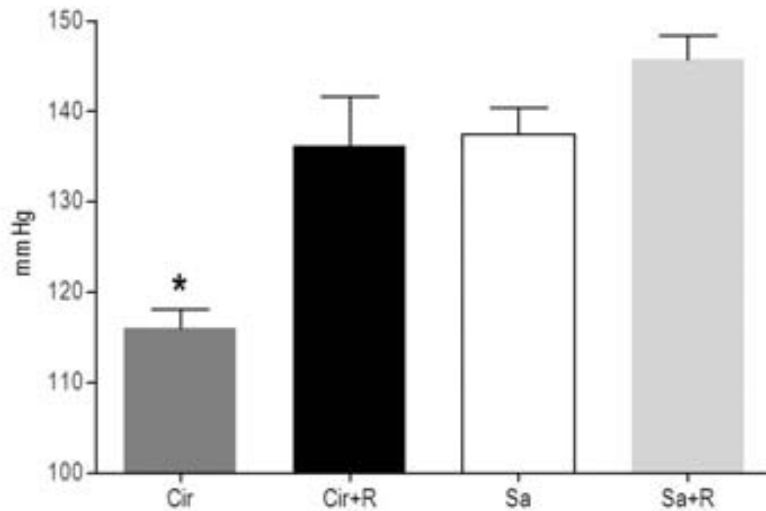


Figura 22: Efecte de rimonabant sobre la pressió arterial mitja. El grup Cirrosi va ser diferent dels grups Sa i Sa+R, però també del grup Cirrosi+Rimonabant. No hi va haver diferències entre els grups Cirrosi+Rimonabant, Sa i Sa+Rimonabant. * $P < 0,05$ vs. tots els grups.

El tractament amb rimonabant va disminuir de manera significativa l'aparició de derivacions portosistèmiques. Tot i que el grau de derivacions portosistèmiques, expressat en percentatge, del grup Cirrosi+Rimonabant (13,59) va ser significativament major que els grups Sa i Sa+Rimonabant (0,1 i 0,026, respectivament), a la vegada fou significativament menor que el grup de Cirrosi (38,72) (Figura 23).

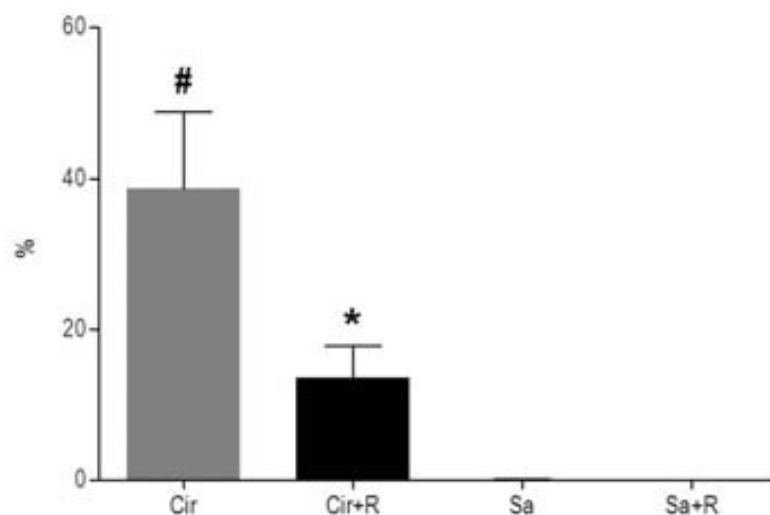


Figura 23: Efecte de rimonabant sobre les derivacions portosistèmiques. * $P < 0,05$ vs. tots els grups; # $P < 0,05$ vs. els grups Sa i Sa+R.

Per contra, pel que fa a l'hemodinàmica portal l'administració de rimonabant no va millorar els nivells de pressió portal. El grup Cirrosi+Rimonabant va presentar uns valors de pressió portal ($14,81 \pm 0,98$ mmHg), expressats en mil·límetres de mercuri, significativament diferents dels valors observats als grups Sa i Sa+Rimonabant ($6 \pm 0,88$ i $8,68 \pm 0,39$ mmHg, respectivament). A més, aquests valors no van ser estadísticament diferents dels valors del grup Cirrosi ($13,50 \pm 1,4$ mmHg)(Figura 24).

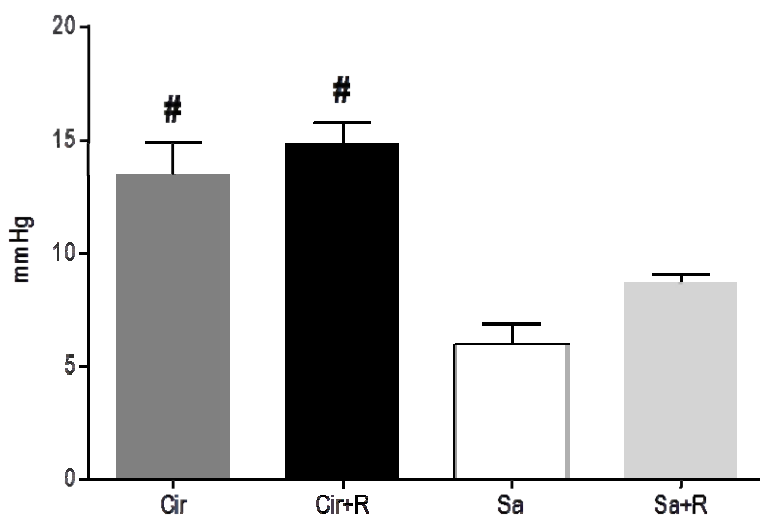


Figura 24: Efecte de rimonabant sobre la pressió portal. El grup Cirrosi+Rimonabant no va ser diferent del grup Cirrosi. Aquests dos grups sí que van ser diferents però dels grups Sa i Sa+Rimonabant. # $P < 0,05$ vs. els grups Sa i Sa+R.

3. Efecte de rimonabant sobre la funció hepàtica

Es van valorar diferents paràmetres bioquímics de funció hepàtica a plasma que es mostren a continuació (Taula 5). Tots ells estaven significativament alterats al grup Cirrosi en comparació amb els grups Sa i Sa+Rimonabant. El tractament amb rimonabant s'acompanyà d'una disminució significativa dels nivells d'AST i bilirubina, essent aquests significativament menors que els del grup Cirrosi. El tractament amb rimonabant també s'acompanyà d'una tendència marcada a la disminució d'ALT, tot i que en aquest cas no hi ha diferències estadísticament significatives. També es va observar una lleugera tendència a la normalització dels nivells de triglicèrids, no observant-se diferències estadístiques entre el grup Cirrosi+Rimonabant i els grups Sa i Sa+Rimonabant. Els nivells d'urea van augmentar i no van presentar diferència estadística amb els del grup Sa, tot i que sí que van ser diferents del grup Sa+Rimonabant. Finalment no es van observar millores significatives ni en els nivells d'albumina ni de glucosa. Així en conjunt, vam observar una funció hepàtica més conservada.

	Cirrosi	Cirrosi+Rimonabant	Sa	Sa+Rimonabant
AST (UI/L)	548.0±142.5 ^a	226.1±33.32 ^{a,b}	89.7±5.82	84.4±4.49
ALT (UI/L)	284.0±110.9 ^a	89.27±7.64 ^a	56.6±6.53	44.87±2.14
Bilirubina (µmol/L)	7.12±2.27 ^a	2.39±0.90 ^{a,b}	0.15±0.05	0.1±0.01
Triglicèrids (mmol/L)	0.78±0.086 ^a	0.60±0.064	0.43±0.075	0.29±0.062
Urea (mmol/L)	4.87±0.56 ^a	6.07±0.40 ^c	6.41±0.18 ^c	7.40±0.23
Albúmina (g/L)	6.43±0.85 ^a	7.83±0.40 ^a	10.8±0.25	9.86±0.46
Glucosa (mmol/L)	8.96±0.77 ^a	9.66±0.55 ^d	12.34±0.42	11.76±0.32

Taula 5: Efecte de rimonabant sobre paràmetres bioquímics de funció hepàtica. ^a P<0,05 vs. Sa i Sa+Rimonabant; ^b P<0,05 vs. Cirrosi; ^c P<0,05 vs. Sa+Rimonabant; ^d P<0,05 vs. Sa

A més el tractament amb rimonabant també afavoriria la conservació de l'estat general de l'animal. Com a paràmetre per avaluar aquest estat general de l'animal, vam valorar la diferència de pes corporal a l'inici del període de tractament i al final i vam expressar aquesta diferència com a percentatge de diferència de pes (Figura 25). Tot i que rimonabant té un efecte de reducció de la ingesta provocant un menor increment de pes en els animals sans tractats (0.58%±2.66), el tractament amb rimonabant es va acompanyar d'un augment significatiu del pes (6.76%±6.95) en els animals cirròtics, en comparació amb la pèrdua gairebé un 5% (-4.48±0.09) del pes en els animals cirròtics no tractats. Aquest increment de pes als animals tractats amb rimonabant fou estadísticament similar al dels animals del grup Sa (3.72±2.80).

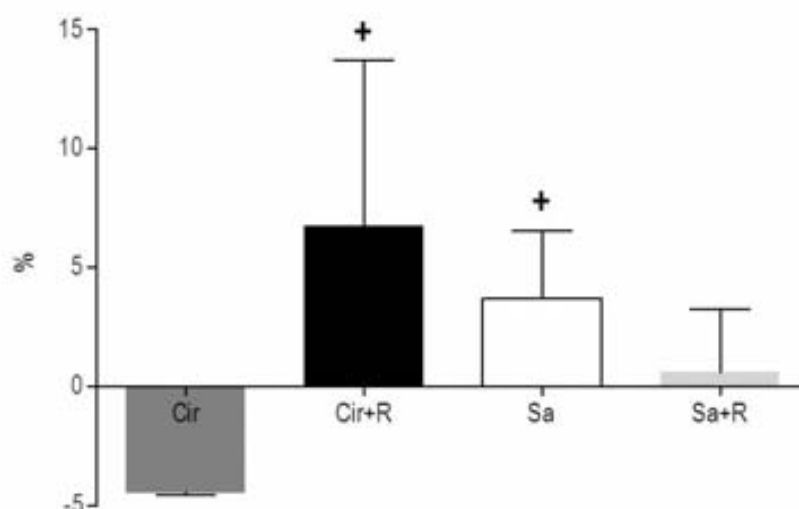


Figura 25: Efecte de rimonabant sobre la diferència de pes corporal entre l'inici i el final del període de tractament expressada en percentatge. + P<0,05 vs. Cirrosi i Sa+Rimonabant.

4. Efecte de rimonabant sobre la translocació bacteriana i els seus paràmetres associats

El tractament amb rimonabant es va associar a una incidència de translocació bacteriana semblant als animals controls (Figura 26). Així la incidència de translocació al grup Cirrosi+Rimonabant (20%) no va ser estadísticament diferent de les incidències dels grups Sa i Sa+Rimonabant (0% en ambdós casos), mentre que el grup Cirrosi (40%) sí que en va ser significativament diferent.

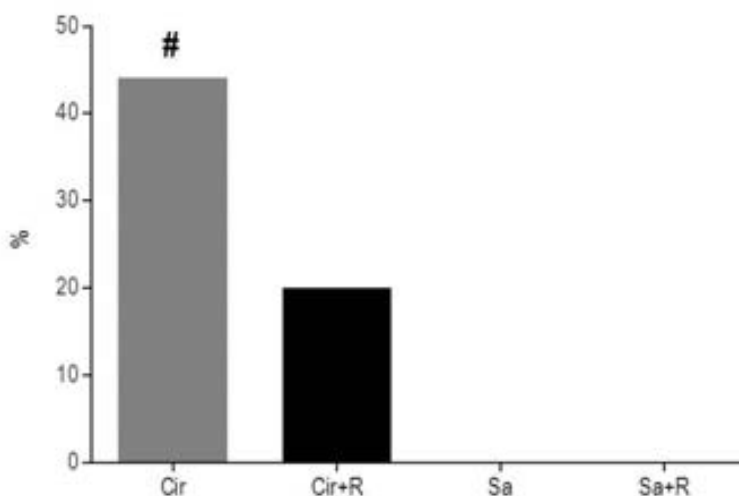


Figura 26: Efecte de rimonabant sobre la incidència de translocació bacteriana expressada en percentatge. # $P < 0,05$ vs. Sa i Sa+Rimonabant

Aquesta millora en la incidència de translocació bacteriana però es va correlacionar amb l'efecte de rimonabant sobre el contingut bacterià jejunal. La incidència de sobrecreixement al grup Cirrosi+Rimonabant (1/10) no van ser estadísticament diferents dels valors observats als grups Sa i Sa+Rimonabant (0/10 i 1/10, respectivament). En canvi, sí que va ser significativament diferents dels valors observats al grup Cirrosi (5/9) (Figura 27).

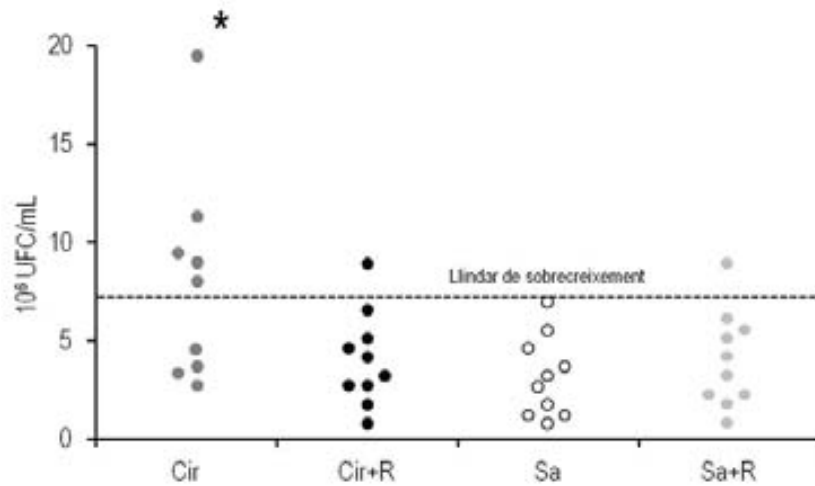


Figura 27: Contingut bacterià jejunar expressat en milions d'unitats formadores de colònies per mil·lilitre (UFC/mL). El grup Cirrosi va ser diferent dels grups Sa i Sa+R, però també del grup Cirrosi+Rimonabant. Aquest no va ser diferent de Sa i Sa+Rimonabant.* $P < 0,05$ vs. tots.

En canvi, no vam trobar diferències a la mesura del trànsit intestinal, associades al tractament amb rimonabant. De fet no vam trobar diferències entre cap dels grups (Cir $65,8\% \pm 4,56$; Cir+R $68,9\% \pm 1,55$; Sa $73,95\% \pm 2,62$ i Sa+R $71,29\% \pm 2,97$; $P = n.s.$)(Figura 28).

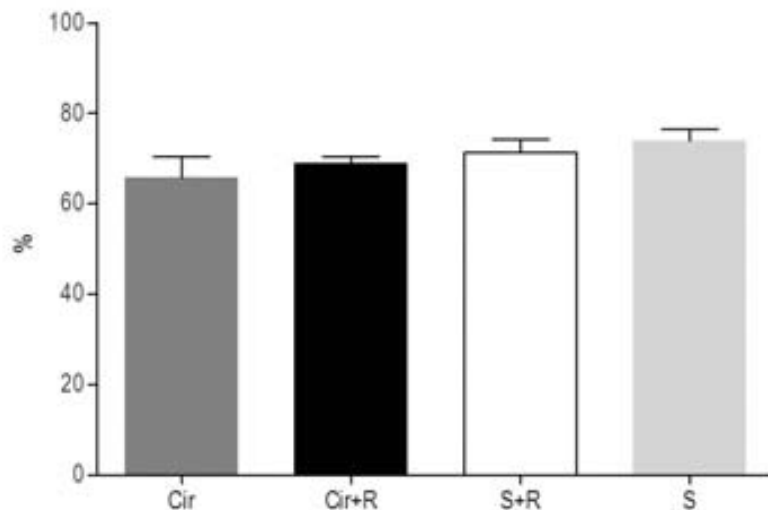


Figura 28: Trànsit intestinal expressat en percentatge.

5. Efecte de rimonabant sobre paràmetres associats a l'encefalopatia hepàtica

Com a paràmetres associats a l'encefalopatia hepàtica es van avaluar els nivells d'amoní tant plasmàtic com cerebral, així com la presència d'edema cerebral de baix grau.

L'administració de rimonabant va ser capaç de disminuir significativament els nivells d'amoní plasmàtic (Figura 29). En efecte mentre que els nivells d'amoní plasmàtic del grup en el grup Cirrosi van ser de $214.9 \pm 18.3 \mu\text{mol/L}$, aquests van disminuir significativament fins a $153.45 \pm 15.6 \mu\text{mol/L}$ en el grup de Cirrosi+Rimonabant. No obstant, ambdós valors seguien sent significativament superiors als observats en els animals dels grups Sa i Sa+Rimonabant (74.3 ± 10.9 i $75.7 \pm 8.4 \mu\text{mol/L}$, respectivament).

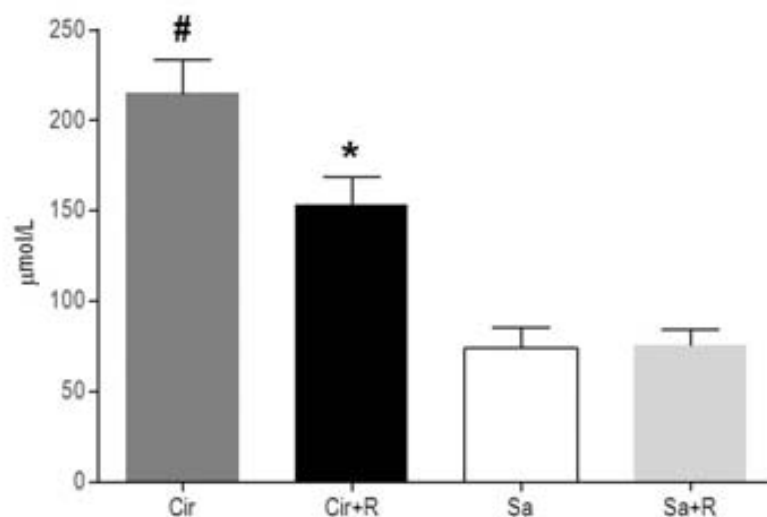


Figura 29: Efecte de rimonabant sobre els nivells d'amoní plasmàtic. * $P < 0,05$ vs. tots els grups; # $p < 0,05$ vs. Sa i Sa+R

A més, el tractament amb rimonabant també va normalitzar els valors d'amoní cerebral (Figura 30). Els nivells d'amoní cerebral del grup Cirrosi+Rimonabant ($4.44 \pm 0.52 \text{ mmol/Kg}$) no van ser estadísticament diferents dels nivells dels grups Sa i Sa+Rimonabant (3.65 ± 0.34 i $3.75 \pm 0.37 \text{ mmol/Kg}$, respectivament). Els nivells del grup Cirrosi ($4.86 \pm 0.34 \text{ mmol/Kg}$), en canvi, sí que van ser significativament superiors als dels grups Sa i Sa+Rimonabant.

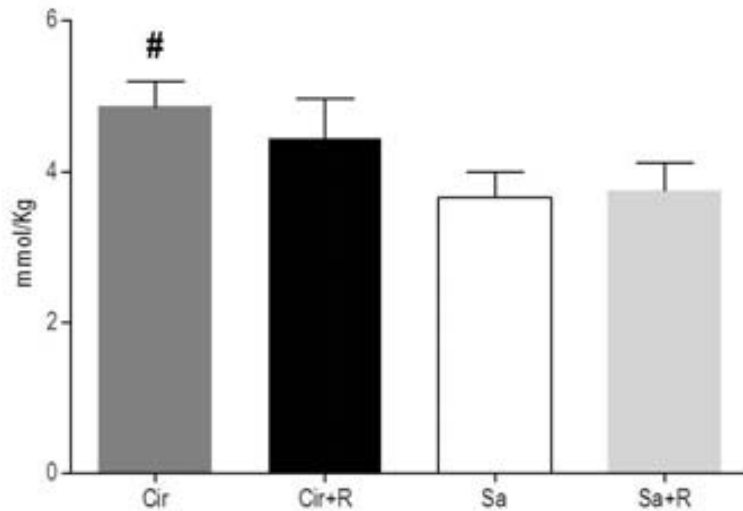


Figura 30: Efecte de rimonabant sobre els nivells d'amoni cerebral. # $P < 0,05$ vs. Sa i Sa+Rimonabant.

Com a valor indicador de l'edema cerebral de baix grau vam mesurar el contingut d'aigua cerebral el qual també es normalitzà en els animals tractats amb rimonabant (Figura 31). De manera similar, el contingut d'aigua cerebral, expressat en percentatge, del grup Cirrosi+Rimonabant (78.98 ± 0.06) no va ser estadísticament diferent dels valors dels grups Sa i Sa+Rimonabant (78.76 ± 0.09 i 78.67 ± 0.10 , respectivament), mentre que el grup Cirrosi (79.25 ± 0.66) sí que va ser significativament superiors als valors dels grups Sa i Sa+Rimonabant.

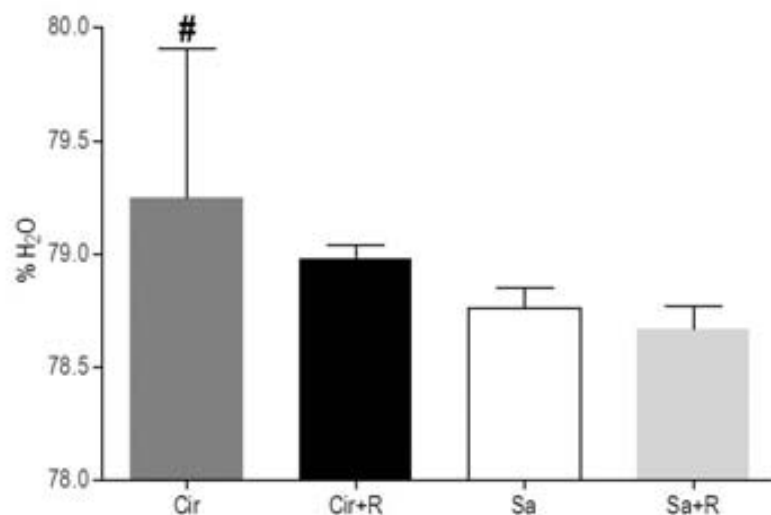


Figura 31: Efecte de rimonabant sobre l'edema cerebral de baix grau, expressat en el percentatge de contingut d'aigua cerebral. # $P < 0,05$ vs. Sa i Sa+Rimonabant

Estudi *in vitro*

1. Efecte de rimonabant sobre l'expressió de CB1

Es va avaluar l'expressió de CB1 tant a mostres de teixit hepàtic com a mostres de cultius primaris d'hepatòcits.

L'administració de rimonabant no va afectar l'expressió del receptor de cannabinoides CB1 al teixit de fetges cirròtics (Figura 32). No es van observar diferències entre l'expressió de CB1 als fetges dels grup Cirrosi i als del grup Cirrosi+Rimonabant.

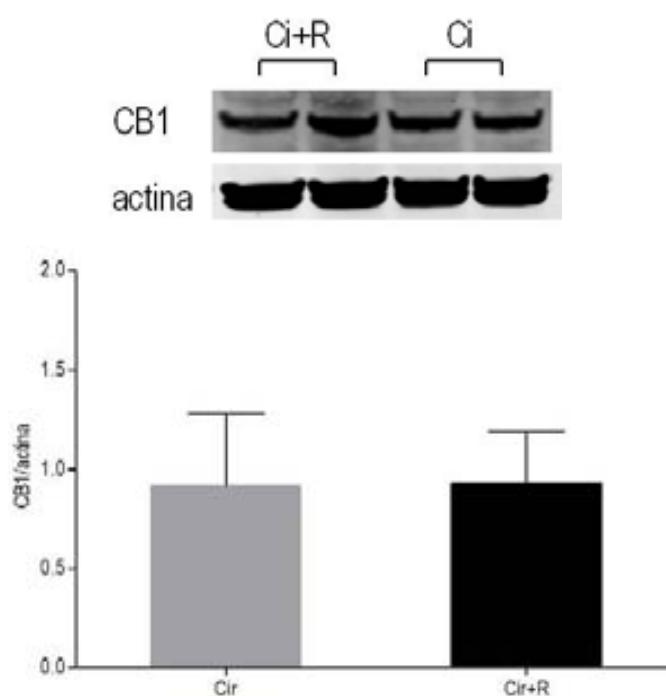


Figura 32: Expressió del receptor de cannabinoides CB1 a teixit hepàtic. Imatge representativa de *Western Blot* i representació gràfica de l'expressió de CB1 en relació a l'expressió d'actina.

Igualment, l'administració de rimonabant a cultius primaris d'hepatòcits provinents tant de fetges cirròtics com de fetges sans no va afectar l'expressió del receptor de cannabinoides CB1. No es van trobar diferències entre cap dels grups analitzats, independentment del temps, de l'administració de rimonabant o vehicle i de l'origen dels cultius primaris (Figura 33).

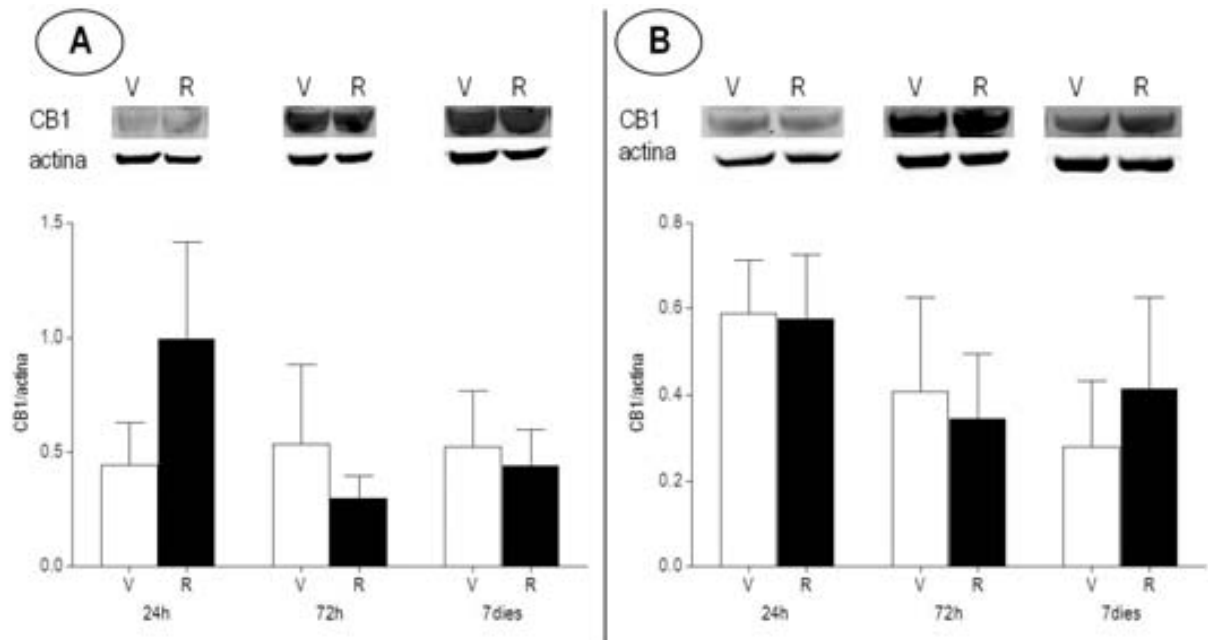


Figura 33: Expressió de receptor de cannabinoides CB1 a cultius primaris d'hepatòcits. Imatges representatives de *Western Blot* i representacions gràfiques de l'expressió de CB1 en relació a l'expressió d'actina. Es mostren els resultats a les 24h, 72h i 7 dies de cultiu segons l'administració de vehicle (V en blanc) o rimonabant (R en negre). A: Expressió de CB1 a cultius primaris d'hepatòcits provinents de fetges cirròtics; B: Expressió de CB1 a cultius primaris d'hepatòcits provinents de fetges sans.

2. Efecte de rimonabant sobre l'expressió de TGF- β

Es va valorar l'expressió de TGF- β a mostres de teixit hepàtic, així com els seus nivells a plasma. A més es van valorar els nivells de TGF- β a sobrenedants de cultius primaris d'hepatòcits.

Pel que fa a l'expressió de TGF- β a mostres de teixit hepàtic, l'administració de rimonabant va normalitzar-ne els nivells d'expressió (Figura 34). Els valors d'expressió de TGF- β del grup Cirrosi+Rimonabant no van ser estadísticament diferents dels valors dels grups Sa i Sa+Rimonabant. En canvi els valors del grup Cirrosi sí que va ser significativament superiors als valors dels grups Sa i Sa+Rimonabant.

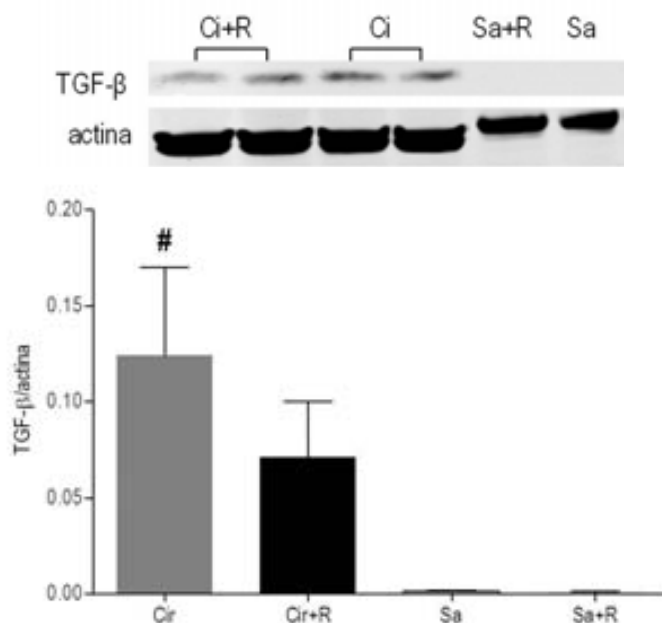


Figura 34: Efecte de rimonabant sobre els nivells d'expressió de TGF- β a teixit hepàtic. Imatge representativa de *Western Blot* i representació gràfica de l'expressió de TGF- β en relació a l'expressió d'actina. # $P < 0,05$ vs. Sa i Sa+Rimonabant.

De la mateixa manera, en analitzar els nivells plasmàtics de TGF- β es va poder observar que l'administració de rimonabant els normalitzava (Figura 35). Així els valors de TGF- β a plasma del grup Cirrosi+Rimonabant ($0.0712 \pm 0.0956 \mu\text{g/mL}$) no van ser estadísticament diferents dels valors dels grups Sa i Sa+Rimonabant (0.0007 ± 0.0017 i $0.0013 \pm 0.0016 \mu\text{g/mL}$, respectivament), mentre que els valors del grup Cirrosi ($0.1309 \pm 0.1537 \mu\text{g/mL}$) sí que va ser significativament superior dels valors dels grups Sa i Sa+Rimonabant.

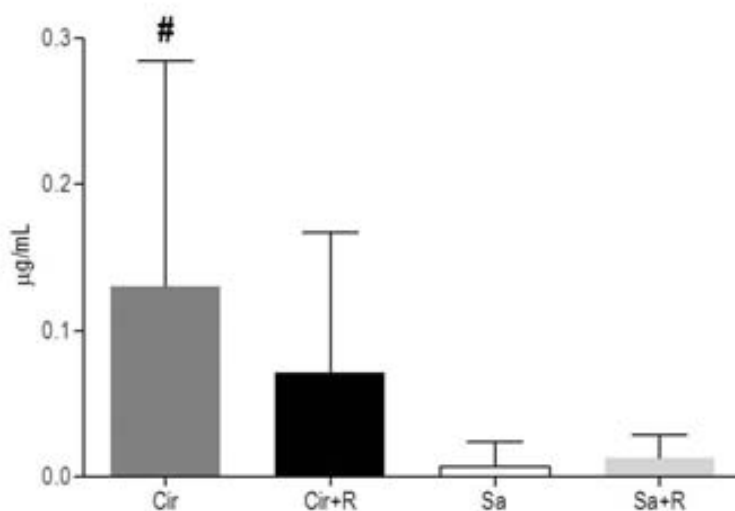


Figura 35: Efecte de rimonabant sobre els nivells plasmàtics de TGF- β . # $P < 0,05$ vs. Sa i Sa+Rimonabant.

En canvi en analitzar els nivells de TGF- β a sobredants de cultius primaris d'hepatòcits no es van observar diferències entre els valors detectats a cap dels grups avaluats (Figura 36), independentment del temps, de l'administració de rimonabant o vehicle i de l'origen dels cultius primaris.

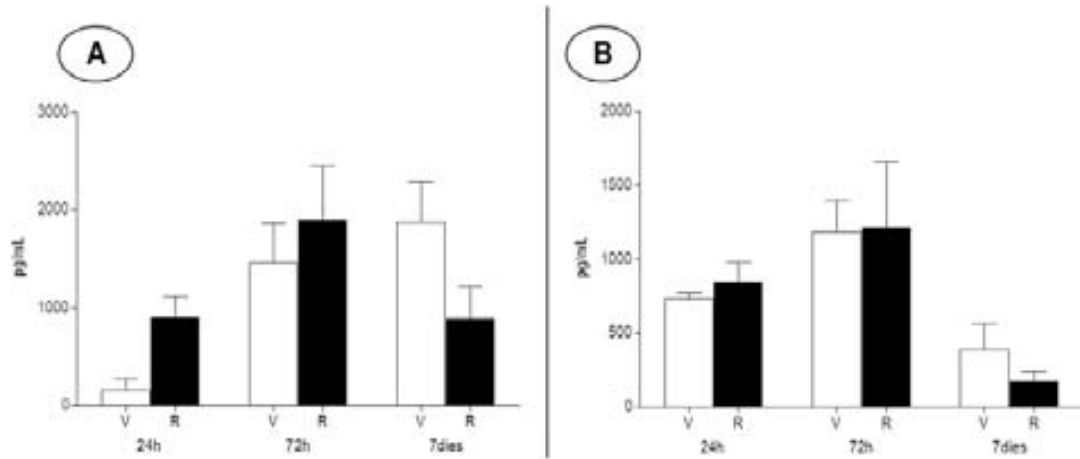


Figura 36: Nivells de TGF- β a sobredants de cultius primaris d'hepatòcits. Es mostren els resultats a les 24h, 72h i 7 dies de cultiu segons l'administració de vehicle (V en blanc) o rimonabant (R en negre). A: Nivells de TGF- β a sobredants de cultius d'hepatòcits provinents de fetges cirròtics; B: Nivells de TGF- β a sobredants de cultius d'hepatòcits de fetges sans.

3. Efecte de rimonabant sobre l'expressió de TNF-alpha

Es va valorar l'expressió de TNF- α tant a mostres de teixit hepàtic com a sobredants de cultius primaris d'hepatòcits.

Pel que fa als nivells de TNF- α a mostres de teixit hepàtic el tractament amb rimonabant va normalitzar-los. Efectivament el tractament amb rimonabant s'acompanyà d'un augment significatiu dels nivells de TNF- α a teixit (24.63 ± 2.92 ng/g) en comparació amb el grup Cirrosi (20.78 ± 3.89 ng/g) fins a assolir nivells similars als grups Sa i Sa+Rimonabant (25.63 ± 4.44 i 27.74 ± 1.68 ng/g respectivament)(Figura 37).

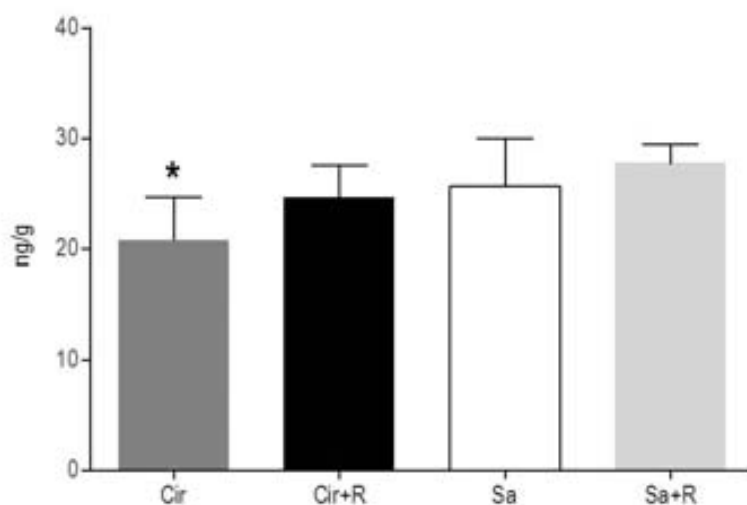


Figura 37: Efecte de rimonabant sobre els nivells de TNF- α a teixit hepàtic. * $P < 0,05$ vs. tots els grups.

En canvi en analitzar els nivells de TNF- α a sobredants de cultius primaris d'hepatòcits no es van observar diferències entre els valors detectats a cap dels grups avaluats (Figura 38). En aquest cas només es van avaluar els nivells de TNF- α als sobredants de cultius de 24h ja que és una citocina d'expressió ràpida.

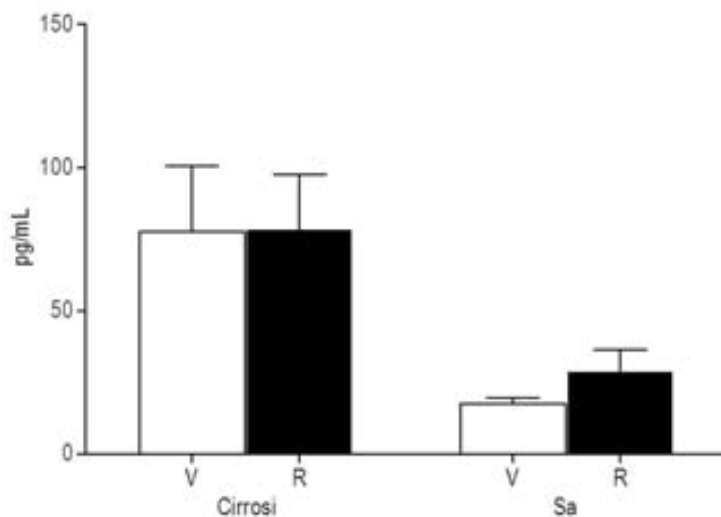


Figura 38: Nivells de TNF- α a sobredants de cultius primaris d'hepatòcits de 24h. Es mostren els resultats de cultius primaris d'hepatòcits provinents de fetges cirròtics i de fetges sans, segons l'administració de vehicle (V en blanc) o rimonabant (R en negre).

Discussió

En el present treball s'ha estudiat l'efecte de l'administració a llarg termini de rimonabant, un antagonista del receptor de cannabinoides CB1, sobre la progressió de la fibrosi hepàtica, així com dels seus efectes en diverses complicacions associades a la malaltia. L'estudi s'ha centrat en l'efecte d'aquest antagonista sobre: 1) les alteracions hemodinàmiques (hipotensió perifèrica, hipertensió portal i grau de derivacions portosistèmiques) i funció hepàtica; 2) la translocació bacteriana com a primer pas en el desenvolupament d'infeccions espontànies i 3) els factors desencadenants l'encefalopatia hepàtica com són la hiperamonièmia i l'edema cerebral de baix grau.

Tot i que s'han demostrat diversos efectes beneficiosos dels antagonistes de CB1, els estudis fins a la data estaven centrats majoritàriament o bé en els seus efectes sobre la fibrosi hepàtica en diversos models experimentals i en estudis *in vitro*, o bé en els efectes aguts del tractament o de l'administració preventiva del fàrmac sobre altres aspectes de la malaltia hepàtica i les seves complicacions.

Cal destacar, en primer lloc, que la dosi de 3 mg/Kg/dia administrada equival, a nivell farmacodinàmic a la dosi que es va aprovar inicialment per al tractament de l'obesitat en humans quan es va comercialitzar rimonabant per Sanofi-Aventis (Acomplia®). Aquesta dosi també és àmpliament utilitzada en diversos estudis experimentals. El tractament durant 10 dies, amb aquesta dosi, no va provocar cap alteració dels paràmetres de funció i necroinflamació hepàtica ni va tenir cap efecte tòxic sobre els animals controls. En tots els casos i paràmetres estudiats no s'evidencià diferència entre el grup de rates control tractades amb rimonabant i les rates control tractades amb vehicle, llevat de l'evolució ponderal en els 10 dies de tractament. En aquest sentit, mentre que els animals control tractats amb vehicle mostraven una corba d'increment de pes dins de la normalitat amb un augment de gairebé el 4%, els animals control tractats amb rimonabant pràcticament no van augmentar el seu pes durant el tractament (+0,58%). Aquest resultat juntament amb el dels animals cirròtics es discuteixen més endavant.

Tot i quedar clar que els animals presentaven una cirrosi micronodular amb nòduls de regeneració independentment de si havien rebut o no tractament (la puntuació a la classificació de Scheuer era en tots els casos de 3 o de 4) el bloqueig del receptor de cannabinoides CB1 mitjançant l'antagonista rimonabant va produir una clara i estadísticament significativa reducció dels dipòsits de col·lagen. Aquesta reducció va ser superior al 50% passant d'una àrea total de col·lagen de 24.14 ± 9.23 en el grup de rates cirròtiques sense tractar a 11.29 ± 4.63 en les rates tractades amb rimonabant. A les microfotografies de la histologia s'observa que la reducció en

l'àrea de fibrosi és patent, els septes fibrosos dels animals tractats són mes fins. Sembla doncs que el tractament sobre aquests fetges cirròtics que presentaven uns septes de col·lagen engruixits, ha estat capaç, no solament de disminuir la síntesi de col·lagen, sinó que a més hi ha hagut una activació de mecanismes de reabsorció de part d'aquesta matriu extracel·lular de col·lagen. Aquests resultats son similars als obtinguts en altres models experimentals de fibrosi/cirrosi en ratolins (Teixeira-Clerc et al. 2006). La disminució de la fibrosi estaria en relació amb la disminució dels nivells de TFG- β que es van observar tant a nivell plasmàtic com de teixit, així com amb la conservació dels nivells de TNF- α a teixit. Tot i que en principi, la disminució en els nivells de TNF- α dels animals cirròtics no tractats semblaria contradictòria, es deuria a la pèrdua de massa hepàtica durant la progressió cap a la cirrosi (Kiki et al. 2006). Així doncs, semblaria que uns nivells més elevats de TNF- α es relacionarien amb una fase més inflamatòria que no fibròtica en els animals tractats amb rimonabant.

Una de les conseqüències immediates de la distorsió de l'arquitectura hepàtica és l'augment de la pressió intrahepàtica causada per l'increment en la resistència vascular hepàtica que acaba desenvolupant hipertensió portal. De la mateixa manera, s'observen importants alteracions en la hemodinàmica sistèmica i la reactivitat vascular, desenvolupant una hipotensió arterial i una circulació hiperdinàmica. Aquestes alteracions hemodinàmiques es van observar en els animals cirròtics no tractats, però no en els animals tractats amb rimonabant, en els que la pressió arterial mitja fou similar a la dels animals controls i significativament menor respecte al animals cirròtics no tractats. Rimonabant no va tenir cap efecte sobre la pressió arterial mitja dels animal control. Sembla, doncs, que aquest efecte seria conseqüència, en gran part, almenys, a la millora en la fibrosi hepàtica. De tota manera aquesta millora observada en la circulació sistèmica també es podria atribuir a l'efecte directe que tindria rimonabant sobre el receptor CB1 de les cèl·lules endotelials, tot i que aquesta possibilitat no ha estat avaluada en el nostre estudi.

De manera semblant, el grau de derivació portosistèmica també va disminuir significativament amb el tractament amb rimonabant passant del $38.72 \pm 10.1\%$ en els animals cirròtics a $13.59 \pm 4.25\%$. En aquest sentit, aquest és el primer estudi en que es valora aquest aspecte. Aquesta disminució en la formació de col·laterals seria deguda també, a la millora en la fibrosi hepàtica que comportaria, a la vegada, una menor distorsió de l'arquitectura vascular hepàtica que, al seu torn, es traduiria en una disminució de la pressió intrahepàtica.

De tota manera, no es va poder evidenciar una disminució significativa de la pressió portal en aquests animals a diferència d'altres estudis d'administració aguda (Batkai et al. 2001)

amb models de pre-tractament i/o mitjançant l'administració d'altres antagonistes de CB1 (Yang et al. 2007) en els que aconseguix una disminució significativa de la pressió portal. Aquesta divergència amb els nostres resultats la podem atribuir a diversos motius, ja que la descompensació ascítica prèvia al tractament, així com la dosi i el temps d'administració del fàrmac podrien jugar-hi un paper important. En aquest sentit, l'únic estudi en rates cirròtiques en que es valora l'efecte de l'administració a llarg termini (14 dies) de rimonabant, en rates pre-ascítiques, només aconseguix disminuir la resistència vascular perifèrica quan s'administren dosis tres vegades superiors de rimonabant (10 mg/Kg/dia) (Domenicali et al. 2009). Cal dir, a més, que altres estudis en rates cirròtiques on l'estratègia ha estat activar CB2 han obtingut resultats similars als nostres tant pel que fa a millora de fibrosi com de pressió arterial mitja i sense aconseguir, tampoc, reduir la pressió portal (Munoz-Luque et al. 2008).

Una altra conseqüència molt important lligada a aquesta disminució en el grau de fibrosi hepàtica i a la millora hemodinàmica és que els animals tractats van presentar una funció hepàtica més conservada. Sembla, efectivament, que el dany hepàtic va ser menor en els animals tractats ja que tant les transaminases com la bilirubina estaven significativament menys alterades que en els animals no tractats. De fet, el deteriorament en la funció hepàtica, provocat pel mateix procés d'inflamació persistent, acaba activant tota una sèrie de productes pro-inflamatoris que generen més vasoconstricció, major vasodilatació esplàncnica i, per tant, major hipertensió portal amb el que el flux hepàtic disminueix amb el consegüent empitjorament de la funció hepàtica. Altres paràmetres com els nivells de glucosa, albúmina i triglicèrids, tot i augmentar lleugerament, no van aconseguir normalitzar-se.

El segon aspecte que es va valorar en l'estudi és el de l'efecte del tractament amb rimonabant sobre la incidència de translocació bacteriana. Tal com s'ha mencionat, aquest fenomen està en la base de la patogènia d'una de les complicacions més greus de la malaltia, quan aquesta presenta descompensació ascítica, com és el desenvolupament d'infeccions anomenades espontànies (peritonitis bacteriana espontània, bacterièmies), és a dir sense un focus aparent. Efectivament, en l'estudi es va poder observar que la incidència de translocació bacteriana va ser menor en els animals cirròtics tractats amb rimonabant que en els animals no tractats (20%; 2 de 10 vs. 45% 4 de 9). Com que el fenomen de la translocació bacteriana és multifactorial vàrem intentat valorar si rimonabant exercia algun tipus d'efecte sobre aquest factors afavoridors o necessaris per a que es produeixi translocació bacteriana. Un dels factors més importants i que presenta alteracions en la cirrosi és l'alentiment del trànsit intestinal, cosa

que pot comportar un augment dels recomptes de bacteris intestinals i sobrecreixement bacterià. Tenint en compte que en estudis d'administració aguda d'un bol de rimonabant s'observava un augment del peristaltisme intestinal transitori, es podia esperar que hi hagués un efecte de recuperació del transit intestinal sostingut en el temps. Els resultats obtinguts mitjançant l'administració d'un colorant alimentari, però, no han mostrat cap diferència significativa en el temps de trànsit intestinal ni en els animals cirròtics ni en els sans. Aquests resultats, de tota manera, estan en consonància amb estudis recents on s'ha observat que l'increment en la motilitat intestinal en animals tractats amb rimonabant no es manté al llarg del temps. De fet s'observa que al tercer dia de tractament hi ha una tolerància total al fàrmac retornant a nivells de motilitat intestinal previs (Mancinelli et al. 2001, Carai, Colombo & Gessa 2004).

Tenint en compte que no s'havia observat cap canvi en el temps de trànsit intestinal, era poc probable que els recomptes de colònies de bacteris en jejú estigués disminuït en els animals tractats amb rimonabant. Efectivament, els recomptes de colònies no mostraren canvis estadísticament significatius entre grups, tot i que en els animals cirròtics no tractats aquests van tenir una tendència ($p=0.165$) a ser superiors als controls i als animals cirròtics tractats amb l'antagonista. En canvi si que es va observar una major incidència d'animals amb sobrecreixement bacterià. Mes de la meitat dels animals cirròtics presentaven recomptes superiors a la mitja més dues desviacions estàndard dels controls, mentre que això només va passar en un animal cirròtic tractat i en un control tractat. Donat que no hem observat una correlació causa-efecte entre el trànsit intestinal i la disminució en la incidència d'animals amb sobrecreixement bacterià intestinal, sembla que el bloqueig del receptor CB1 podria actuar per algun altre mecanisme. Caldria doncs, analitzar la implicació del sistema endocannabinoide de senyalització sobre altres factors afavoridors del sobrecreixement bacterià, com per exemple l'adherència bacteriana, canvis en l'ecologia bacteriana, secreció de Ig A, etc.

Cal tenir en compte, d'altra banda, que aquest no son els únics factors afavoridors de la translocació bacteriana. S'ha objectivat un efecte molt important de la malnutrició, que juntament amb les alteracions hemodinàmiques i de funció hepàtica, podria comportar una depressió important tant de la immunitat sistèmica com del sistema reticle-endotelial. A més, en diversos estudis s'ha observat sobrecreixement bacterià intestinal així com canvis en l'ecologia bacteriana en animals desnodrits (Deitch, Winterton & Berg 1987) En aquest sentit cal destacar que no solament la funció hepàtica es va conservar millor en els animals tractats, sinó que a més, s'observà una clara millora en el seu estat nutricional, fins al punt que mentre que els animals

cirròtics no tractats seguien una corba descendent de pes, els animals tractats recuperaven pes. L'augment de pes solament pot ser atribuït a una millora clínica de l'animal, ja que rimobant indueix hipofàgia i pèrdua de pes tant en estudis experimentals (Thornton-Jones et al. 2006) com en humans, motiu original pel qual el fàrmac va ser comercialitzat.

Per últim, el tercer aspecte que es va valorar en l'estudi van ser els efectes sobre diversos paràmetres relacionats amb el desenvolupament d'encefalopatia hepàtica com ara les concentracions d'amoni plasmàtic i cerebral i la presència d'edema cerebral de baix grau. Es va observar una disminució significativa de l'amoni plasmàtic que es va acompanyar d'una normalització tant de l'amoni cerebral com del contingut d'aigua cerebral en els animals tractats. Tenint en compte que les principals causes de l'augment de l'amoni plasmàtic són, per una banda, la incapacitat del fetge per eliminar l'amoni provinent dels bacteris intestinals, i per altra una activació del catabolisme muscular lligat a la malnutrició (Butterworth 2000), sembla que la millora d'aquests factors que observada en els animals tractats explicaria la disminució en aquests paràmetres. Efectivament, els animals tractats presentaven menys derivacions portosistèmiques, fet pel qual la sang provinent del llit esplàncnic podia accedir al fetge i aquest, a la vegada, tenia una funcionalitat més preservada, podent eliminar de manera més efectiva l'amoni en el cicle de la urea. A la vegada, tot i que el contingut total bacterià no va ser diferent, sí que s'observà una menor incidència de sobrecreixement bacterià en els animals tractats. D'aquesta manera, la quantitat d'amoni que accedeix a la circulació sistèmica també va ser menor en aquests animals. L'altre factor implicat, la producció d'amoni per catabolisme muscular lligada a malnutrició, també seria menor en els animals tractats ja que l'estat nutricional d'aquests estava clarament més conservat.

Finalment, a l'hora d'identificar el possible paper del sistema endocannabinoide de senyalització en els hepatòcits i la seva implicació en la progressió de la malaltia, no vam poder observar cap modificació en la síntesi de TGF- β o TNF- α en l'estudi *in vitro* en hepatòcits de fetges cirròtics tractats amb rimobant. Sembla, doncs, que serien majoritàriament d'altres tipus cel·lulars com les cèl·lules de Kupffer, així com les cèl·lules estelades transformades en miofibroblasts (Teixeira-Clerc et al. 2006, Julien et al. 2005) les principals productores d'aquestes citocines. No s'observà cap modificació en l'expressió de CB1 en comparar hepatòcits provinents de fetges cirròtics i de fetges sans. A més, l'expressió del receptor tampoc es va veure modificada per la presència de l'antagonista. Per tant, sembla que l'augment en l'expressió del receptor que s'observa en la cirrosi experimental també estaria limitada als tipus cel·lulars abans

mencionats. De fet, només s'ha observat una sobreexpressió de CB1 en hepatòcits a la cirrosi biliar primària i en hepatocarcinoma (Floreani et al. 2009, Xu et al. 2006). En aquest sentit, sembla que el paper dels hepatòcits en la progressió de la malaltia podria ser variable dependent de la etiologia. A la cirrosi experimental per tetraclorur de carboni el paper dels hepatòcits seria doncs limitat.

Globalment, i com a resum final de la tesi podem dir que el sistema endocannabinoides de senyalització té un paper rellevant en la progressió de la cirrosi. Efectivament, el bloqueig de CB1 té un efecte antifibrogènic prou important com per disminuir el dipòsit de col·lagen de la matriu extracel·lular dels fetges en fase ja cirròtica avançada. D'aquesta manera l'estat hemodinàmic de l'animal millora, la funcionalitat del fetge està més preservada. L'estat general de l'animal és millor i complicacions com la incidència d'infeccions espontànies que tenen l'origen en el fenomen de la translocació bacteriana i l'encefalopatia hepàtica disminueixen significativament. Sembla, també, que els hepatòcits no tindrien un paper rellevant en la progressió de la malaltia.

El bloqueig de CB1, doncs, pot ser una bona estratègia de futur per al tractament de la cirrosi hepàtica i les seves complicacions.

Conclusions

El tractament a llarg termini amb l'antagonista del receptor de cannabinoides 1 (CB1), rimonabant en rates cirròtiques amb ascites:

1. Redueix de manera significativa el col·lagen dipositat en els fetges de rates cirròtiques amb ascites, probablement aquesta reducció es pot atribuir a una disminució en els nivells de TGF- β plasmàtic i a teixit.

2. Millora l'hemodinàmica esplàncnica i el grau de derivació portosistèmica, en canvi no s'observa un efecte significatiu sobre la pressió portal.

3. S'associa amb una millora d'alguns paràmetres de necroinflamació i funció hepàtica.

4. Disminueix l'expressió de citocines profibròtiques com TGF- β i normalitza l'expressió de citocines proinflamatòries com TNF- α .

5. Disminueix la incidència de translocació bacteriana sense modificar el trànsit intestinal i el contingut bacterià ileal, però, en canvi, disminueix el sobrecreixement bacterià.

6. Redueix significativament l'amoní plasmàtic, normalitza l'amoní cerebral i la presència d'edema cerebral de baix grau, paràmetres tots ells associats al desenvolupament d'encefalopatia hepàtica.

A l'estudi in vitro en cultius primaris d'hepatòcits de rata cirròtica amb ascites:

1. S'objectiva la presència del receptor de cannabinoides 1 (CB1) en aquestes cèl·lules tot i que l'administració de rimonabant no en modifica l'expressió.

2. No s'observa cap modificació en l'expressió de citocines proinflamatòries (TNF- α) i profibròtiques (TGF- β).

Bibliografia

- Abraldes, J.G., Garcia-Pagan, J.C. & Bosch, J. 2004, "Functional component of portal hypertension", *Gastroenterologia y hepatologia*, vol. 27, no. 6, pp. 377-387.
- Albillos, A., de la Hera, A., Gonzalez, M., Moya, J.L., Calleja, J.L., Monserrat, J., Ruiz-del-Arbol, L. & Alvarez-Mon, M. 2003, "Increased lipopolysaccharide binding protein in cirrhotic patients with marked immune and hemodynamic derangement", *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 37, no. 1, pp. 208-217.
- Alexander, J.W., Boyce, S.T., Babcock, G.F., Gianotti, L., Peck, M.D., Dunn, D.L., Pyles, T., Childress, C.P. & Ash, S.K. 1990, "The process of microbial translocation", *Annals of Surgery*, vol. 212, no. 4, pp. 496-510; discussion 511-2.
- Almeida, J., Galhenage, S., Yu, J., Kurtovic, J. & Riordan, S.M. 2006, "Gut flora and bacterial translocation in chronic liver disease", *World journal of gastroenterology : WJG*, vol. 12, no. 10, pp. 1493-1502.
- Ambrose, N.S., Johnson, M., Burdon, D.W. & Keighley, M.R. 1984, "Incidence of pathogenic bacteria from mesenteric lymph nodes and ileal serosa during Crohn's disease surgery", *The British journal of surgery*, vol. 71, no. 8, pp. 623-625.
- Avraham, Y., Israeli, E., Gabbay, E., Okun, A., Zolotarev, O., Silberman, I., Ganzburg, V., Dagon, Y., Magen, I., Vorobia, L., Pappo, O., Mechoulam, R., Ilan, Y. & Berry, E.M. 2006, "Endocannabinoids affect neurological and cognitive function in thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in mice", *Neurobiology of disease*, vol. 21, no. 1, pp. 237-245.
- Baker, D., Pryce, G., Davies, W.L. & Hiley, C.R. 2006, "In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor", *Trends in pharmacological sciences*, vol. 27, no. 1, pp. 1-4.
- Balzan, S., de Almeida Quadros, C., de Cleve, R., Zilberstein, B. & Cecconello, I. 2007, "Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact", *Journal of gastroenterology and hepatology*, vol. 22, no. 4, pp. 464-471.
- Barann, M., Molderings, G., Bruss, M., Bonisch, H., Urban, B.W. & Gothert, M. 2002, "Direct inhibition by cannabinoids of human 5-HT3A receptors: probable involvement of an allosteric modulatory site", *British journal of pharmacology*, vol. 137, no. 5, pp. 589-596.
- Bartoli, R., Mane, J., Cabre, E., Lorenzo-Zuniga, V., Planas, R., Vinado, B., Ausina, V. & Gassull, M.A. 2007, "Effect of the administration of fermentable and non-fermentable dietary fibre on intestinal bacterial translocation in ascitic cirrhotic rats", *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, vol. 26, no. 3, pp. 383-387.

- Battaller, R. & Brenner, D.A. 2005, "Liver fibrosis", *The Journal of clinical investigation*, vol. 115, no. 2, pp. 209-218.
- Batkai, S., Jarai, Z., Wagner, J.A., Goparaju, S.K., Varga, K., Liu, J., Wang, L., Mirshahi, F., Khanolkar, A.D., Makriyannis, A., Urbaschek, R., Garcia, N., Jr, Sanyal, A.J. & Kunos, G. 2001, "Endocannabinoids acting at vascular CB1 receptors mediate the vasodilated state in advanced liver cirrhosis", *Nature medicine*, vol. 7, no. 7, pp. 827-832.
- Begg, M., Pacher, P., Batkai, S., Osei-Hyiaman, D., Offertaler, L., Mo, F.M., Liu, J. & Kunos, G. 2005, "Evidence for novel cannabinoid receptors", *Pharmacology & therapeutics*, vol. 106, no. 2, pp. 133-145.
- Bellocchio, L., Cervino, C., Pasquali, R. & Pagotto, U. 2008, "The endocannabinoid system and energy metabolism", *Journal of neuroendocrinology*, vol. 20, no. 6, pp. 850-857.
- Berdyshev, E.V. 2000, "Cannabinoid receptors and the regulation of immune response", *Chemistry and physics of lipids*, vol. 108, no. 1-2, pp. 169-190.
- Berg, R.D. & Garlington, A.W. 1979, "Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model", *Infection and immunity*, vol. 23, no. 2, pp. 403-411.
- Bermudez-Silva, F.J., Suarez, J., Baixeras, E., Cobo, N., Bautista, D., Cuesta-Munoz, A.L., Fuentes, E., Juan-Pico, P., Castro, M.J., Milman, G., Mechoulam, R., Nadal, A. & Rodriguez de Fonseca, F. 2008, "Presence of functional cannabinoid receptors in human endocrine pancreas", *Diabetologia*, vol. 51, no. 3, pp. 476-487.
- Bhathal, P.S. & Grossman, H.J. 1985, "Reduction of the increased portal vascular resistance of the isolated perfused cirrhotic rat liver by vasodilators", *Journal of hepatology*, vol. 1, no. 4, pp. 325-337.
- Bisogno, T., Ligresti, A. & Di Marzo, V. 2005, "The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects", *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, vol. 81, no. 2, pp. 224-238.
- Blei, A.T. 2001, "Encefalopatía hepática." in *Tratado de hepatología clínica Encefalopatía hepática*, 2a edn, Masson, Barcelona, etc., pp. 855.
- Bosch, J. & Garcia-Pagan, J.C. 2000, "Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension", *Journal of hepatology*, vol. 32, no. 1 Suppl, pp. 141-156.
- Bosetti, C., Levi, F., Lucchini, F., Zatonski, W.A., Negri, E. & La Vecchia, C. 2007, "Worldwide mortality from cirrhosis: an update to 2002", *Journal of hepatology*, vol. 46, no. 5, pp. 827-839.

- Brown, A.J. 2007, "Novel cannabinoid receptors", *British journal of pharmacology*, vol. 152, no. 5, pp. 567-575.
- Butterworth, R.F. 2000, "Complications of cirrhosis III. Hepatic encephalopathy", *Journal of hepatology*, vol. 32, no. 1 Suppl, pp. 171-180.
- Butterworth, R.F., Spahr, L., Fontaine, S. & Layrargues, G.P. 1995, "Manganese toxicity, dopaminergic dysfunction and hepatic encephalopathy", *Metabolic brain disease*, vol. 10, no. 4, pp. 259-267.
- Carai, M.A., Colombo, G. & Gessa, G.L. 2004, "Rapid tolerance to the intestinal prokinetic effect of cannabinoid CB1 receptor antagonist, SR 141716 (Rimonabant)", *European journal of pharmacology*, vol. 494, no. 2-3, pp. 221-224.
- Chatamra, K. & Proctor, E. 1981, "Phenobarbitone-induced enlargement of the liver in the rat: its relationship to carbon tetrachloride-induced cirrhosis", *British journal of experimental pathology*, vol. 62, no. 3, pp. 283-288.
- Cravatt, B.F., Giang, D.K., Mayfield, S.P., Boger, D.L., Lerner, R.A. & Gilula, N.B. 1996, "Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides", *Nature*, vol. 384, no. 6604, pp. 83-87.
- Cunningham, C.C. & Van Horn, C.G. 2003, "Energy availability and alcohol-related liver pathology", *Alcohol Research & Health : The Journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, vol. 27, no. 4, pp. 291-299.
- Dagon, Y., Avraham, Y., Ilan, Y., Mechoulam, R. & Berry, E.M. 2007, "Cannabinoids ameliorate cerebral dysfunction following liver failure via AMP-activated protein kinase", *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 21, no. 10, pp. 2431-2441.
- Dannert, M.T., Alasua, A., Herradon, E., Martin, M.I. & Lopez-Miranda, V. 2007, "Vasorelaxant effect of Win 55,212-2 in rat aorta: new mechanisms involved", *Vascular pharmacology*, vol. 46, no. 1, pp. 16-23.
- Dbouk, N. & McGuire, B.M. 2006, "Hepatic encephalopathy: a review of its pathophysiology and treatment", *Current treatment options in gastroenterology*, vol. 9, no. 6, pp. 464-474.
- Deitch, E.A., Ma, W.J., Ma, L., Berg, R.D. & Specian, R.D. 1990a, "Protein malnutrition predisposes to inflammatory-induced gut-origin septic states", *Annals of Surgery*, vol. 211, no. 5, pp. 560-7; discussion 567-8.

- Deitch, E.A., Morrison, J., Berg, R. & Specian, R.D. 1990b, "Effect of hemorrhagic shock on bacterial translocation, intestinal morphology, and intestinal permeability in conventional and antibiotic-decontaminated rats", *Critical Care Medicine*, vol. 18, no. 5, pp. 529-536.
- Deitch, E.A., Winterton, J. & Berg, R. 1987, "Effect of starvation, malnutrition, and trauma on the gastrointestinal tract flora and bacterial translocation", *Archives of surgery (Chicago, Ill.: 1960)*, vol. 122, no. 9, pp. 1019-1024.
- Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A. & Mechoulam, R. 1992, "Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 258, no. 5090, pp. 1946-1949.
- Di Marzo, V., Bisogno, T., De Petrocellis, L., Melck, D. & Martin, B.R. 1999, "Cannabimimetic fatty acid derivatives: the anandamide family and other endocannabinoids", *Current medicinal chemistry*, vol. 6, no. 8, pp. 721-744.
- Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J.C. & Piomelli, D. 1994, "Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons", *Nature*, vol. 372, no. 6507, pp. 686-691.
- Di Marzo, V., Goparaju, S.K., Wang, L., Liu, J., Batkai, S., Jarai, Z., Fezza, F., Miura, G.I., Palmiter, R.D., Sugiura, T. & Kunos, G. 2001, "Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake", *Nature*, vol. 410, no. 6830, pp. 822-825.
- Dinh, T.P., Carpenter, D., Leslie, F.M., Freund, T.F., Katona, I., Sensi, S.L., Kathuria, S. & Piomelli, D. 2002, "Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 16, pp. 10819-10824.
- Domenicali, M., Caraceni, P., Giannone, F., Pertosa, A.M., Principe, A., Zambruni, A., Trevisani, F., Croci, T. & Bernardi, M. 2009, "Cannabinoid type 1 receptor antagonism delays ascites formation in rats with cirrhosis", *Gastroenterology*, vol. 137, no. 1, pp. 341-349.
- Fezza, F., Bisogno, T., Minassi, A., Appendino, G., Mechoulam, R. & Di Marzo, V. 2002, "Noladin ether, a putative novel endocannabinoid: inactivation mechanisms and a sensitive method for its quantification in rat tissues", *FEBS letters*, vol. 513, no. 2-3, pp. 294-298.
- Floreani, A., Lazzari, R., Macchi, V., Porzionato, A., Variola, A., Colavito, D., Leon, A., Guido, M., Baldo, V., De Caro, R. & Bergasa, N.V. 2009, "Hepatic expression of endocannabinoid

- receptors and their novel polymorphisms in primary biliary cirrhosis", *Journal of gastroenterology*, .
- Fluorescent Microspheres Research Center (ed) 1999, *Manual for Using Fluorescent Microspheres to Measure Regional Organ Perfusion*, University of Washington, Seattle, WA, USA.
- Friedman, S.L. 2000, "Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury", *The Journal of biological chemistry*, vol. 275, no. 4, pp. 2247-2250.
- Friedman, S.L. 1997, "Scarring in alcoholic liver disease: new insights and emerging therapies", *Alcohol Health and Research World*, vol. 21, no. 4, pp. 310-316.
- Giuffrida, A. & Piomelli, D. 2000, "The endocannabinoid system: a physiological perspective on its role in psychomotor control", *Chemistry and physics of lipids*, vol. 108, no. 1-2, pp. 151-158.
- Gonzalez Alonso, R., Gonzalez Garcia, M. & Albillos Martinez, A. 2007, "Physiopathology of bacterial translocation and spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis", *Gastroenterologia y hepatologia*, vol. 30, no. 2, pp. 78-84.
- Guarner, C., Runyon, B.A., Young, S., Heck, M. & Sheikh, M.Y. 1997, "Intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites", *Journal of hepatology*, vol. 26, no. 6, pp. 1372-1378.
- Gupta, T.K., Toruner, M., Chung, M.K. & Groszmann, R.J. 1998, "Endothelial dysfunction and decreased production of nitric oxide in the intrahepatic microcirculation of cirrhotic rats", *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 28, no. 4, pp. 926-931.
- Guzman, M. 2003, "Cannabinoids: potential anticancer agents", *Nature reviews.Cancer*, vol. 3, no. 10, pp. 745-755.
- Hampson, A.J., Grimaldi, M., Axelrod, J. & Wink, D. 1998, "Cannabidiol and (-)Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 14, pp. 8268-8273.
- Hanus, L., Abu-Lafi, S., Fride, E., Breuer, A., Vogel, Z., Shalev, D.E., Kustanovich, I. & Mechoulam, R. 2001, "2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 7, pp. 3662-3665.

- Haussinger, D., Kircheis, G., Fischer, R., Schliess, F. & vom Dahl, S. 2000, "Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema?", *Journal of hepatology*, vol. 32, no. 6, pp. 1035-1038.
- Herkenham, M., Lynn, A.B., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R. & Rice, K.C. 1991, "Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 11, no. 2, pp. 563-583.
- Hezode, C., Roudot-Thoraval, F., Nguyen, S., Grenard, P., Julien, B., Zafrani, E.S., Pawlotsky, J.M., Dhumeaux, D., Lotersztajn, S. & Mallat, A. 2005, "Daily cannabis smoking as a risk factor for progression of fibrosis in chronic hepatitis C", *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 42, no. 1, pp. 63-71.
- Howlett, A.C. 2002, "The cannabinoid receptors", *Prostaglandins & other lipid mediators*, vol. 68-69, pp. 619-631.
- Huang, S.M., Bisogno, T., Trevisani, M., Al-Hayani, A., De Petrocellis, L., Fezza, F., Tognetto, M., Petros, T.J., Krey, J.F., Chu, C.J., Miller, J.D., Davies, S.N., Geppetti, P., Walker, J.M. & Di Marzo, V. 2002, "An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 12, pp. 8400-8405.
- Iredale, J.P. 2007, "Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ", *The Journal of clinical investigation*, vol. 117, no. 3, pp. 539-548.
- Izzo, A.A., Capasso, F., Costagliola, A., Bisogno, T., Marsicano, G., Ligresti, A., Matias, I., Capasso, R., Pinto, L., Borrelli, F., Cecio, A., Lutz, B., Mascolo, N. & Di Marzo, V. 2003, "An endogenous cannabinoid tone attenuates cholera toxin-induced fluid accumulation in mice", *Gastroenterology*, vol. 125, no. 3, pp. 765-774.
- Izzo, A.A., Fezza, F., Capasso, R., Bisogno, T., Pinto, L., Iuvone, T., Esposito, G., Mascolo, N., Di Marzo, V. & Capasso, F. 2001, "Cannabinoid CB1-receptor mediated regulation of gastrointestinal motility in mice in a model of intestinal inflammation", *British journal of pharmacology*, vol. 134, no. 3, pp. 563-570.
- Jeong, W.I., Osei-Hyiaman, D., Park, O., Liu, J., Batkai, S., Mukhopadhyay, P., Horiguchi, N., Harvey-White, J., Marsicano, G., Lutz, B., Gao, B. & Kunos, G. 2008, "Paracrine activation of hepatic CB1 receptors by stellate cell-derived endocannabinoids mediates alcoholic fatty liver", *Cell metabolism*, vol. 7, no. 3, pp. 227-235.

- Jimenez, W., Martinez-Pardo, A., Arroyo, V., Bruix, J., Rimola, A., Gaya, J., Rivera, F. & Rodes, J. 1985, "Temporal relationship between hyperaldosteronism, sodium retention and ascites formation in rats with experimental cirrhosis", *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 5, no. 2, pp. 245-250.
- Johnston, D.E. & Jasuja, R. 1994, "Purification of cultured primary rat hepatocytes using selection with ricin A subunit", *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 20, no. 2, pp. 436-444.
- Julien, B., Grenard, P., Teixeira-Clerc, F., Van Nhieu, J.T., Li, L., Karsak, M., Zimmer, A., Mallat, A. & Lotersztajn, S. 2005, "Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB2 in the liver", *Gastroenterology*, vol. 128, no. 3, pp. 742-755.
- Katayama, M., Xu, D., Specian, R.D. & Deitch, E.A. 1997, "Role of bacterial adherence and the mucus barrier on bacterial translocation: effects of protein malnutrition and endotoxin in rats", *Annals of Surgery*, vol. 225, no. 3, pp. 317-326.
- Kiki, I., Yilmaz, O., Erdem, F., Gundogdu, M., Demircan, B. & Bilici, M. 2006, "Tumour necrosis factor-alpha levels in hepatitis B virus-related chronic active hepatitis and liver cirrhosis and its relationship to Knodell and Child-Pugh scores", *International journal of clinical practice*, vol. 60, no. 9, pp. 1075-1079.
- Kirkham, T.C. & Williams, C.M. 2001, "Endogenous cannabinoids and appetite", *Nutrition research reviews*, vol. 14, no. 1, pp. 65-86.
- Klein, T.W., Newton, C.A. & Friedman, H. 2001, "Cannabinoids and the immune system", *Pain research & management : the journal of the Canadian Pain Society = journal de la societe canadienne pour le traitement de la douleur*, vol. 6, no. 2, pp. 95-101.
- Kozak, K.R. & Marnett, L.J. 2002, "Oxidative metabolism of endocannabinoids", *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, vol. 66, no. 2-3, pp. 211-220.
- Krahenbuhl, S., Reichen, J., Zimmermann, A., Gehr, P. & Stucki, J. 1990, "Mitochondrial structure and function in CCl4-induced cirrhosis in the rat", *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 12, no. 3 Pt 1, pp. 526-532.
- Kravetz, D., Arderiu, M.T., Bosch, J., Piera, C., Setoain, J. & Rodes, J. 1987, "Increased plasma volume in two models of portal hypertension in the rat: cirrhosis of the liver and partial portal vein ligation", *Revista espanola de fisiologia*, vol. 43, no. 2, pp. 179-183.
- Kunos, G., Osei-Hyiaman, D., Batkai, S. & Gao, B. 2006, "Cannabinoids hurt, heal in cirrhosis", *Nature medicine*, vol. 12, no. 6, pp. 608-610.

- Lavoie, J., Giguere, J.F., Layrargues, G.P. & Butterworth, R.F. 1987, "Amino acid changes in autopsied brain tissue from cirrhotic patients with hepatic encephalopathy", *Journal of neurochemistry*, vol. 49, no. 3, pp. 692-697.
- Lescut, D., Colombel, J.F., Vincent, P., Cortot, A., Fournier, L., Quandalle, P., Vankemmel, M., Triboulet, J.P., Wurtz, A. & Paris, J.C. 1990, "Bacterial translocation in colorectal cancers", *Gastroenterologie clinique et biologique*, vol. 14, no. 11, pp. 811-814.
- Leung, W. & Wong, F. 2011, "Medical management of ascites", *Expert opinion on pharmacotherapy*, vol. 12, no. 8, pp. 1269-1283.
- Lichtman, A.H. 2000, "SR 141716A enhances spatial memory as assessed in a radial-arm maze task in rats", *European journal of pharmacology*, vol. 404, no. 1-2, pp. 175-179.
- Ligresti, A., Bisogno, T., Matias, I., De Petrocellis, L., Cascio, M.G., Cosenza, V., D'argenio, G., Scaglione, G., Bifulco, M., Sorrentini, I. & Di Marzo, V. 2003, "Possible endocannabinoid control of colorectal cancer growth", *Gastroenterology*, vol. 125, no. 3, pp. 677-687.
- Llovet, J.M., Bartoli, R., March, F., Planas, R., Vinado, B., Cabre, E., Arnal, J., Coll, P., Ausina, V. & Gassull, M.A. 1998, "Translocated intestinal bacteria cause spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic rats: molecular epidemiologic evidence", *Journal of hepatology*, vol. 28, no. 2, pp. 307-313.
- Llovet, J.M., Bartoli, R. & Planas, R. 1996, "Intestinal bacterial translocation", *Gastroenterologia y hepatologia*, vol. 19, no. 7, pp. 374-382.
- Llovet, J.M., Bartoli, R., Planas, R., Cabre, E., Jimenez, M., Urban, A., Ojanguren, I., Arnal, J. & Gassull, M.A. 1994, "Bacterial translocation in cirrhotic rats. Its role in the development of spontaneous bacterial peritonitis", *Gut*, vol. 35, no. 11, pp. 1648-1652.
- Llovet, J.M., Bartoli, R., Planas, R., Vinado, B., Perez, J., Cabre, E., Arnal, J., Ojanguren, I., Ausina, V. & Gassull, M.A. 1996, "Selective intestinal decontamination with norfloxacin reduces bacterial translocation in ascitic cirrhotic rats exposed to hemorrhagic shock", *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 23, no. 4, pp. 781-787.
- Lorenzo-Zuniga, V., Bartoli, R., Planas, R., Hofmann, A.F., Vinado, B., Hagey, L.R., Hernandez, J.M., Mane, J., Alvarez, M.A., Ausina, V. & Gassull, M.A. 2003, "Oral bile acids reduce bacterial overgrowth, bacterial translocation, and endotoxemia in cirrhotic rats", *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 37, no. 3, pp. 551-557.

- Maccarrone, M., Valensise, H., Bari, M., Lazzarin, N., Romanini, C. & Finazzi-Agro, A. 2000, "Relation between decreased anandamide hydrolase concentrations in human lymphocytes and miscarriage", *Lancet*, vol. 355, no. 9212, pp. 1326-1329.
- Mailleux, P. & Vanderhaeghen, J.J. 1992, "Localization of cannabinoid receptor in the human developing and adult basal ganglia. Higher levels in the striatonigral neurons", *Neuroscience letters*, vol. 148, no. 1-2, pp. 173-176.
- Mancinelli, R., Fabrizi, A., Del Monaco, S., Azzena, G.B., Vargiu, R., Colombo, G.C. & Gessa, G.L. 2001, "Inhibition of peristaltic activity by cannabinoids in the isolated distal colon of mouse", *Life Sciences*, vol. 69, no. 1, pp. 101-111.
- Marquez-Aguirre, A.L., Canales-Aguirre, A.A., Gomez-Pinedo, U. & Galvez-Gastelum, F.J. 2010, "Molecular aspects of hepatic encephalopathy", *Neurologia (Barcelona, Spain)*, vol. 25, no. 4, pp. 239-247.
- Martin, H., Voss, K., Hufnagl, P., Wack, R. & Wassilew, G. 1987, "Morphometric and densitometric investigations of protoplasmic astrocytes and neurons in human hepatic encephalopathy", *Experimental pathology*, vol. 32, no. 4, pp. 241-250.
- Massa, F., Storr, M. & Lutz, B. 2005, "The endocannabinoid system in the physiology and pathophysiology of the gastrointestinal tract", *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, vol. 83, no. 12, pp. 944-954.
- Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C. & Bonner, T.I. 1990, "Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA", *Nature*, vol. 346, no. 6284, pp. 561-564.
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B.R. & Compton, D.R. 1995, "Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors", *Biochemical pharmacology*, vol. 50, no. 1, pp. 83-90.
- Mechoulam, R., Fride, E., Hanus, L., Sheskin, T., Bisogno, T., Di Marzo, V., Bayewitch, M. & Vogel, Z. 1997, "Anandamide may mediate sleep induction", *Nature*, vol. 389, no. 6646, pp. 25-26.
- Mechoulam, R. & Gaoni, Y. 1965, "A Total Synthesis of Δ^1 -Tetrahydrocannabinol, the Active Constituent of Hashish", *Journal of the American Chemical Society*, vol. 87, pp. 3273-3275.

- Mechoulam, R., Panikashvili, D. & Shohami, E. 2002, "Cannabinoids and brain injury: therapeutic implications", *Trends in molecular medicine*, vol. 8, no. 2, pp. 58-61.
- Miquel, M., Bartoli, R., Odena, G., Serafin, A., Cabre, E., Galan, A., Barba, I., Cordoba, J. & Planas, R. 2010, "Rat CCl(4)-induced cirrhosis plus total portal vein ligation: a new model for the study of hyperammonaemia and brain oedema", *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, vol. 30, no. 7, pp. 979-987.
- Moezi, L., Gaskari, S.A., Liu, H., Baik, S.K., Dehpour, A.R. & Lee, S.S. 2006, "Anandamide mediates hyperdynamic circulation in cirrhotic rats via CB(1) and VR(1) receptors", *British journal of pharmacology*, vol. 149, no. 7, pp. 898-908.
- Morehouse, J.L., Specian, R.D., Stewart, J.J. & Berg, R.D. 1986, "Translocation of indigenous bacteria from the gastrointestinal tract of mice after oral ricinoleic acid treatment", *Gastroenterology*, vol. 91, no. 3, pp. 673-682.
- Munoz-Luque, J., Ros, J., Fernandez-Varo, G., Tugues, S., Morales-Ruiz, M., Alvarez, C.E., Friedman, S.L., Arroyo, V. & Jimenez, W. 2008, "Regression of fibrosis after chronic stimulation of cannabinoid CB2 receptor in cirrhotic rats", *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, vol. 324, no. 2, pp. 475-483.
- Munro, S., Thomas, K.L. & Abu-Shaar, M. 1993, "Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids", *Nature*, vol. 365, no. 6441, pp. 61-65.
- Napolitano, L.M., Koruda, M.J., Zimmerman, K., McCowan, K., Chang, J. & Meyer, A.A. 1995, "Chronic ethanol intake and burn injury: evidence for synergistic alteration in gut and immune integrity", *The Journal of trauma*, vol. 38, no. 2, pp. 198-207.
- Nguyen, G.C., Segev, D.L. & Thuluvath, P.J. 2007, "Nationwide increase in hospitalizations and hepatitis C among inpatients with cirrhosis and sequelae of portal hypertension", *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, vol. 5, no. 9, pp. 1092-1099.
- O'Keefe, S.J., El-Zayadi, A.R., Carraher, T.E., Davis, M. & Williams, R. 1980, "Malnutrition and immuno-incompetence in patients with liver disease", *Lancet*, vol. 2, no. 8195 pt 1, pp. 615-617.
- Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Gong, J.P., Patel, S., Perchuk, A., Meozzi, P.A., Myers, L., Mora, Z., Tagliaferro, P., Gardner, E., Brusco, A., Akinshola, B.E., Liu, Q.R., Hope, B., Iwasaki, S., Arinami, T., Teasenfitz, L. & Uhl, G.R. 2006, "Discovery of the presence and functional

- expression of cannabinoid CB2 receptors in brain", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1074, pp. 514-536.
- Osei-Hyiaman, D., DePetrillo, M., Pacher, P., Liu, J., Radaeva, S., Batkai, S., Harvey-White, J., Mackie, K., Offertaler, L., Wang, L. & Kunos, G. 2005, "Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity", *The Journal of clinical investigation*, vol. 115, no. 5, pp. 1298-1305.
- Pacheco, M., Childers, S.R., Arnold, R., Casiano, F. & Ward, S.J. 1991, "Aminoalkylindoles: actions on specific G-protein-linked receptors", *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, vol. 257, no. 1, pp. 170-183.
- Pagotto, U., Marsicano, G., Cota, D., Lutz, B. & Pasquali, R. 2006, "The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance", *Endocrine reviews*, vol. 27, no. 1, pp. 73-100.
- Pardo, A., Bartoli, R., Lorenzo-Zuniga, V., Planas, R., Vinado, B., Riba, J., Cabre, E., Santos, J., Luque, T., Ausina, V. & Gassull, M.A. 2000, "Effect of cisapride on intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhosis", *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 31, no. 4, pp. 858-863.
- Paria, B.C. & Dey, S.K. 2000, "Ligand-receptor signaling with endocannabinoids in preimplantation embryo development and implantation", *Chemistry and physics of lipids*, vol. 108, no. 1-2, pp. 211-220.
- Perez Tamayo, R. 1983, "Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl4 and adequate model of human cirrhosis?", *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 3, no. 1, pp. 112-120.
- Perez-Paramo, M., Munoz, J., Albillos, A., Freile, I., Portero, F., Santos, M. & Ortiz-Berrocal, J. 2000, "Effect of propranolol on the factors promoting bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites", *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 31, no. 1, pp. 43-48.
- Pertwee, R.G. 2008, "Ligands that target cannabinoid receptors in the brain: from THC to anandamide and beyond", *Addiction Biology*, vol. 13, no. 2, pp. 147-159.
- Pertwee, R.G. 2001, "Cannabinoids and the gastrointestinal tract", *Gut*, vol. 48, no. 6, pp. 859-867.
- Pertwee, R.G. 1997, "Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors", *Pharmacology & therapeutics*, vol. 74, no. 2, pp. 129-180.

- Pinzani, M. & Gentilini, P. 1999, "Biology of hepatic stellate cells and their possible relevance in the pathogenesis of portal hypertension in cirrhosis", *Seminars in liver disease*, vol. 19, no. 4, pp. 397-410.
- Piomelli, D. 2003, "The molecular logic of endocannabinoid signalling", *Nature reviews.Neuroscience*, vol. 4, no. 11, pp. 873-884.
- Planas, R., Montoliu, S., Balleste, B., Rivera, M., Miquel, M., Masnou, H., Galeras, J.A., Gimenez, M.D., Santos, J., Cirera, I., Morillas, R.M., Coll, S. & Sola, R. 2006, "Natural history of patients hospitalized for management of cirrhotic ascites", *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, vol. 4, no. 11, pp. 1385-1394.
- Porter, A.C., Sauer, J.M., Knierman, M.D., Becker, G.W., Berna, M.J., Bao, J., Nomikos, G.G., Carter, P., Bymaster, F.P., Leese, A.B. & Felder, C.C. 2002, "Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor", *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, vol. 301, no. 3, pp. 1020-1024.
- Prakash, R. & Mullen, K.D. 2010, "Mechanisms, diagnosis and management of hepatic encephalopathy", *Nature reviews.Gastroenterology & hepatology*, vol. 7, no. 9, pp. 515-525.
- Proctor, E. & Chatamra, K. 1982, "High yield micronodular cirrhosis in the rat", *Gastroenterology*, vol. 83, no. 6, pp. 1183-1190.
- Pugh, G., Jr, Smith, P.B., Dombrowski, D.S. & Welch, S.P. 1996, "The role of endogenous opioids in enhancing the antinociception produced by the combination of delta 9-tetrahydrocannabinol and morphine in the spinal cord", *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, vol. 279, no. 2, pp. 608-616.
- Ramadori, G., Moriconi, F., Malik, I. & Dudas, J. 2008, "Physiology and pathophysiology of liver inflammation, damage and repair", *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*, vol. 59 Suppl 1, pp. 107-117.
- Reuben, A. 2003, "The way to a man's heart is through his liver", *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 37, no. 6, pp. 1500-1502.
- Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Millan, J., Derocq, J.M., Casellas, P., Congy, C., Oustric, D., Sarran, M., Bouaboula, M., Calandra, B., Portier, M., Shire, D., Breliere, J.C. & Le Fur, G.L. 1998, "SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor", *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, vol. 284, no. 2, pp. 644-650.

- Riordan, S.M. & Williams, R. 1997, "Treatment of Hepatic Encephalopathy", *New England Journal of Medicine*, vol. 337, no. 7, pp. 473-479.
- Ros, J., Claria, J., To-Figueras, J., Planaguma, A., Cejudo-Martin, P., Fernandez-Varo, G., Martin-Ruiz, R., Arroyo, V., Rivera, F., Rodes, J. & Jimenez, W. 2002, "Endogenous cannabinoids: a new system involved in the homeostasis of arterial pressure in experimental cirrhosis in the rat", *Gastroenterology*, vol. 122, no. 1, pp. 85-93.
- Runyon, B.A., Sugano, S., Kanel, G. & Mellencamp, M.A. 1991, "A rodent model of cirrhosis, ascites, and bacterial peritonitis", *Gastroenterology*, vol. 100, no. 2, pp. 489-493.
- Ryberg, E., Larsson, N., Sjogren, S., Hjorth, S., Hermansson, N.O., Leonova, J., Elebring, T., Nilsson, K., Drmota, T. & Greasley, P.J. 2007, "The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor", *British journal of pharmacology*, vol. 152, no. 7, pp. 1092-1101.
- Ryter, S.W. & Choi, A.M. 2002, "Heme oxygenase-1: molecular mechanisms of gene expression in oxygen-related stress", *Antioxidants & redox signaling*, vol. 4, no. 4, pp. 625-632.
- Scheuer, P.J. 1991, "Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment", *Journal of hepatology*, vol. 13, no. 3, pp. 372-374.
- Schrier, R.W., Arroyo, V., Bernardi, M., Epstein, M., Henriksen, J.H. & Rodes, J. 1988, "Peripheral arterial vasodilation hypothesis: a proposal for the initiation of renal sodium and water retention in cirrhosis", *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 8, no. 5, pp. 1151-1157.
- Shibayama, Y. & Nakata, K. 1985, "Localization of increased hepatic vascular resistance in liver cirrhosis", *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 5, no. 4, pp. 643-648.
- Siegmund, S.V., Qian, T., de Minicis, S., Harvey-White, J., Kunos, G., Vinod, K.Y., Hungund, B. & Schwabe, R.F. 2007, "The endocannabinoid 2-arachidonoyl glycerol induces death of hepatic stellate cells via mitochondrial reactive oxygen species", *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 21, no. 11, pp. 2798-2806.
- Solinas, M., Yasar, S. & Goldberg, S.R. 2007, "Endocannabinoid system involvement in brain reward processes related to drug abuse", *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*, vol. 56, no. 5, pp. 393-405.
- Such, J., Frances, R., Munoz, C., Zapater, P., Casellas, J.A., Cifuentes, A., Rodriguez-Valera, F., Pascual, S., Sola-Vera, J., Carnicer, F., Uceda, F., Palazon, J.M. & Perez-Mateo, M. 2002, "Detection and identification of bacterial DNA in patients with cirrhosis and culture-negative, nonneutrocytic ascites", *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 36, no. 1, pp. 135-141.

- Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A. & Waku, K. 1995, "2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 215, no. 1, pp. 89-97.
- Tam, J., Liu, J., Mukhopadhyay, B., Cinar, R., Godlewski, G. & Kunos, G. 2011, "Endocannabinoids in liver disease", *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 53, no. 1, pp. 346-355.
- Teixeira-Clerc, F., Julien, B., Grenard, P., Tran Van Nhieu, J., Deveaux, V., Li, L., Serriere-Lanneau, V., Ledent, C., Mallat, A. & Lotersztajn, S. 2006, "CB1 cannabinoid receptor antagonism: a new strategy for the treatment of liver fibrosis", *Nature medicine*, vol. 12, no. 6, pp. 671-676.
- Thornton-Jones, Z.D., Kennett, G.A., Benwell, K.R., Revell, D.F., Misra, A., Sellwood, D.M., Vickers, S.P. & Clifton, P.G. 2006, "The cannabinoid CB1 receptor inverse agonist, rimonabant, modifies body weight and adiponectin function in diet-induced obese rats as a consequence of reduced food intake", *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, vol. 84, no. 2, pp. 353-359.
- Tsou, K., Brown, S., Sanudo-Pena, M.C., Mackie, K. & Walker, J.M. 1998, "Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system", *Neuroscience*, vol. 83, no. 2, pp. 393-411.
- van Deventer, S.J., ten Cate, J.W. & Tytgat, G.N. 1988, "Intestinal endotoxemia. Clinical significance", *Gastroenterology*, vol. 94, no. 3, pp. 825-831.
- Varga, K., Wagner, J.A., Bridgen, D.T. & Kunos, G. 1998, "Platelet- and macrophage-derived endogenous cannabinoids are involved in endotoxin-induced hypotension", *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 12, no. 11, pp. 1035-1044.
- Vigna, S.R. 2003, "Cannabinoids and the gut", *Gastroenterology*, vol. 125, no. 3, pp. 973-975.
- Vogels, B.A.P.M., Steynen, B.v., Maas, M.A.W., Järnring, G.G.A. & Chamuleau, R.A.F.M. 1997, *The effects of ammonia and portal-systemic shunting on brain metabolism, neurotransmission and intracranial hypertension in hyperammonaemia-induced encephalopathy*, Elsevier.
- Vorobioff, J., Bredfeldt, J.E. & Groszmann, R.J. 1984, "Increased blood flow through the portal system in cirrhotic rats", *Gastroenterology*, vol. 87, no. 5, pp. 1120-1126.
- Wagner, J.A., Hu, K., Bauersachs, J., Karcher, J., Wiesler, M., Goparaju, S.K., Kunos, G. & Ertl, G. 2001a, "Endogenous cannabinoids mediate hypotension after experimental myocardial infarction", *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 38, no. 7, pp. 2048-2054.

- Wagner, J.A., Jarai, Z., Batkai, S. & Kunos, G. 2001b, "Hemodynamic effects of cannabinoids: coronary and cerebral vasodilation mediated by cannabinoid CB(1) receptors", *European journal of pharmacology*, vol. 423, no. 2-3, pp. 203-210.
- Wagner, J.A., Varga, K., Ellis, E.F., Rzigalinski, B.A., Martin, B.R. & Kunos, G. 1997, "Activation of peripheral CB1 cannabinoid receptors in haemorrhagic shock", *Nature*, vol. 390, no. 6659, pp. 518-521.
- Wagner, J.A., Varga, K. & Kunos, G. 1998, "Cardiovascular actions of cannabinoids and their generation during shock", *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, vol. 76, no. 12, pp. 824-836.
- Wahn, H., Wolf, J., Kram, F., Frantz, S. & Wagner, J.A. 2005, "The endocannabinoid arachidonyl ethanolamide (anandamide) increases pulmonary arterial pressure via cyclooxygenase-2 products in isolated rabbit lungs", *American journal of physiology.Heart and circulatory physiology*, vol. 289, no. 6, pp. H2491-6.
- Wells, C.L., Maddaus, M.A. & Simmons, R.L. 1988, "Proposed Mechanisms for the Translocation of Intestinal Bacteria", *Review of Infectious Diseases*, vol. 10, no. 5, pp. 958-979.
- Wiest, R. & Garcia-Tsao, G. 2005, "Bacterial translocation (BT) in cirrhosis", *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 41, no. 3, pp. 422-433.
- Xu, X., Liu, Y., Huang, S., Liu, G., Xie, C., Zhou, J., Fan, W., Li, Q., Wang, Q., Zhong, D. & Miao, X. 2006, "Overexpression of cannabinoid receptors CB1 and CB2 correlates with improved prognosis of patients with hepatocellular carcinoma", *Cancer genetics and cytogenetics*, vol. 171, no. 1, pp. 31-38.
- Yang, Q., Liu, H.Y., Zhang, Y.W., Wu, W.J. & Tang, W.X. 2010, "Anandamide induces cell death through lipid rafts in hepatic stellate cells", *Journal of gastroenterology and hepatology*, vol. 25, no. 5, pp. 991-1001.
- Yang, Y.Y., Lin, H.C., Huang, Y.T., Lee, T.Y., Hou, M.C., Wang, Y.W., Lee, F.Y. & Lee, S.D. 2007, "Role of Ca²⁺-dependent potassium channels in in vitro anandamide-mediated mesenteric vasorelaxation in rats with biliary cirrhosis", *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, vol. 27, no. 8, pp. 1045-1055.
- Yang, Y.Y., Lin, H.C., Huang, Y.T., Lee, T.Y., Hou, M.C., Wang, Y.W., Lee, F.Y. & Lee, S.D. 2006, "Roles of anandamide in the hepatic microcirculation in cirrhotic rats", *American journal of physiology.Gastrointestinal and liver physiology*, vol. 290, no. 2, pp. G328-34.

Zatonski, W.A., Sulkowska, U., Manczuk, M., Rehm, J., Boffetta, P., Lowenfels, A.B. & La Vecchia, C. 2010, "Liver cirrhosis mortality in Europe, with special attention to Central and Eastern Europe", *European addiction research*, vol. 16, no. 4, pp. 193-201.

Annex

Contribucions a congressos

A continuació es detallen les comunicacions a congressos relacionades amb aquesta tesi.

Comunicacions Orals

Òdena G, Bartolí R, Galan A, Serafin A, Fluvià L, Miquel M, Morillas R, Sala M, Planas R.

Efecte de l'administració a llarg termini de l'antagonista del receptor de cannabinoides CB-1 sobre l'hemodinàmica sistèmica, translocació bacteriana i encefalopatia hepàtica en rates cirròtiques amb ascites.

XIX Congrés de la Societat Catalana de Digestologia. Montbrí del Camp (Tarragona) 2010.

Òdena G, Bartolí R, Galan A, Serafin A, Fluvià L, Miquel M, Morillas R, Sala M y Planas R.

Efecto de la administración a largo plazo del antagonista del receptor de cannabinoides CB-1 sobre la hemodinámica sistémica, translocación bacteriana y encefalopatía hepática en ratas cirróticas con ascitis.

XXXV Congreso de la Asociación Española para el Estudio del Hígado. Madrid 2010.

Pòsters

Òdena G, Bartolí R, Morillas R, Miquel M, Sala M, Planas R.

Els hepatòcits de rata cirròtica amb ascites expressen el receptor profibrogènic CB1. Estudi en un cultiu primari de curta durada.

XIX Congrés de la Societat Catalana de Digestologia. Blanes 2009.

Òdena G, Bartolí R, Morillas R, Miquel M, Sala M, Planas R.

Los hepatocitos de rata cirrótica con ascitis expresan el receptor profibrogénico CB1. Estudio en cultivo primario de corta duración.

XXXIV Congreso de la Asociación Española para el Estudio del Hígado. Madrid 2009.

Òdena G, Bartolí R, Galan A, Serafin A, Fluvià L, Miquel M, Morillas R, Sala M, Planas R.

Effect of long-term administration of a cannabinoid CB1-receptor antagonist on systemic hemodynamics, bacterial translocation and hepatic encephalopathy in ascitic cirrhotic rats.

The Liver Meeting 2009. AASLD. Boston 2009.

Òdena G, Bartolí R, Morillas RM, Sala M, Serra I, Planas R.

Els efectes beneficiosos de rimonabant, antagonista del receptor d'endocannabinoidesCB1, es correlacionen amb una disminució de l'expressió de TGF- β .

XX Congrés de la Societat Catalana de Digestologia. Lleida 2011.

Òdena G, Bartolí R, Morillas RM, Sala M, Serra I, Planas R.

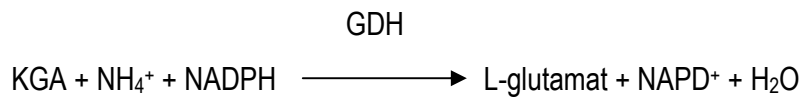
Los efectos beneficiosos de rimonabant, antagonista del receptor de endocannabinoidesCB1, se correlacionan con una disminución de la expresión de TGF- β .

XXXVI Congreso de la Asociación Española para el Estudio del Hígado. Madrid 2011.

Determinació dels nivells d'amoni a plasma i cervell

Per determinar els nivells d'amoni a les mostres processades de plasma i de teixit cerebral es va utilitzar el kit comercial *Ammonia Assay Kit* (AA0100; Sigma-Aldrich).

Aquest és un kit de determinació enzimàtica de l'amoni que es basa en la reacció que fa l'amoni amb l'àcid α -cetoglutaric (KGA) i el fosfat de dinucleòtid de nicotinamida i adenina (NADPH) en presència de L-glutamat deshidrogenasa (GDH), per formar L-glutamat i NADPH oxidada.



El descens en l'absorbància mesurada a 340 nm, degut a l'oxidació de NADPH, és proporcional a la concentració d'amoni.

Reactius

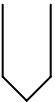
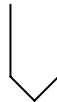
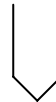
Ammonia Standard Solution (ASS)

L-glutamat deshidrogenasa

Ammonia Assay Reagent (AAR)

Protocol

1. Reconstituir cada vial d'*Ammonia Assay Reagent* en 10 mL d'aigua tamponada i barrejar per inversió sense agitar.
2. En una placa de 96 pous, pipetejar les següents quantitats, segons si el pou correspon a un control negatiu (blanc), a un control amb concentració coneguda d'amoni (estàndard) o a una mostra:

BLANC	ESTÀNDARD	MOSTRA
		
0.5ml AAR	0.5ml AAR	0.5ml AAR
50µl H ₂ O	25µl ASS	50µl Mostra

3. Barrejar el contingut dels pous i incubar durant 5 minuts a 18-35°C
4. Mesurar l'absorbància a 340nm al lector de plaques (Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo Fisher Scientific). Aquesta lectura correspon a l'absorbància inicial (A inicial).
5. Afegir a cada pou 5µl de l'enzim L-glutamat deshidrogenasa.
6. Barrejar i incubar durant 5 minuts a 18-35°C.
7. Mesurar l'absorbància a 340nm al lector de plaques. Aquesta lectura correspon a l'absorbància final (A final).

Càlcul de la concentració d'amoni

L'absorbància de les mostres i els controls a 340nm és el resultat de la següent fórmula:

$$A_{340} = A_{\text{Inicial}} - A_{\text{Final}}$$

A més les mostres s'han de normalitzar en front el control negatiu, per tant:

$$\Delta \text{Mostra} = A_{340} \text{ Mostra} - A_{340} \text{ Blanc}$$

Finalment, i tenint en compte el volum de mostra utilitzat (0,05 mL) i el volum total (0,555mL), per calcular la concentració d'amoni a les mostres utilitzem la fórmula següent:

$$\mu\text{g d'amoni/mL} = \Delta \text{Mostra} \times 30.303$$

Per tal de poder acceptar els resultats obtinguts, cal que el valor obtingut del control estàndard no variï en més d'un 5% de la concentració que s'informa a cada lot.

Medis de cultiu utilitzats per l'aïllament i l'establiment dels cultius primaris d'hepatòcits

Tots els components dels medis es van comprar a Sigma-Aldrich, a excepció del suplement *Insulin-Transferrin-Sodium Selenite* (Invitrogen).

Medi Hanks 10X

Quantitats per preparar 1 L de medi Hanks 10X. Pesar, agitar i autoclavar la solució final:

NaCl	80 g	Clorur sòdic
KCl	4 g	Clorur potàssic
MgSO ₄ • 7H ₂ O	2 g	Sulfat magnèsic heptahidrat
Na ₂ HPO ₄ • 2H ₂ O	0.6 g	Fosfat sòdic dibàsic dihidrat
KH ₂ PO ₄	0.6 g	Fosfat potàssic monobàsic
H ₂ O	1 L	

Medi Hanks-Hepes

Hanks 10X	50 mL
NaHCO ₃	1.048 g
H ₂ O	450 mL

Gasejar amb carbogen (95% O₂ 5% CO₂) i afegir durant el gaseig:

Hepes	1.5g
-------	------

Ajustar a pH 7.4

Medi Hanks amb heparina i sense calci

Hanks Hepes	200mL
EDTA	0.0456 g
BSA	0.200 g
Heparina 5%	0.7 U (0.7mL)

Filtrar (0.2µM) en un matràs autoclavat.

Medi Hanks amb clorur de calci

Hanks Hepes	300 mL
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0.1755 g

Filtrar (0.2µM) en una ampolla autoclavada.

Medi de Krebs 4X

Quantitats per preparar 1 L de estoc de Krebs 4X. Pesar, barrejar, agitar i autoclavar:

NaCl	27.6 g	Clorur sòdic
KCl	1.44 g	Clorur potàssic
KH ₂ PO ₄	0.52 g	Fosfat potàssic monobàsic
MgSO ₄ • 7H ₂ O	1.48 g	Sulfat magnèsic heptahidrat
NaHCO ₃	8 g	Bicarbonat sòdic
H ₂ O	1 L	

Medi de Krebs amb clorur de calci

Krebs 4X	62.5 mL	
CaCl ₂ •2H ₂ O	0.093 g	Clorur de calci dihidrat
H ₂ O	187.5 mL	

Gasejar amb carbògen (95% O₂ 5% CO₂) i afegir durant el gaseig:

Hepes 1.5g

Ajustar a pH 7.4

Filtrar (0.2µM) en una ampolla autoclavada.

Williams Medium E suplementat

Williams Medium E	897,75 mL	
Gentamicina	1,25 mL	[0,05 ng/mL]
L-glutamina	0,292g	[2mM]
Sèrum boví fetal	100mL	
Insulin-Transferrin-Sodium Selenite Supplement (Invitrogen)	1mL	[5µg/mL; 5µg/mL; 5ng/mL]

Solució de lisi

Tots els components es van comprar a Sigma-Aldrich.

Solució de lisi RIPA

50 mM	Tris HCl (pH 8)
150 mM	NaCl
1 %	NP-40
0.5 %	<i>Sodium deoxycholate</i>
0.1 %	SDS
5 mM	NaF
1 mM	<i>Sodium Orthovanadate</i>
1 mM	PMSF
7x	Inhibidors proteases <i>Complete Mini</i> (Roche Applied Science)

Determinació de la concentració de proteïnes total

Es va utilitzar el kit comercial *BCA Protein Assay Kit* (Pierce).

Reactius

BCA Reactiu A

BCA Reactiu B

Ampolles d'albumina estàndard ([2mg/mL])

Protocol

1. Preparar un banc dilucions per construir una corba estàndard:

[BSA µg/mL]	µL Buffer Lisi	µL Stock BSA
2000	0	25 stock
1500	15	45 stock
1000	30	30 stock
750	30	30 [1500]
500	30	30 [1000]
250	30	30 [500]
125	30	30 [250]
25	40	10 [125]
0	25	0

2. Preparar la quantitat adient de *Working Reagent* (WR) segons la quantitat de mostres que es volen analitzar:

$$(9 \text{ estàndards} + X \text{ mostres}) \times 200 \mu\text{L} = Y \mu\text{L de WR}$$

Barrejar 50 parts de Reactiu A amb 1 part de Reactiu B per obtenir Y µL de WR.

3. Pipetejar 25 µL de cada estàndard i de cada mostra en una microplaca, per duplicat.
4. Afegir 200 µL de WR a cada pou i agitar 30 segons (vòrtex).
5. Cobrir la placa i incubar a 37°C durant 30'.
6. Refredar la placa a temperatura ambient.
7. Mesurar l'absorbància a 562 nm en el lector de plaques (Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo Fisher Scientific).

Càlcul de la quantitat de proteïnes totals

Als valors d'absorbància de les mostres i dels estàndards es resta el valor d'absorbància de la mostra control negatiu (blanc).

Preparar la corba estàndard correlacionant els valors d'absorbància amb les concentracions conegudes dels estàndards.

Inferir les concentracions de proteïnes de les mostres utilitzant la corba estàndard.

Els valors de concentració s'obtenen en µg/mL.

Determinació de TGF- β

Per la determinació dels nivells de TGF- β a plasma i a sobrenedant es van utilitzar els kit ELISA de Diaclone següents:

Rat TGF- β 1 ELISA kit (Diaclone 670020096) per mostres de plasma

Reactius

Wash Buffer

Afegir els 50mL de Wash Buffer Concentrate a 950mL d'H₂O destil·lada.

Assay Buffer

Afegir els 5mL d'Assay Buffer Concentrate a 95mL d'H₂O destil·lada.

TGF- β 1 Standard

Diluir amb Assay Buffer en el volum indicat al vial.

Adició de colorants

Per l'*HRP-Conjugate*: Afegir 60 μ L de Green-Dye a 6mL d'Assay Buffer.

Per la resta d'*Assay Buffer*: Afegir 200 μ L de Blue-Dye per cada 50mL d'Assay Buffer.

HRP-Conjugate

Afegir 60 μ L de *HRP-Conjugate* en 5940 μ L d'*Assay Buffer* tenyit de verd. S'ha d'utilitzar en els 30 minuts següents a la seva preparació.

Protocol

1. Descongelar les mostres.
2. Afegir 190µL d'*Assay Buffer* (blau) a tants eppendorf com mostres vulguem analitzar.
3. Afegir 10µL de mostra (plasma) al eppendorf corresponent (dilució 1:20).
4. Afegir 20µL de HCl 1N a cada eppendorf (per activar el TGFβ1 latent).
5. Vortejar i incubar 1h a temperatura ambient.
6. Neutralitzar afegint 20µL de NaOH 1N a cada eppendorf.
7. Vortejar suaument i muntar la placa.
8. Rentar els pous 3 vegades amb 300µL de *Wash Buffer* (transparent), aspirant. Després de l'últim rentat colpejar contra paper per extreure l'excés de *Wash Buffer*.
9. Afegir 100µL d'*Assay Buffer* (blau) a cada pou de la corba estàndard. Com la fem per duplicat, posar 100µL als pous de les dues primeres fileres.
10. Per fer els estàndards, afegir 100µL del *TGF-β1 Standard* als pous 1A i 2A. Barrejar pipetejant.
11. Transferir 100µL dels pous A, als pous 1B i 2B respectivament.
12. Continuar fins a l'últim pou dels estàndards, el G, el penúltim de la filera.
13. Descartar 100µL dels pous 1G i 2G. Hi haurà 100µL de cada estàndard.
14. Els pous 1H i 2H són els blancs i només porten els 100µL d'*Assay Buffer* que ja hem afegit abans.
15. Afegir 100µL de cada mostra.
16. Preparar en aquest moment el *HRP-Conjugate*.
17. Afegir 50µL d'*HRP-Conjugate* (verd) a cada pou.
18. Cobrir la placa i incubar 4h a temperatura ambient en un agitador orbital a 100rpm.
19. Buidar els pous i rentar-los 3 vegades amb 300µL de *Wash Buffer* (transparent), aspirant. Després de l'últim rentat colpejar contra paper.
20. Afegir 100µL de *TMB Substrate Solution* a cada pou.
21. Incubar aproximadament 15 minuts a temperatura ambient en un agitador orbital a 100rpm.
22. Aturar la reacció enzimàtica afegint 100µL d'*Stop Solution* a cada pou.
23. Llegir immediatament a 450nm (absorbància de referència 620nm) al lector de plaques (Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo Fisher Scientific) o si no dins de la hora següent si s'emmagatzema la placa a 4°C en fosc.

Rat TGF- β 1 ELISA Kit (Diaclone 670020192) per mostres de sobrenedants

Reactius

Wash Buffer

Afegir els 50mL de Wash Buffer Concentrate a 950mL d'H₂O destil·lada

Assay Buffer

Afegir els 5mL d'Assay Buffer Concentrate a 95mL d'H₂O destil·lada

TGF- β 1 Standard

Diluir amb Assay Buffer en el volum indicat al vial.

Biotin-Conjugate

Afegir 120 μ L de *Biotin-Conjugate* a 11880 μ L d'*Assay Buffer* tenyit de verd. S'ha d'utilitzar en els 30 minuts següents a la seva preparació.

Streptavidin-HRP

Afegir 120 μ L de *Streptavidin-HRP* a 11880 μ L d'*Assay Buffer* tenyit de vermell. S'ha d'utilitzar en els 30 minuts següents a la seva preparació

Adició de colorants

<i>Buffer</i>	<i>Assay Buffer</i>	Tinció
<i>Biotin Conjugate</i>	12mL	120 μ L de <i>Green-Dye</i>
<i>Streptavidin-HRP</i>	12mL	48 μ L de <i>Red-Dye</i>
<i>Diluent</i>	50mL	200 μ L de <i>Blue-Dye</i>

Protocol

1. Descongelar les mostres..
2. Afegir 190 μ L d'*Assay Buffer* (blau) a tants eppendorf com mostres vulguem analitzar.
3. Afegir 10 μ L de mostra (sobrenedant) al eppendorf corresponent (dilució 1:20).
4. Afegir 20 μ L de HCl 1N a cada eppendorf (per activar el TGF β 1 latent).
5. Vortejar i incubar 1h a temperatura ambient.
6. Neutralitzar afegint 20 μ L de NaOH 1N a cada eppendorf i vortejar suau.
7. Muntar la placa. Rentar els pous 3 vegades amb 300 μ L de *Wash Buffer* (transparent), aspirant. Després de l'últim rentat colpejar contra paper per extreure l'excés de *Wash Buffer*.

8. Afegir 100µL d'*Assay Buffer* (blau) a cada pou de la corba estàndard. Com la fem per duplicat, posar 100µL als pous de les dues primeres fileres.
9. Per fer els estàndards, afegir 100µL del *TGF-β1 Standard* als pous 1A i 2A. Barrejar pipetejant.
10. Transferir 100µL dels pous A, als pous 1B i 2B respectivament.
11. Continuar fins a l'últim pou dels estàndards, el G, el penúltim de la filera.
12. Descartar 100µL dels pous 1G i 2G. Hi haurà 100µL de cada estàndard.
13. Els pous 1H i 2H són els blancs i només porten els 100µL d'*Assay Buffer* que ja hem afegit abans.
14. Afegir 100µL de cada mostra i 100µL de medi amb 10%FBS com a control (ja que el sèrum animal pot contenir nivells elevats de TGFβ1 latent).
15. Cobrir la placa i incubar 2h a temperatura ambient en un agitador orbital a 100rpm.
16. Preparar en aquest moment el *Biotin-Conjugate*.
17. Buidar els pous i rentar-los 5 vegades amb 300µL de *Wash Buffer* (transparent), aspirant. Després de l'últim rentat colpejar contra paper.
18. Afegir 100µL de *Biotin-Conjugate* (verd) a cada pou.
19. Cobrir la placa i incubar 1h a TA a temperatura ambient en un agitador orbital a 100rpm.
20. Preparar en aquest moment el *Streptavidin-HRP*.
21. Buidar els pous i rentar-los 5 vegades amb 300µL de *Wash Buffer* (transparent), aspirant. Després de l'últim rentat colpejar contra paper.
22. Afegir 100µL del *Streptavidin-HRP* (vermell) a cada pou.
23. Cobrir la placa i incubar 1h a temperatura ambient en un agitador orbital a 100rpm.
24. Buidar els pous i rentar-los 5 vegades amb 300µL de *Wash Buffer* (transparent), aspirant. Després de l'últim rentat colpejar contra paper.
25. Afegir 100µL de *TMB Substrate Solution* a cada pou.
26. Incubar aproximadament 30 minuts a temperatura ambient en un agitador orbital a 100rpm.
27. Aturar la reacció enzimàtica afegint 100µL d'*Stop Solution* a cada pou.
28. Llegir immediatament a 450nm (absorbància de referència 620nm) al lector de plaques (Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo Fisher Scientific) o si no dins de la hora següent si s'emmagatzema la placa a 4°C en foscor.
29. La concentració calculada s'ha de multiplicar pel factor de dilució de les mostres, 1:20.

Determinació de TNF

Rat TNF- α ELISA Kit (Invitrogen KRC3011)

Reactius

Rt TNF- α Standard

Standard Diluent Buffer.

Incubation Buffer.

Rt TNF- α High and Low Controls

Antibody Coated Wells (1 placa)

Rt TNF- α Biotin Conjugate, (Biotin-labeled anti-Rt TNF- α).

Streptavidin-HRP Concentrate (100X)

Streptavidin-HRP Diluent.

Wash Buffer Concentrate (25X).

Stabilized Chromogen, Tetramethylbenzidine (TMB)

Stop Solution

Preparació de les mostres

En el cas de les mostres de teixit hepàtic es va homogeneïtzar 50mg de teixit en 1mL d'aigua bidestil·lada (Bio-Gen Pro200, Pro Scientific Inc.).

Les mostres de teixit hepàtic homogeneïtzat i les mostres de sobrenedant es van diluir 1:2 en *Standard Diluent Buffer*.

Preparació de les dilucions estàndard

Reconstituir el vial d'estàndard amb *Standard Diluent Buffer* per obtenir una concentració de 2.000 pg/mL de TNF- α de rata (depèn de cada estoc). Barrejar i esperar 10 minuts abans de fer-lo servir (s'ha d'utilitzar en l'hora següent a la reconstitució).

Afegir 225 μ L de l'estàndard 2.000 pg/mL en 375 μ L de *Standard Diluent Buffer*. S'obté així una concentració de 750 pg/mL de TNF- α de rata.

Afegir 300 μ L de *Standard Diluent Buffer* a 6 tubs i fer dilucions seriades (afegint 300 μ L de la solució anterior més concentrada als 300 μ L de *Standard Diluent Buffer*) per obtenir les següents

concentracions: 375, 187,5, 93,8, 46,9, 23,4 i 11,7 pg/mL de TNF- α de rata. Mantenir a 4°C fins a la seva utilització.

Preparació de *Streptavidin-HRP Working Solution*

Deixar el *Streptavidin-HRP Concentrate* (100X) a temperatura ambient i un cop temperat diluir-ne 120 μ L en 12 mL de *Streptavidin-HRP Diluent*. Un cop preparada utilitzar abans de 15 minuts.

Preparació de *Wash Buffer*

Deixar el *Wash Buffer Concentrate* (25X) a temperatura ambient i un cop temperat diluir-ne 20 mL en 480mL d'aigua desionitzada (1 volum en 24 volums).

Mantenir a 4°C fins a la seva utilització.

Protocol

1. Deixar temperar totes les solucions a temperatura ambient i barrejar-les bé, abans de fer-les servir.
2. Reservar dos pous que s'utilitzaran com a blancs del cromogen.
3. Afegir 100 μ L de *Standard Diluent Buffer* als pous zero de la corba de concentracions estàndard.
4. Afegir 100 μ L de les solucions estàndard als pous adients.
5. Afegir 100 μ L de les mostres als pous adients.
6. Cobrir la placa i incubar 2h a temperatura ambient.
7. Decantar els líquids de la placa i rentar 4 vegades, afegint 400 μ L de *Wash Buffer* a cada pou cada vegada.
8. Pipetejar 100 μ L de la solució *Rat TNF- α Biotin Conjugate* a cada pou, excepte als pous reservats com a blancs del cromogen.
9. Cobrir la placa i incubar 1h a temperatura ambient.
10. Decantar els líquids de la placa i rentar 4 vegades, afegint 400 μ L de *Wash Buffer* a cada pou cada vegada.
11. Afegir 100 μ L de *Streptavidin-HRP Working Solution* a cada pou, excepte als pous reservats com a blancs del cromogen.
12. Cobrir la placa i incubar 30 minuts a temperatura ambient.

13. Decantar els líquids de la placa i rentar 4 vegades, afegint 400µL de *Wash Buffer* a cada pou cada vegada.
14. Afegir 100µL de *Stabilized Chromogen* a cada pou. El líquid dels pous començarà a convertir-se en blau.
15. Incubar 30 minuts a temperatura ambient a la foscor (no utilitzar paper d'alumini o metal·litzat per cobrir la placa).
16. Afegir 100µL de *Stop Solution* a cada pou i barrejar suaument. El color del líquid als pous es tornarà groc.
17. Llegir l'absorbància a 450 nm en els 30 minuts següents a afegir la *Stop Solution* al lector de plaques (Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo Fisher Scientific).
18. Utilitzar els pous reservats com a valor basal i generar una corba estàndard de concentració amb els valors d'absorbància de les solucions estàndard.
19. Calcular els valors de concentració TNF- α a les mostres, comparant les absorbàncies obtingudes amb els valors de la corba estàndard.
20. Multiplicar els valors de concentració obtinguts per dos (donat que hem diluït les mostres inicialment en 1:2 de Standard Diluent Buffer) i en el cas de les mostres de teixit a més multiplicar per 20 per tal d'obtenir els valors en ng de TNF- α per gram de teixit.

