

Sistema endocanabinoide y desarrollo de esteatosis hepática

CARINA VALENZUELA^{1,a}, VALESKA CASTILLO^{2,b}, ANA MARÍA RONCO^{2,c}, CAROLINA AGUIRRE^{2,d}, SANDRA HIRSCH^{3,e}, MIGUEL LLANOS^{2,f}

A role for the endocannabinoid system in hepatic steatosis

The endocannabinoid system (SEC) is an important modulator of several metabolic functions. This system is composed by cannabinoid receptors type 1 and 2 (RCB₁ and RCB₂), their endogenous ligands, known as endocannabinoids, and the enzymes involved in their synthesis and degradation. A deregulated SEC originates metabolic alterations in several tissues, resulting in the typical manifestations of the metabolic syndrome. Liver steatosis of different origins constitutes a physiopathological condition where an altered hepatic SEC is observed. In this condition, there is an increased expression of RCB₁ and/or higher endocannabinoid levels in different hepatic cells, which may exert an autocrine/paracrine hyperstimulation of RCB₁/RCB₂. Activation of RCB₁ stimulate the expression of several hepatocyte lipogenic factors, thus leading to increased de novo fatty acids synthesis and consequently to an abnormal accumulation of triglycerides. The effect of RCB₂ activity on hepatic function is still controversial because, on one side its stimulation has an interesting protective effect on alcoholic liver disease while, on the other, it may enhance the development of hepatic steatosis in experimental models of diet-induced obesity. In this review we discuss the proposed mechanisms by which SEC is involved in the etiology of hepatic steatosis, as well as the therapeutic possibilities involving peripheral RCB₁/RCB₂ antagonism/agonism, for the treatment of this condition.

(Rev Med Chile 2014; 142: 353-360)

Key words: Endocannabinoids; Liver Diseases; Receptors Cannabinoid.

La esteatosis hepática se caracteriza por una acumulación excesiva de triglicéridos en los hepatocitos. Esta condición constituye el estado inicial de diversas enfermedades hepáticas, tales como enfermedad hepática por alcohol, enfermedad por hígado graso no alcohólica y hepatitis C. La progresión a un estado de cirrosis hepática deriva en complicaciones tales, que son de alto riesgo de mortalidad como la encefalopatía hepática, falla hepática por hipertensión portal y riesgo a desarrollar carcinoma hepatocelular. El daño hepático crónico es un importante problema de salud pública en la actualidad, con una mortalidad de alrededor de 1,4 millones de individuos/año a nivel mundial¹. En Chile, la Encuesta Nacio-

nal de Salud 2009-2010 determinó que el riesgo de desarrollar daño hepático crónico por alcohol es de 39,1% en hombres y 25,2% en mujeres², siendo la mortalidad total por cirrosis y otras enfermedades crónicas del hígado de 3.249 defunciones durante el año 2009³.

La acumulación excesiva de triglicéridos a nivel hepático se puede deber a distintos mecanismos: 1) aumento de la síntesis *de novo* de ácidos grasos; 2) disminución de la oxidación de ácidos grasos; 3) transporte aumentado de ácidos grasos desde tejidos periféricos hacia el hígado; 4) bloqueo del transporte de ácidos grasos desde el hígado a la circulación general y a tejidos periféricos. Si esta condición patológica persiste, progresa a infla-

¹Departamento de Nutrición y Alimentos, Facultad de Farmacia, Universidad de Valparaíso. Valparaíso. Chile.

²Laboratorio de Nutrición y Regulación Metabólica.

³Laboratorio de Envejecimiento y Enfermedades Crónicas Asociadas a la Nutrición.

Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA). Universidad de Chile. Santiago. Chile.

^aNutricionista, MSc Nutrición Humana.

^bBioquímica.

^cBioquímica, PhD en Biología.

^dNutricionista, PhD en Nutrición y Alimentos.

^eMédico Cirujano, MSc Nutrición Humana.

^fQuímico Farmacéutico, Post-doctorado.

Financiado por Proyecto FONDECYT n° 1130106

Recibido el 6 de noviembre de 2012, aceptado el 11 de julio de 2013.

Correspondencia:

Dr. Miguel N. Llanos S. Laboratorio de Nutrición y Regulación Metabólica.

Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Chile.

Macul # 5540. Casilla 138-11. Santiago, Chile.

Fono: 29781507

Fax: 22214030

mllanos@inta.uchile.cl

mación, fibrosis y finalmente cirrosis hepática, especialmente en presencia del virus de la hepatitis C, diabetes y obesidad.

Existe evidencia reciente que implica al sistema endocanabinoide (SEC) en la regulación de la hemodinamia hepática, fibrogénesis y metabolismo lipídico, además de su participación en la desregulación de estas funciones en estados patológicos, como en la esteatosis hepática de origen alcohólico o dietario. Por lo tanto, es necesario discernir los mecanismos implicados en el desarrollo de estas patologías, como una estrategia potencial para el tratamiento del daño hepático a través de la modulación del SEC.

Sistema endocanabinoide. Características generales

El sistema endocanabinoide lo comprenden fundamentalmente los receptores tipo 1 y 2 para cannabinoides (RCB_1 y RCB_2), sus agonistas endógenos, siendo los más estudiados la anandamida (ADA) y el 2-araquidonoilglicerol (2-AG), y las enzimas responsables de su formación y degradación^{4,5}.

Los endocannabinoides ADA y 2-AG, son biosintetizados a partir de fosfolípidos de membrana. La ADA se une con gran afinidad al RCB_1 y con menor selectividad a RCB_2 . En tanto, el 2-AG se une casi con la misma afinidad a ambos receptores⁶ (Figura 1). Luego de ejercer su acción, la ADA es degradada específicamente por la acción de la

enzima ácido graso amido hidrolasa (AGAH), mientras que el 2-AG es inactivado por la enzima monoacilglicerol lipasa (MAGL).

Los RCB_1 y RCB_2 son receptores de membrana acoplados a proteína G, inicialmente descubiertos como blancos moleculares del (-)-D⁹-tetrahidrocannabinol (D⁹-THC), el componente psicotrópico de la planta *Cannabis Sativa*. Dichos receptores participan en la modulación fisiológica de varias funciones del sistema nervioso central y de diversos tejidos periféricos al ser activados por sus agonistas endógenos. El RCB_1 se expresa tanto a nivel central como periférico (tracto gastrointestinal, hígado, páncreas, músculo esquelético, tejido adiposo, etc.)⁷; en tanto que el RCB_2 se expresa principalmente en las células del sistema hematopoyético e inmune⁸. Sin embargo, en los últimos años se ha descrito la presencia del RCB_2 en cerebro⁹ y en tejidos periféricos tales como páncreas e hígado^{10,11} jugando un rol importante en la funcionalidad de estos tejidos.

SEC en hígado

Hace menos de una década se estableció la presencia del SEC a nivel hepático, conociéndose cada vez más su participación en distintas funciones metabólicas inherentes a la fisiología y fisiopatología hepática. En condiciones normales, los receptores para cannabinoides se expresan débilmente en el hígado¹²; observándose bajos niveles de RCB_1 en hepatocitos y células endoteliales, y de

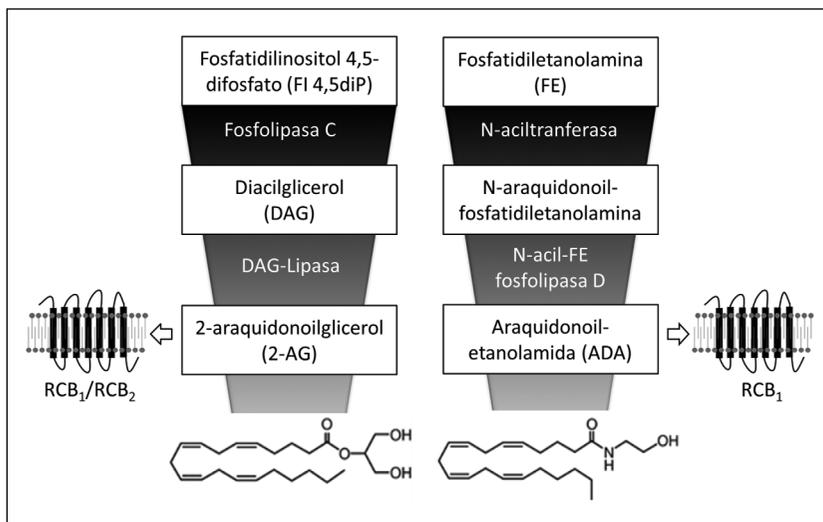


Figura 1. Rutas metabólicas vinculadas a la síntesis de los endocannabinoides Anandamida (ADA) y 2-Araquidonoilglicerol (2-AG) a partir de fosfolípidos de membrana. Luego de sintetizados, estos endocannabinoides son capaces de activar RCB_1 y RCB_2 estimulando diversos procesos metabólicos en tejidos blanco.

RCB₂ en células de Kupffer. Sin embargo, el daño hepático en distintos grados está asociado a un aumento de la expresión de RCB₁ en hepatocitos, miofibroblastos y células endoteliales y de RCB₂ en células de Kupffer y miofibroblastos¹. Adicionalmente, en respuesta a daño hepático agudo o crónico hay un aumento de la concentración de 2-AG en hepatocitos y en células estrelladas, y de ADA en hepatocitos, células endoteliales y de Kupffer^{11,13,14}. Estos antecedentes indican la existencia de un mayor tono endocanabinoide hepático en condiciones fisiopatológicas, tales como la esteatosis alcohólica y no alcohólica.

SEC y esteatosis hepática no alcohólica

El hígado graso no-alcohólico (HGNA) es la señal hepática del síndrome metabólico y es bastante común en la práctica clínica, con una prevalencia de 20-30% en países occidentales¹⁵. La manifestación de la enfermedad va desde una simple esteatosis a una esteatohepatitis, un estado que incluye esteatosis, inflamación, daño hepático y activación de fibrogénesis, con un riesgo de 10-20% de presentar cirrosis luego de 10 a 20 años¹⁶. El progreso de esteatosis a esteatohepatitis no está claramente dilucidado y parece ser de carácter multifactorial. Estudios recientes indican la participación de metabolitos lipotóxicos de ácidos grasos provenientes del tejido adiposo, como también el aumento de lipogénesis *de novo* en el hígado. El daño hepatocelular y su progresión es potenciado por la acción de citoquinas derivadas de macrófagos infiltrados¹⁷.

Tanto la obesidad en humanos como la inducida en modelos animales están a menudo asociadas a esteatosis hepática; sin embargo, ambas condiciones no ocurren en animales "knockout" para el gen que codifica a RCB₁ (RCB₁^{-/-})¹⁸. Por otra parte, en ratas genéticamente obesas (Zucker) es posible reducir su cuadro de esteatosis luego de un tratamiento crónico con un antagonista/agonista inverso de RCB₁¹⁹. En este sentido, los nuevos estudios se han enfocado en asociar la maquinaria molecular hepática con las acciones metabólicas reguladas por el SEC, que son conducentes al desarrollo de lipogénesis *de novo*. Aunque normalmente los hepatocitos expresan RCB₁ en bajos niveles, al ser activados estos receptores estimulan la síntesis *de novo* de ácidos grasos a través de una secuencia de reacciones que implican un au-

mento en la expresión del factor de transcripción conocido como proteína de unión del elemento regulador de esteroides 1c (SREBP-1c), que a su vez induce una mayor expresión de sus enzimas blanco: la acetil coenzima A carboxilasa-1 (ACC1) y la ácido graso sintasa (AGS)¹⁸. En forma concordante, no hay respuesta lipogénica del hígado en ratones RCB₁^{-/-}; en tanto que ratones nativos tratados con un antagonista/agonista inverso de RCB₁ (Rimonabant), muestran una disminución de la síntesis *de novo* de ácidos grasos hepáticos. Al respecto, resulta interesante el hallazgo que demuestra que una dieta alta en grasa es capaz de estimular la producción de ADA a nivel hepático y al mismo tiempo aumentar la expresión de RCB₁ en hepatocitos¹⁸. Ambas condiciones indican la existencia de una hiperactivación de RCB₁, derivando finalmente en un aumento de la síntesis *de novo* de ácidos grasos y la posterior acumulación de triglicéridos. Estudios más recientes, realizados en un modelo animal con una delección hígado-específica de la expresión de RCB₁ (hRCB₁^{-/-}), demostraron que estos receptores hepáticos se requieren para el desarrollo de esteatosis inducida por dieta, dislipidemia y resistencia a insulina y leptina²⁰. Además, estos animales hRCB₁^{-/-} alimentados con una dieta alta en grasa desarrollan obesidad, pero no presentan esteatosis hepática, ni dislipidemia ni resistencia a insulina. Estudios recientes en cultivos de hepatocitos demuestran además que la activación de RCB₁ no solo estimula la lipogénesis *de novo*, sino que también reduce la oxidación de ácidos grasos y bloquea la liberación de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) ricas en triglicéridos. En este último caso, se ha demostrado que hay una rápida depleción del exceso de triglicéridos hepáticos luego de un bloqueo global de RCB₁ periféricos en modelos animales de obesidad inducida por dieta²¹. Este hallazgo sugiere la participación de RCB₁ en la modulación de la velocidad de secreción de VLDL desde hígado a la circulación sanguínea. El antagonista utilizado en este estudio, denominado AM6545, oralmente biodisponible y con una limitada penetración a nivel del sistema nervioso central, es capaz de revertir la esteatosis hepática no alcohólica asociada a obesidad y mejorar la dislipidemia²¹.

Otro receptor importante en la fisiopatología hepática es el receptor tipo 2 para canabinoides (RCB₂). Se ha descrito que los RCB₂, que normalmente son casi indetectables en el hígado,

están fuertemente inducidos en hepatocitos y colangiocitos en casos de esteatosis no alcohólica e hígado graso²². En cirrosis hepática declarada, dichos receptores se encuentran ampliamente distribuidos en el hígado, tanto en hepatocitos, células estrelladas, colangiocitos y miofibroblastos. Estos antecedentes sugieren la participación de RCB₂ en los cambios metabólicos que caracterizan la fisiopatología hepática en diversos grados. En este sentido, ratones knockout para RCB₂ (RCB₂^{-/-}) son resistentes a la esteatohepatitis inducida por dieta en comparación a los ratones nativos con igual alimentación. Adicionalmente, el tratamiento con un agonista de RCB₂ incrementó más aún la acumulación de triglicéridos hepáticos en ratones nativos²³. Sin embargo, en la actualidad se requieren más estudios para dilucidar el rol del RCB₂ en la patogénesis del hígado graso, como también la participación de otros posibles receptores cannabinoides con una función aún desconocida en la biología hepática²⁴ (Figura 2).

SEC y esteatosis hepática alcohólica

El alcoholismo, que puede conducir al desarrollo de hígado graso y progresar a cirrosis, es una de las principales causas de morbimortalidad relacionadas con daño hepático. El consumo de alcohol estimula la lipogénesis hepática e inhibe

la oxidación de los ácidos grasos²⁵. Teniendo en consideración que el mecanismo por el cual se induce esteatosis por alcohol y por dieta es similar (estimulación SREBP-1c) y que el alcohol induce un aumento de los niveles de endocannabinoides en cerebro²⁶, se ha sugerido que el SEC participa también en el desarrollo de la esteatosis alcohólica. De hecho, modelos en ratones con ingesta alcohólica crónica mostraron que la esteatosis hepática está asociada a un aumento en la expresión de RCB₁ y niveles de 2-AG en células estrelladas; condición que se puede evitar con la administración de un antagonista de RCB₁¹³. Los niveles aumentados de 2-AG generan una hiperestimulación paracrina de los RCB₁ presentes en los hepatocitos adyacentes, induciendo la sobre-expresión de genes lipogénicos y disminuyendo la excreción de triglicéridos hepáticos y la oxidación de ácidos grasos. Resultados adicionales indican que ratones nativos tratados con un antagonista de RCB₁ y aquellos RCB₁^{-/-} y hRCB₁^{-/-}, son resistentes al desarrollo de hígado graso inducido por la ingesta de alcohol¹³.

Por otra parte, se ha sugerido que la activación de los RCB₂ podría ser un nuevo objetivo terapéutico en las enfermedades hepáticas por abuso de alcohol. En un modelo de ratas cirróticas, el agonista de RCB₂, JWH-133, mejora la respuesta regenerativa a una lesión hepática aguda y disminuye la fibrosis²⁷. La activación de RCB₂ también puede tener efectos beneficiosos sobre

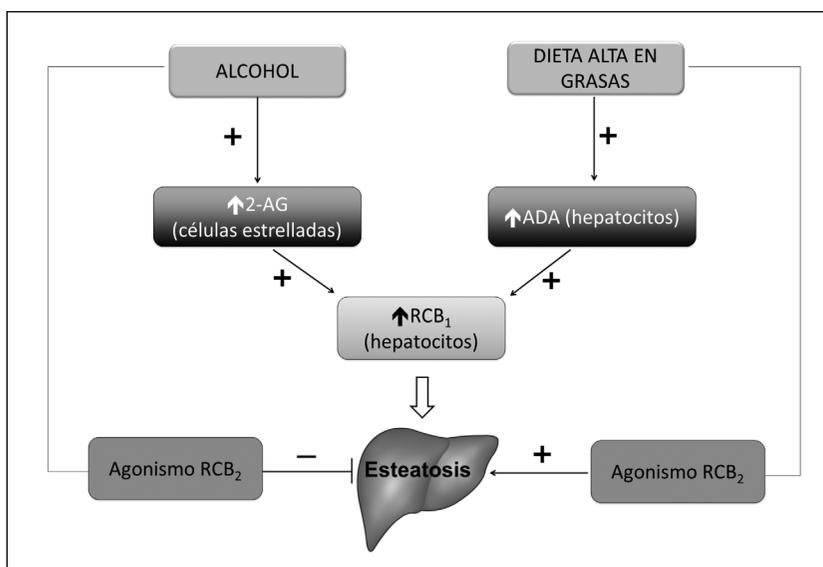


Figura 2. Participación del sistema endocanabinoide en la etiología de la esteatosis hepática. Es importante notar los efectos opuestos del agonismo de RCB₂ en relación a la causa de esta patología; ya sea por consumo de dieta obesogénica o alcohol.

el daño hepático debido a hepatitis inducida por tetracloruro de carbono (CCl_4), ya que promueve regeneración tisular vía mecanismos paracrinos que inicialmente implican la participación de miofibroblastos hepáticos²⁸. La enzima inducible sintetasa de óxido nítrico (iSON) se ha identificado como la molécula clave capaz de mediar los efectos beneficiosos de RCB_2 en hígado²⁸, ya que ratones privados de la expresión de RCB_2 ($\text{RCB}_2^{-/-}$) muestran una inducción disminuida de la iSON hepática cuando son estimulados con CCl_4 ; en tanto que ratones privados de expresión de iSON muestran un aumento de la apoptosis del hepatocito cuando son expuestos a los efectos deletéreos de dicho solvente orgánico²⁹.

Otros estudios indican que la activación de RCB_2 reduce la acumulación de triglicéridos en hepatocitos de ratones expuestos a una ingesta crónica de alcohol³⁰. Adicionalmente, estudios en ratones $\text{RCB}_2^{-/-}$ expuestos a alcohol presentan una esteatosis hepática exacerbada, mientras que animales nativos tratados con un agonista selectivo para RCB_2 (JWH-133) no desarrollan esteatosis por ingesta alcohólica. Dado que los RCB_2 no se expresan en los hepatocitos^{23,28}, los datos sugieren que la señal anti-esteatogénica se podría originar en las células de Kupffer. Estos antecedentes sugieren que la activación de RCB_2 tiene un efecto beneficioso en el daño hepático por alcohol, limitando la inflamación y la esteatosis a través de efectos autocrinos y paracrinos. En este sentido, experimentos in vitro han confirmado que la activación de RCB_2 regula la polarización de los macrófagos, previniendo la respuesta proinflamatoria M1 e induciendo la respuesta antiinflamatoria M2³⁰, lo que reduce la acumulación de grasa en el hígado.

Evidencia clínica

En relación a algunos estudios clínicos, estos coinciden con los datos preclínicos descritos anteriormente. Se sabe que pacientes obesos con tendencia a desarrollar síndrome metabólico poseen un tono endocanabinoide aumentado, teniendo niveles séricos de 2-AG mayores que los que presentan los individuos delgados^{31,32}. Datos de la literatura indican que hay una correlación positiva entre las concentraciones de 2-AG en sangre arterial y venosa hepática y el contenido de lípidos en hígado³³. Adicionalmente, un estudio reciente

demostró un robusto aumento de RCB_1 hepáticos en individuos con hígado graso no alcohólico³⁴. El impacto del SEC sobre la esteatosis hepática se ha investigado más acuciosamente en pacientes con hepatitis C, en los cuales la prevalencia de esteatosis es de 30-70%, ya sea como consecuencia de perturbaciones metabólicas asociadas o bien por los efectos esteatogénicos propios del genotipo 3 del virus de la hepatitis C. En un estudio prospectivo en pacientes con hepatitis C no tratados, el uso diario de *Cannabis* durante 6 meses se reconoció como un predictor independiente de esteatosis severa³⁵. Adicionalmente, se ha demostrado una correlación positiva entre el nivel de expresión de RCB_1 hepáticos y el grado de severidad de la esteatosis por hepatitis C³⁶.

Aunque los estudios clínicos han sido suspendidos en la actualidad debido a los efectos indeseables de los antagonistas de RCB_1 a nivel del sistema nervioso central, evidencias previas e indirectas sugieren que el bloqueo de RCB_1 podría haber sido una aproximación válida para el manejo de la esteatosis hepática no-alcohólica. El análisis de los datos obtenidos de cuatro estudios independientes en pacientes con sobrepeso, indica una disminución de los niveles séricos de alanina aminotransferasa (ALT) en aquellos sujetos bajo tratamiento con rimonabant en relación a los tratados con un placebo, lo que sugiere un impacto beneficioso sobre el hígado graso³⁷. Adicionalmente, el ensayo ADAGIO-Lípidos, en alrededor de 800 pacientes con obesidad abdominal y dislipidemia, reportó resultados similares³⁸. Más aun, un subestudio dentro del ensayo descrito anteriormente, desarrollado para evaluar depósitos lipídicos hepáticos por tomografía computarizada, reveló una disminución de la esteatosis hepática en los pacientes tratados con rimonabant versus los pacientes sometidos a placebo. Todas estas evidencias indican la participación de los endocanabinoides y de los RCB_1 hepáticos en el desarrollo de esteatosis; y por lo tanto validan la posibilidad de inhibir este receptor en el tratamiento de esta condición patológica; aun cuando dicha inhibición debiese estar restringida a nivel periférico para evitar los efectos secundarios asociados a un impacto indeseable en la función cerebral^{16,39,40}.

Finalmente, es necesario recordar que rimonabant se utilizó terapéuticamente en varios países, fundamentalmente en Europa, durante alrededor de dos años (2006-2008), período en el que se

constató que este compuesto, al inhibir los RCB₁ presentes en el sistema nervioso central, generaba problemas de ansiedad y depresión marcada en pacientes susceptibles^{37,41}. El SEC está involucrado en la mantención de un estado homeostático de comportamiento, respondiendo a períodos de estrés y ansiedad a través de una modulación neuronal retrógrada^{42,43} debido a la activación de RCB₁ por sus agonistas endógenos ADA y 2-AG⁴⁴. De manera que el bloqueo de RCB₁ en el sistema nervioso central altera los mecanismos de “manejo” del estrés y la ansiedad, facilitando la manifestación de efectos secundarios de carácter depresivo. Dado que los riesgos de desórdenes psiquiátricos a causa de este compuesto sobrepasaban los efectos beneficiosos, la Agencia Europea de Medicina recomendó en octubre de 2008 la suspensión de la venta de este medicamento^{41,45}. Por esta razón, en los últimos años, la investigación en esta área se ha enfocado en el desarrollo de compuestos que no atraviesen la barrera hemato-encefálica, ya sea antagonistas como agonistas inversos, de modo que ejerzan su acción de bloqueo de RCB₁ solamente en órganos periféricos^{39,46,47}. El potencial terapéutico de este tipo de compuestos sería de gran utilidad en el tratamiento de ciertas condiciones fisiopatológicas asociadas a la hiperactivación de RCB₁, como por ejemplo las alteraciones hepáticas descritas en este artículo.

Conclusiones

En los últimos años se ha considerado que los endocanabinoides, a través de la activación de RCB₁ hepáticos, han emergido como importantes moduladores del desarrollo de hígado graso, tanto el inducido por dieta como por alcohol. Ambas situaciones dan cuenta de la mayoría de los casos de cirrosis en las sociedades occidentales, lo que promueve el potencial uso terapéutico de antagonistas de RCB₁ para el tratamiento de estas condiciones patológicas. Dados los efectos secundarios indeseables a nivel del sistema nervioso central reportados al utilizar rimonabant para el tratamiento de sobrepeso/obesidad (un antagonista/agonista inverso de RCB₁), se ha formulado actualmente una segunda generación de antagonistas y agonistas inversos de este receptor CB₁, con acción restringida a nivel periférico, que podrían ser útiles para el tratamiento de la esteatosis hepática de distinto origen.

Por otra parte, la posibilidad de utilizar agonistas de RCB₂ sin efectos psicoactivos es un hecho plausible, dado los beneficios terapéuticos que puede presentar la activación de RCB₂ en atenuar el daño hepático y promover la reparación del tejido en casos de fibrosis hepática por alcohol.

Finalmente, es importante considerar que el SEC hepático no sólo participa en la fisiología y fisiopatología del hígado, sino que también está implicado en otros efectos sistémicos asociados al síndrome metabólico, como es el caso de la dislipidemia y resistencia a insulina y leptina^{20,34}.

Agradecimientos: Se agradece el apoyo financiero del Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología de Chile, a través del proyecto n° 1130106.

Referencias

1. Mallat A, Lotersztajn S. Cannabinoid receptors as therapeutic targets in the management of liver diseases. *Drug News Perspect* 2008; 21 (7): 363-8.
2. Encuesta Nacional de Salud 2009-2010, MINSAL Chile. [en línea: <http://www.minsal.gob.cl/portal/url/item/bcb03d7bc28b64dfe040010165012d23.pdf>].
3. Estadísticas vitales, informe anual 2010, INE [en línea: http://www.ine.cl/canales/chile_estadistico/demografia_y_vitales/estadisticas_vitales/pdf/vitales_2010.pdf].
4. Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 1988; 34: 605-13.
5. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptors. *Science* 1992; 258: 1946-9.
6. Valenzuela C, Aguirre C, Castillo V, Ronco AM, Llanos M. [A role for the endocannabinoid system in obesity]. *Rev Med Chile* 2010; 138 (5): 621-9.
7. Matias I, Petrosino S, Racioppi A, Capasso R, Izzo AA, Di Marzo V. Dysregulation of peripheral endocannabinoid levels in hyperglycemia and obesity: Effect of high fat diets. *Mol Cell Endocrinol* 2008; 16: 286 (1-2 Suppl 1): S66-78.
8. Graham ES, Angel CE, Schwarz LE, Dunbar PR, Glass M. Detailed Characterisation of CB2 receptor protein expression in peripheral blood immune cells from healthy human volunteers using flow cytometry. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2010; 23 (1): 25-34.
9. Callén L, Moreno E, Barroso-Chinea P, Moreno-Delgado

- D, Cortés A, Mallol J, et al. Cannabinoid receptors CB1 and CB2 form functional heteromers in brain. *J Biol Chem* 2012; 287 (25): 20851-65.
10. Juan-Picó P, Fuentes E, Bermúdez-Silva FJ, Javier Díaz-Molina F, Ripoll C, Rodríguez de Fonseca F, et al. Cannabinoid receptors regulate Ca²⁺ signals and insulin secretion in pancreatic beta-cell. *Cell Calcium* 2006; 39 (2): 155-62.
 11. Bátkai S, Osei-Hyiaman D, Pan H, El-Assal O, Rajesh M, Mukhopadhyay P, et al. Cannabinoid-2 receptor mediates protection against hepatic ischemia/reperfusion injury. *FASEB J* 2007; 21 (8): 1788-800.
 12. Mukhopadhyay B, Liu J, Osei-Hyiaman D, Godlewski G, Mukhopadhyay P, Wang L, et al. Transcriptional regulation of cannabinoid receptor-1 expression in the liver by retinoic acid acting via retinoic acid receptor-gamma. *J Biol Chem* 2010; 285 (25): 19002-11.
 13. Jeong WI, Osei-Hyiaman D, Park O, Liu J, Bátkai S, Mukhopadhyay P, et al. Paracrine activation of hepatic CB1 receptors by stellate cell-derived endocannabinoids mediates alcoholic fatty liver. *Cell Metab* 2008; 7 (3): 227-35.
 14. Mallat A, Teixeira-Clerc F, Deveaux V, Manin S, Lotersztajn S. The endocannabinoid system as a key mediator during liver diseases: new insights and therapeutic openings. *Br J Pharmacol* 2011; 163 (7): 1432-40.
 15. Cortez-Pinto H, de Moura MC, Day CP. Non-alcoholic steatohepatitis: from cell biology to clinical practice. *J Hepatol* 2006; 44 (1): 197-208.
 16. Ong JP, Younossi ZM. Epidemiology and natural history of NAFLD and NASH. *Clin Liver Dis* 2007; 11 (1): 1-16.
 17. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 2010; 52 (5): 1836-46.
 18. Osei-Hyiaman D, DePettrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Bátkai S, et al. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest* 2005; 115: 1298-305.
 19. Gary-Bobo M, Elachouri G, Gallas JF, Janiak P, Marini P, Ravinet-Trillou C, et al. Rimonabant reduces obesity-associated hepatic steatosis and features of metabolic syndrome in obese Zucker fa/fa rats. *Hepatology* 2007; 46 (1): 122-9.
 20. Osei-Hyiaman D, Liu J, Zhou L, Godlewski G, Harvey-White J, Jeong W, et al. Hepatic CB1 receptor is required for development of diet-induced steatosis, dyslipidemia, and insulin and leptin resistance in mice. *J Clin Invest* 2008; 118: 3160-9.
 21. Tam J, Vemuri VK, Liu J, Bátkai S, Mukhopadhyay B, Godlewski G, et al. Peripheral CB1 cannabinoid receptor blockade improves cardiometabolic risk in mouse models of obesity. *J Clin Invest* 2010; 120 (8): 2953-66.
 22. Méndez-Sánchez N, Zamora-Valdés D, Pichardo-Bahena R, Barredo-Prieto B, Ponciano-Rodríguez G, Bermejo-Martínez L, et al. Endocannabinoid receptor CB2 in nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2007; 27 (2): 215-9.
 23. Deveaux V, Cadoudal T, Ichigotani Y, Teixeira-Clerc F, Louvet A, Manin S, et al. Cannabinoid CB2 receptor potentiates obesity-associated inflammation, insulin resistance and hepatic steatosis. *PLoS One* 2009; 4 (6): e5844.
 24. Begg M, Pacher P, Bátkai S, Osei-Hyiaman D, Offertáler L, Mo FM, et al. Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacol Ther* 2005; 106 (2): 133-45.
 25. You M, Matsumoto M, Pacold CM, Cho WK, Crabb DW. The role of AMP-activated protein kinase in the action of ethanol in the liver. *Gastroenterology* 2004; 127 (6): 1798-808.
 26. Basavarajappa BS, Saito M, Cooper TB, Hungund BL. Stimulation of cannabinoid receptor agonist 2-arachidonylglycerol by chronic ethanol and its modulation by specific neuromodulators in cerebellar granule neurons. *Biochim Biophys Acta* 2000; 15: 1535 (1): 78-86.
 27. Muñoz-Luque J, Ros J, Fernández-Varo G, Tugues S, Morales-Ruiz M, Alvarez CE, et al. Regression of fibrosis after chronic stimulation of cannabinoid CB2 receptor in cirrhotic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 324 (2): 475-83.
 28. Teixeira-Clerc F, Belot MP, Manin S, Deveaux V, Cadoudal T, Chobert MN, et al. Beneficial paracrine effects of cannabinoid receptor 2 on liver injury and regeneration. *Hepatology* 2010; 52 (3): 1046-59.
 29. Aram G, Potter JJ, Liu X, Torbenson MS, Mezey E. Lack of inducible nitric oxide synthase leads to increased hepatic apoptosis and decreased fibrosis in mice after chronic carbon tetrachloride administration. *Hepatology* 2008; 47 (6): 2051-8.
 30. Louvet A, Teixeira-Clerc F, Chobert MN, Deveaux V, Pavoine C, Zimmer A, et al. Cannabinoid CB2 receptors protects against alcoholic liver disease by regulating Kupffer cell polarization in mice. *Hepatology* 2011; 54 (4): 1217-26.
 31. Engeli S, Böhnke J, Feldpausch M, Gorzelnik K, Janke J, Bátkai S, et al. Activation of the peripheral endocannabinoid system in human obesity. *Diabetes* 2005; 54: 2838-43.
 32. Côté M, Matías I, Lemieux I, Petrosino S, Alméras N, Després JP, et al. Circulating endocannabinoid levels, abdominal adiposity and related cardiometabolic risk factors in obese men. *Int J Obes (Lond)* 2007; 31: 692-9.

33. Westerbacka J, Kotronen A, Fielding BA, Wahren J, Hodson L, Perttälä J, et al. Splanchnic balance of free fatty acids, endocannabinoids, and lipids in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2010; 139 (6): 1961-71.
34. Liu J, Zhou L, Xiong K, Godlewski G, Mukhopadhyay B, Tam J, et al. Hepatic cannabinoid receptor-1 mediates diet-induced insulin resistance via inhibition of insulin signaling and clearance in mice. *Gastroenterology*. 2012; 142 (5): 1218-28.
35. Hézode C, Zafrani ES, Roudot-Thoraval F, Costentin C, Hessami A, Bouvier-Alias M, et al. Daily cannabis use: a novel risk factor of steatosis severity in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2008; 134 (2): 432-9.
36. Van der Poorten D, Shahidi M, Tay E, Sessa J, Tran K, McLeod D, et al. Hepatitis C virus induces the cannabinoid receptor 1. *PLoS One* 2010; 5(9).
37. Van Gaal LE, Pi-Sunyer X, Despre's JP, Mc Carthy C, Scheen AJ. Efficacy and safety of rimonabant for improvement of multiple cardiometabolic risk factors in overweight/obese patients: pooled 1-year data from the RIO program. *Diabetes Care* 2008; 31 (Suppl 2): S229-40.
38. Després JP, Golay A, Sjöström L. Rimonabant in Obesity-Lipids Study Group. Effects on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. *N Engl J Med* 2005; 353: 2121-34.
39. Kunos G, Osei-Hyiaman D, Bátkai S, Sharkey KA, Makriyannis A. Should peripheral CB(1) cannabinoid receptors be selectively targeted for therapeutic gain? *Trends Pharmacol Sci* 2009; 30: 1-7.
40. Valenzuela CA, Castillo VA, Aguirre CA, Ronco AM, Llanos MN. The CB₁ receptor antagonist SR141716A reverses adult male mice overweight and metabolic alterations induced by early stress. *Obesity (Silver Spring)* 2011; 19 (1): 29-35.
41. Christensen R, Kristensen PK, Bartels EM, Bliddal H, Astrup A. Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2007; 370 (9600): 1706-13.
42. Malcher-Lopes R, Di S, Marcheselli VS, Weng FJ, Stuart CT, Bazan NG, et al. Opposing crosstalk between leptin and glucocorticoids rapidly modulates synaptic excitation via endocannabinoid release. *J Neurosci* 2006; 26: 6643-50.
43. Malcher-Lopes R, Franco A, Tasker JG. Glucocorticoids shift arachidonic acid metabolism toward endocannabinoid synthesis: a non-genomic anti-inflammatory switch. *Eur J Pharmacol* 2008; 583: 322-39.
44. Di S, Malcher-Lopes R, Halmos KC, Tasker JG. Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *J Neurosci* 2003; 23 (12): 4850-7.
45. Jones D. End of the line for cannabinoid receptor 1 as an anti-obesity target? *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7: 961-2.
46. Tam J, Cinar R, Liu J, Godlewski G, Wesley D, Jourdan T, et al. Peripheral cannabinoid-1 receptor inverse agonism reduces obesity by reversing leptin resistance. *Cell Metab* 2012; 16 (2): 167-79.
47. Tam J, Vemuri VK, Liu J, Bátkai S, Mukhopadhyay B, Godlewski G, et al. Peripheral CB1 cannabinoid receptor blockade improves cardiometabolic risk in mouse models of obesity. *J Clin Invest* 2010; 120 (8): 2953-66.