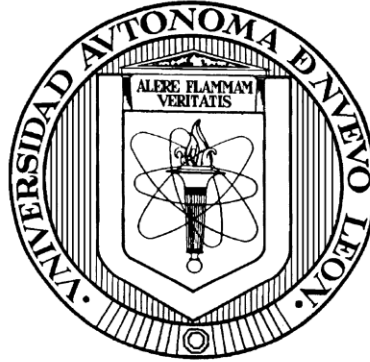


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
POSGRADO CONJUNTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



“Efecto de cannabinoides y su nanoencapsulamiento en el proceso inflamatorio de un modelo murino de colitis”

POR

KEVIN ANTONIO CÁRDENAS NORIEGA

Como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIA ANIMAL

General Escobedo, N.L., 06 de Noviembre de 2025

“Efecto de cannabinoides y su nanoencapsulamiento en el proceso inflamatorio de un modelo murino de colitis”

Aprobación de tesis por el comité particular de

Kevin Antonio Cárdenas Noriega

COMITÉ DE TESIS

Dr. Uziel Castillo Velázquez

Presidente

Dr. Adolfo Soto Domínguez

Secretario

PhD. Luis Edgar Rodríguez Tovar.

Vocal

Dr. Moises Armides Franco Molina

Vocal

Dra. Diana Ginette Zárate Triviño

Vocal

Dr. Abelardo Chávez Montes

Vocal

“Efecto de cannabinoides y su nanoencapsulamiento en el proceso inflamatorio de un modelo murino de colitis”

Aprobación de tesis por el comité particular de

Kevin Antonio Cárdenas Noriega

COMITÉ DE TESIS



Uziel Castillo Velázquez
Director



Adolfo Soto Domínguez
Director o Codirector Externo



Luis Edgar Rodríguez Tovar,
Director o Codirector Externo



Moises Armides Franco Molina
Director o Codirector Externo



Dra. Diana Ginette Zarate Triviño
Directora o Codirectora Externa



Abelardo Chávez Montes
Director o Codirector Externo



Uziel Castillo Velázquez
Subdirector de Posgrado e Investigación

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto, para que pueda obtener el grado de Doctor en Ciencias.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y a la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León por permitirme ser parte de su programa de posgrado, a la Facultad de Ciencias Biológicas por su inmenso apoyo y a la Facultad de Medicina por su invaluable aporte.

A mi director de tesis: Dr. Uziel Castillo Velázquez. No podría agregar más de lo que ya le he dicho en persona sobre lo agradecido que estoy y siempre estaré con usted.

A mis asesores de tesis: gracias por esta increíble jornada. Siempre la recordaré como una etapa muy importante en mi formación profesional y personal.

Shout-out al LIV por toda su ayuda y su calidez desde mi llegada hasta mi partida. Dra. Diana Zarate y Jenny Nanobossmang, por su ayuda y amistad siempre estaré agradecido. Al Dr. Moisés Franco que sin su consejo jamás habría conocido el LIV. Así como para el resto del LIV, pero son demasiados para nombrarlos a todos y se cobran caro estas impresiones. También agradezco a mi parce Leonardo Tafur y a Helene Correa por compartir la locura conmigo. Para nosotros las locomotoras son normalmotoras.

A mis colegas y amigos del Laboratorio de Inmunología Veterinaria. La Dra. Jennifer Analí por aguantarme y siempre estar dispuesta a apoyarnos (regañarme). A todos los practicantes que estuvieron apoyándome, especialmente a Dany Szyslak y Anibal Herrera por estar bien chistosos y por su apoyo. A mi colega y roommate, Jonathan Perales, su apoyo y por ayudarme a tocar tierra y despegarme de ella también. Finalmente, a Kibsaim, que todavía no estoy seguro cuál era su rol en el laboratorio, pero se veía muy profesional en ello; y a Edgar por su enorme apoyo en el laboratorio. Los tqm mucho a todos.

DEDICATORIA

A mí mismo:

Por tenerme la paciencia y la dedicación para seguir adelante.

A mi familia:

Por el apoyo incondicional en todo momento de este proceso.

A mis amistades:

A las personas que estuvieron y a las personas que siguen aquí les doy una parte de mi corazón.

A mi director de tesis:

En lo bueno y en lo no tan bueno siempre me mostró su apoyo. Dr. Uziel mostró no solo ser un muy buen director de tesis, sino también un buen amigo.

A mis asesores:

Agradezco enormemente todo su apoyo, no limitándome a su apoyo en el trabajo sino fuera de este también.

A todas esas personas efímeras:

A todo aquél que alguna vez me sacó una sonrisa, me invitó una cheve, me escuchó o me ofreció su apoyo de cualquier forma.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS.....	IX
ÍNDICE DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	X
ABSTRACT.....	XI
RESUMEN.....	XII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. CANNABIS Y CANNABINOIDES	3
2.1.1. <i>La planta de cannabis (Cannabis sativa L.)</i>	3
2.1.2. <i>Fitocannabinoides</i>	5
2.2. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL	7
2.2.1. <i>Epidemiología</i>	9
2.2.2. <i>Factores de riesgo</i>	10
2.2.3. <i>Patofisiología</i>	10
2.2.4. <i>Diagnóstico</i>	11
2.2.5. <i>Tratamientos</i>	12
2.3. NANOTECNOLOGÍA Y SISTEMAS DE NANOENTREGA	13
3. JUSTIFICACIÓN.....	21
4. HIPOTESIS.....	22
5. OBJETIVO GENERAL	22
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS	23
6.1. DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE SISTEMAS DE NANOENTREGA	23
6.1.1. <i>Síntesis de nanopartículas de oro</i>	23
6.1.2. <i>Síntesis de nanopartículas de zeína</i>	23
6.1.3. <i>Síntesis del nanocomplejo híbrido metálico-polimérico</i>	24
6.1.4. <i>Síntesis de nanopartículas con polímero Eudragit L-100</i>	24
6.1.5. <i>Síntesis de nanopartículas con polímero PLGA</i>	25
6.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS SISTEMAS DE NANOENTREGA Y EFECTO <i>IN VITRO</i>	25
6.2.1. <i>Barrido y curva de calibración</i>	26
6.3. CULTIVO CELULAR Y ENSAYO DE VIABILIDAD	26
6.4. EFECTO DE LOS CANNABINOIDES Y LOS SISTEMAS DE NANOENTREGA <i>IN VITRO</i>	27
6.5. EFECTO DE LOS CANNABINOIDES Y UN SISTEMA DE NANOENTREGA EN UN MODELO <i>IN VITRO</i> DE COLITIS.....	27
6.6. MODELO <i>IN VIVO</i> DE EII	28

6.6.1.	<i>Estandarización del modelo de colitis inducida por ácido trinitro-benceno-sulfónico</i>	28
6.6.1.1.	Modelo Animal.....	28
6.6.1.2.	Inducción de colitis	28
6.6.1.3.	Modelo experimental.	29
6.6.1.4.	Eutanasia y colecta de muestras	30
7.	RESULTADOS	31
7.1.	CARACTERÍSTICAS DE LOS SISTEMAS DE NANOENTREGA.....	31
7.1.1.	<i>Resonancia del plasmón de superficie y enlaces químicos de AuNPs.....</i>	<i>31</i>
7.1.2.	<i>Tamaño, índice de polidispersidad (PDI) y eficiencia de encapsulación/atrapamiento (EE)</i>	<i>33</i>
7.2.	EFFECTO DE LOS CANNABINOIDES Y SISTEMAS DE NANOENTREGA SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR.....	34
7.3.	MODELO MURINO DE COLITIS INDUCIDO POR ÁCIDO TRINITROBENCENOSULFÓNICO Y EFECTO DE LOS CANNABINOIDES Y LOS SISTEMAS DE NANOENTREGA.....	38
7.3.1.	<i>Análisis histológico de colon</i>	<i>38</i>
7.3.2.	<i>Análisis de expresión de ARNm de tejido colónico.....</i>	<i>45</i>
8.	DISCUSIÓN	49
9.	CONCLUSIONES	54
10.	PERSPECTIVAS	54
11.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: La planta de cannabis: aspectos botánicos.	4
Figura 2: Fotografías microscópicas de los tricomas de <i>C. sativa</i>.	5
Figura 3: Tendencias de la incidencia de EII en el mundo.	8
Figura 4: Mecanismo de EII.	9
Figura 5: Manejo de los animales de laboratorio.	29
Figura 6: Presencia de la resonancia del plasmón de superficie de AuNPs por medio de espectrofotometría UV-vis.	31
Figura 7: Enlaces químicos presentes en las nanopartículas de oro (AuNPs) en comparativa con los cannabinoides (CBD:CBG).	32
Figura 8: Estructura química de los cannabinoides.	33
Figura 9: Efecto del cannabidiol (CBD) y cannabigerol (CBG) solos y en combinación en la viabilidad de células Caco-2.	34
Figura 10: Efecto de los sistemas de nanoentrega de cannabinoides en la viabilidad de células Caco-2.	36
Figura 11: Efecto del sistema EuNPs de cannabinoides (CBD:CBG) en células Caco-2 estimuladas con TNBS durante 24 y 48 horas en la viabilidad celular.	37
Figura 12: Cambios morfológicos en porciones proximal, medial y distal de colon de ratones BALB/c con colitis inducida por TNBS.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 13: Cambios morfológicos en colon de ratones BALB/c sanos (Grupo WT) y como modelo murino de colitis inducida por TNBS. ...	¡Error! Marcador no definido.
Figura 14: Cambios morfológicos en secciones de colon de ratones BALB/c como modelo murino de colitis inducida por TNBS bajo efecto de los diferentes tratamientos.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 15: Efecto de los cannabinoides y EuNPs en la expresión de ARNm de A) IL4 y B) TNFα en colon de un modelo de colitis inducido por TNBS.	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Ventajas y desventajas de tecnologías nano-basadas para cannabinoides.	16
Tabla 2: Tratamientos experimentales.....	29
Tabla 3: Características de nanopartículas.....	33
Tabla 4: IC50 de los cannabinoides en líneas celulares Caco-2 a las 24h.....	35
Tabla 5: IC50 de los sistemas de nanoentrega de cannabinoides.	37

ÍNDICE DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ADNc	Ácido Desoxirribonucleico complementario
ALT	Alanina Aminotransferasa
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
AST	Aspartato Aminotransferasa
Au	Oro
CB	Cannabinoide
CBC	Cannabicromeno
CBD	Cannabidiol
CBDV	Cannabidivarina
CBG	Cannabigerol
CBR	Receptor Cannabinoide
CCR	Cáncer Colorrectal
CU	Colitis Ulcerativa
DLS	Dispersión de Luz Dinámica
DNBS	Ácido Dinitrobenenosulfónico
DSS	Sulfato de Sodio de Dextrano
EC	Enfermedad de Crohn
eCBoma	Endocannabinoidoma
EE	Eficiencia de Encapsulación
EII	Enfermedad Inflamatoria Intestinal
Eu	Eudragit L100
FAAH	Ácido Graso Amida Hidrolasa
FTIR	Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier
GPCR	Receptor Acoplado a Proteína G
H&E	Hematoxilina y Eosina
IL	Interleucina
MPO	Mieloperoxidasa
MTT	Metil Tiazol Tetrazolio
NO	Óxido Nítrico
NP	Nanopartícula
PAS	Ácido Peryódico de Schiff
PDI	Índice de Polidispersidad
PLGA	Ácido Poliláctico co-Glicolítico
PPAR	Receptor Activado por Proliferador del Peroxisoma
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
SEC	Sistema Endocannabinoide
SNE	Sistema Nervioso Entérico
THC	Tetrahidrocannabinol
TNBS	Ácido Trinitrobenenosulfónico
TNF α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
TRP	Receptor de Potencial Transitorio
Ze	Zeína

ABSTRACT

Cannabinoids, derived from the cannabis plant (*Cannabis sativa* L.), exhibit significant potential for various ailments, including inflammatory processes associated with inflammatory bowel diseases and their consequences, such as colorectal cancer. The search for therapeutic alternatives rooted in herbal medicine, like cannabis-derived compounds, has garnered attention for their medicinal properties and relatively low toxicity profile compared to conventional pharmacotherapies. However, cannabinoids possess physicochemical qualities that present challenges for their therapeutic administration, including being highly lipophilic molecules insoluble in aqueous media, leading to variable therapeutic outcomes. Nanotechnology applied to cannabinoid therapies offers promising avenues to address these limitations. This study aimed to evaluate the effect of nanoformulated delivery systems for cannabidiol (CBD) and cannabigerol (CBG), as well as their soluble forms, on *in vitro* and *in vivo* models of colitis induced by trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS), using an intestinal cell line and the colons of BALB/c mice, respectively. The results demonstrated the feasibility of developing different nanoformulated delivery systems for cannabinoids, their ability to modulate mitochondrial-dependent cellular metabolism, and the potential protective effect of nanoformulated cannabinoids based on Eudragit L-100, and their soluble form, against TNBS-induced damage.

RESUMEN

Los cannabinoides, derivados de la planta de cannabis (*Cannabis sativa* L.), exhiben un potencial significativo para varias enfermedades, incluyendo procesos asociados con las enfermedades inflamatorias intestinales y sus consecuencias, como el cáncer colorrectal. La búsqueda de alternativas terapéuticas arraigadas en medicina herbal, como son los compuestos derivados del cannabis, ha llamado la atención por sus propiedades medicinales y su perfil de toxicidad relativamente bajo en comparación con las farmacoterapias convencionales. Sin embargo, los cannabinoides poseen cualidades fisicoquímicas que presentan desafíos para su administración terapéutica, incluyendo ser moléculas altamente lipofílicas insolubles en medios acuosos, lo que conlleva a resultados terapéuticos variables. La nanotecnología aplicada a las terapias con cannabinoides ofrece vías prometedoras para abordar estas limitaciones. Este estudio tiene como objetivo evaluar el efecto de sistemas nanoformulados para la entrega de cannabidiol y cannabigerol, así como sus formas solubles, sobre modelos *in vitro* e *in vivo* de colitis inducida por ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS), en una línea celular intestinal y en colon de ratones BALB/c, respectivamente. Los resultados demostraron la factibilidad de la elaboración de diferentes sistemas de entrega nanoformulados para cannabinoides, su capacidad para modificar el efecto de los cannabinoides sobre el metabolismo celular dependiente de mitocondria, así como un potencial efecto protector de los cannabinoides nanoformulados con Eudragit L-100 y solubles sobre contra el daño causado por TNBS.

1. INTRODUCCIÓN

La planta de marihuana (*Cannabis sativa* L.), una de las plantas más antiguas cultivadas por el ser humano, le ha proporcionado herramientas para su desarrollo a lo largo de la historia. Sus propiedades medicinales han sido conocidas y utilizadas por distintas culturas desde hace milenios. En la actualidad, sus principales compuestos activos, los fitocannabinoides, se asocian con efectos terapéuticos para una amplia gama de enfermedades que afectan tanto a humanos como a animales. Los fitocannabinoides (fCBs), junto con otros compuestos derivados de la planta, tienen la capacidad de interactuar con la compleja red de señalización celular denominada recientemente como endocannabinoidoma (eCBoma). Estudios recientes señalan el potencial de compuestos como el cannabidiol (CBD) y el cannabigerol (CBG) para modular los efectos de las enfermedades inflamatorias intestinales (EII). Estas patologías comprenden un grupo heterogéneo de enfermedades de etiología incierta, que comparten características en común y se manifiestan a través de episodios de inflamación localizada, pero no limitada, en el tracto gastrointestinal. Actualmente no existe una solución definitiva para las manifestaciones de la enfermedad, y los tratamientos farmacológicos disponibles logran mitigar eficazmente sus efectos a largo plazo, además de producir notables efectos secundarios que impactan negativamente la salud. Ante esta problemática, la búsqueda de alternativas terapéuticas más seguras y eficaces han puesto un foco de atención a la medicina herbal, particularmente en forma de extractos naturales de plantas como *Cannabis sativa*. En este contexto, los efectos anticolitis de la planta de cannabis le otorgan un lugar destacable como una posible opción terapéutica para mejorar la salud de quienes padecen estas condiciones. Sin embargo, las limitaciones fisicoquímicas de los cannabinoides, que son compuestos altamente lipofílicos, requieren la reformulación para mejorar su efectividad terapéutica. La aplicación de nanoformulaciones para la entrega de cannabinoides representa una estrategia prometedora para superar estas limitaciones. Investigaciones recientes sugieren que el uso de sistemas de nanoentrega, particularmente cargados con cannabinoides, puede contribuir a reducir los efectos negativos de la colitis.

En el presente trabajo aborda tres pilares fundamentales: 1) las enfermedades inflamatorias intestinales, como un problema de salud que requiere de investigaciones en

torno a alternativas terapéuticas seguras basadas en productos naturales, como los fitocannabinoides; 2) el potencial terapéutico de los fitocannabinoides, que podrían mitigar los procesos inflamatorios en la colitis; y 3) la aplicación de la nanotecnología, en forma de sistemas de nanoentrega, para la carga y administración de cannabinoides, contribuyendo a superar las limitaciones fisicoquímicas de presentan. Siguiendo este hilo conceptual, en este trabajo se hipotetiza que la administración de los cannabinoides cannabidiol y cannabigerol, tanto en su forma libre como nanoformulada, podría contrarrestar el proceso inflamatorio intestinal en un modelo murino de colitis. Para abordar esta hipótesis se llevaron a cabo tres fases experimentales: Iniciando con el diseño y la caracterización de múltiples sistemas de nanoentrega de cannabinoides. Prosiguiendo con la evaluación de sus efectos *in vitro* en una línea celular intestinal sana, expuesta a un agente inductor de colitis. Finalmente, la evaluación comparativa de la eficacia de un sistema de nanoentrega y los cannabinoides libres en aspectos de la inflamación en un modelo murino de colitis.

2. ANTECEDENTES

2.1. Cannabis y cannabinoides

2.1.1. *La planta de cannabis (Cannabis sativa L.)*

La planta de cannabis, o marihuana, (*Cannabis sativa* L.) ha tenido presencia junto al ser humano durante milenios. Dos lugares parecen ser la cuna de los orígenes de la planta: las laderas de los Himalayas y las llanuras de Pamir y se cree que fue la primera planta domesticada por la humanidad. La evidencia más antigua de su cultivo data de una soga de cáñamo en 26,000 a.C en la Republica Checa (Hourfane et al., 2023). Otro hallazgo más reciente la sitúa alrededor de 10,000 años atrás en China, de acuerdo con evidencia arqueológica, en donde se utilizaba para obtención de alimento y fibras. Evidencia de su uso como elemento medicinal o alimenticio se ha encontrado presente en civilizaciones antiguas como Egipto, en momias; por los antiguos griegos y los escitas. Entre un gran número de otras civilizaciones. Sus propiedades psicoactivas no se conocían aún en el mundo occidental, sus principales usos eran para la obtención de fibras y alimento. Fue hasta 1840 cuando se introdujo su uso medicinal en Europa. Su popularidad aumentó considerablemente en Europa y Estados Unidos, encontrándose en formulaciones medicinales diversas como calambres menstruales, asma, insomnio, como apoyo en la labor de parto, migrañas, infecciones de garganta y abstinencia del uso de opio. (Klumpers & Thacker, 2019) La planta para sus diversos usos hizo su primera aparición en el continente Americano a través de Chile, en 1545; y Canadá, en 1606 (ElSohly et al., 2017). Su adaptabilidad a diferentes climas la ha llevado a una distribución mundial. Los registros históricos revelan que la planta ha sido utilizada como fuente de fibra, alimento, aceites, elemento recreativo, religioso, alimento para ganado y para el cuidado de piel y cabello. Además de su uso como elemento medicinal, en donde se ha destacado su uso terapéutico para el tratamiento de dolor crónico, depresión e inflamación (Hourfane et al., 2023).

Su clasificación taxonómica aún es tema de debate. Desacuerdos entorno a qué tipo de clasificación aún persisten, debido a que se puede clasificar por su taxonomía botánica, quimiotaxonomía, taxonomía vernacular y recientemente, secuenciación genética (Klumpers & Thacker, 2019). Actualmente se acepta su clasificación como *Cannabis sativa* con una abundante presencia de cultivares, o comúnmente denominados como sepas

(Klumpers & Thacker, 2019) (Farang & Kayser, 2017). Su rica diversidad fenotípica es el resultado de la selección y cruce que ha sufrido por cientos de años (Farang & Kayser, 2017).

Dentro de sus características botánicas más importantes cabe destacar que la planta es anual, dioica y floreciente, que presenta dimorfismo sexual entre machos y hembras (Figura 1). La planta hembra es de importancia debido a que en sus flores se encuentran microestructuras denominadas tricomas glandulares (Figura 2) carentes en la planta macho, los cuales poseen concentraciones significativas de cannabinoides y otros compuestos de importancia biológica (Farang & Kayser, 2017).

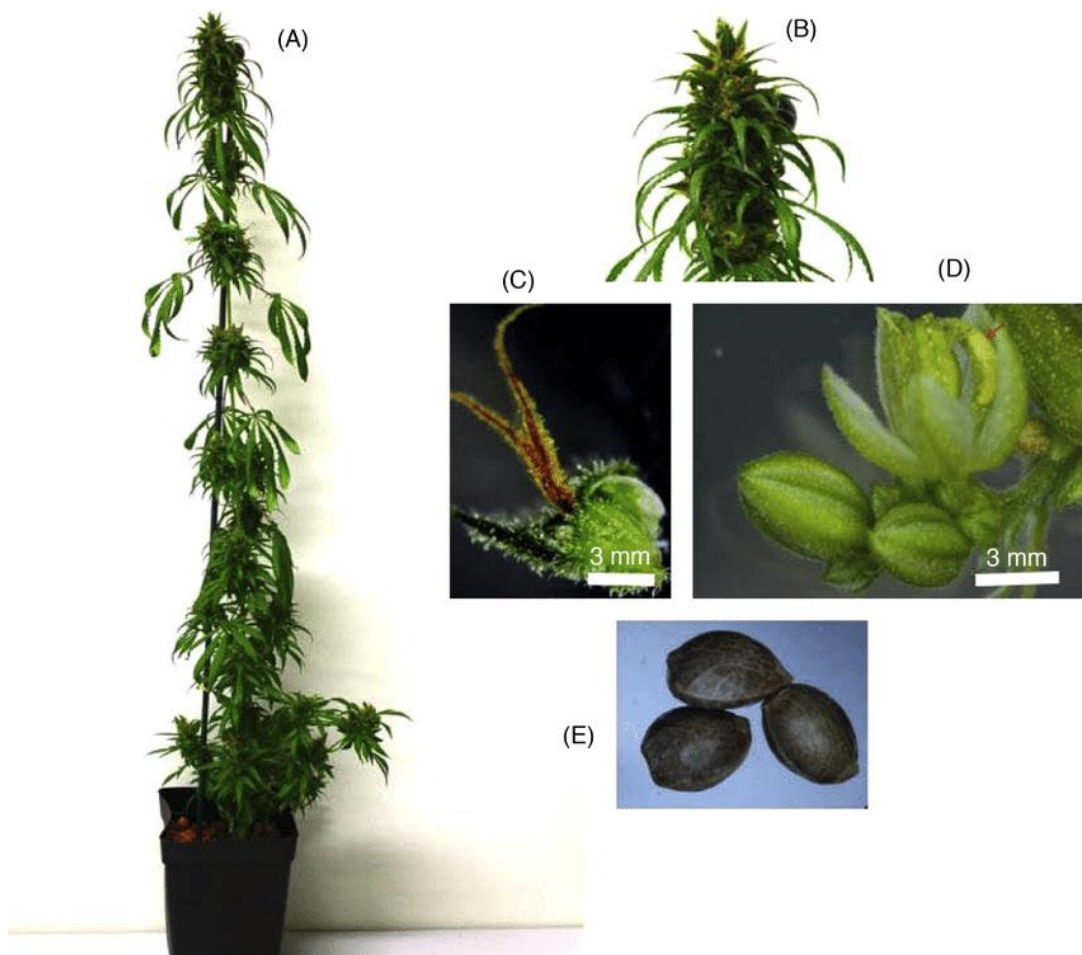


Figura 1: La planta de cannabis: aspectos botánicos.

(A) Hembra *C. sativa*; (B) Porción de las flores femeninas; (C) Flor femenina pistilada (estigmas, estilo, bráctea perigonal y estípula); (D) Porción de las flores masculinas que muestran anteras; (E) Semillas maduras. Obtenido de (Farang & Kayser, 2017).

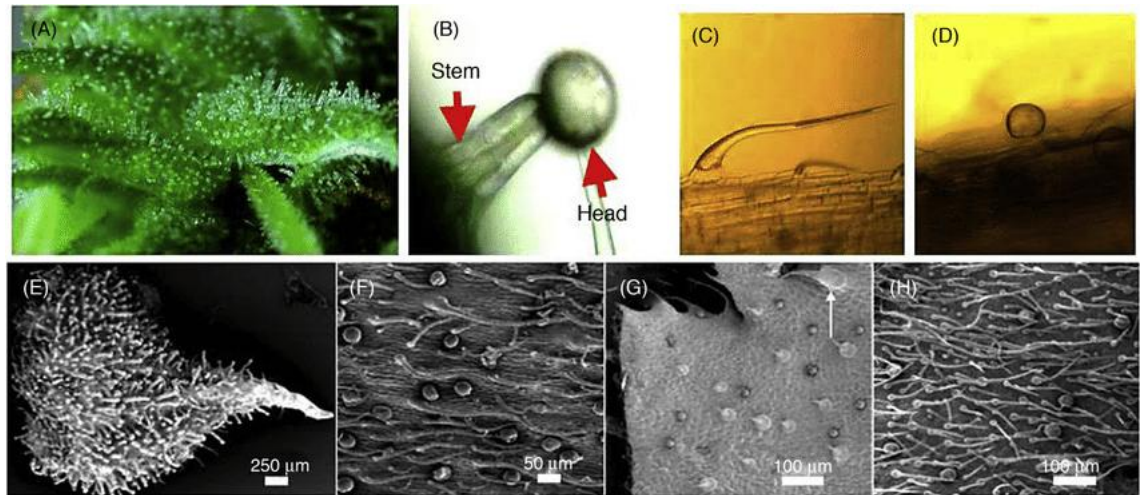


Figura 2: Fotografías microscópicas de los tricomas de *C. sativa*.

(A) Tricomas en las flores; (B) tricoma capitado entallado; (C) tricoma capitado sésil; (D) tricoma bulboso; (E) tricomas en la bráctea; (F) tricomas en el tallo; (G) tricomas en la superficie adaxial de una hoja floral. La flecha indica un tricoma capitado sésil; (H) tricomas en la superficie abaxial de una hoja. Presencia abundante de tricomas capitados sésiles pequeños y tricomas bulbosos. Obtenido de (Farg & Kayser, 2017).

La planta contiene un gran número de compuestos químicos, alrededor de 550 moléculas. Estos componentes principalmente pertenecen a las clases de los cannabinoides, terpenoides, estilbenos, lignanamidas, carotenoides, flavonoides y alcaloides (Hourfane et al., 2023).

2.1.2. *Fitocannabinoides*

El término fitocannabinoide hace referencia a terpenoides bioactivos que antes se creían exclusivos de la planta *Cannabis sativa*. No obstante, actualmente se han descubierto en otros organismos como plantas y hongos. De forma similar, el término cannabinoides se refiere a moléculas con una estructura química característica, o también como ligandos farmacológicos de receptores de endocannabinoides humanos (Gülck & Møller, 2020). Se ha acumulado evidencia sobre el uso, eficacia y seguridad de los fitocannabinoides en diversos padecimientos como náuseas y vómito, insomnio, ansiedad, pérdida de apetito, dolor neuropático y crónico, desórdenes psiquiátricos, epilepsia (Klumpers & Thacker, 2019) y se ha señalado su actividad antiparasitaria, antiviral, antiinflamatoria, anticancerígena, neuroprotectora, dermocosmética (Hourfane et al., 2023), desórdenes gastrointestinales (Martínez et al., 2020) entre otros.

Aún con su popularidad creciente y decreciente a nivel mundial, no fue sino hasta 1964, tras el aislamiento del tetrahidrocannabinol (THC) por Gaoni & Mechoulam (Gaoni & Mechoulam, 1964), que comenzaron los esfuerzos científicos para elucidar sus propiedades moleculares y los elementos endógenos humanos y animales con los cuales interactúa. Así fue como comenzaron a descubrirse los primeros componentes de un sistema ampliamente estudiado actualmente y cuya modulación presenta una interesante propuesta terapéutica, el Sistema Endocannabinoide o, como se le ha nombrado más recientemente al conjunto de éste y otros mediadores moleculares de los cannabinoides, la Endocannabinoidoma (eCBoma).

El tetrahidrocannabinol (THC), el principal ingrediente psicoactivo de la planta de marihuana, es el principal componente del uso de la marihuana como droga ilícita debido a sus efectos intoxicantes (Kicman & Toczec, 2020). Por otra parte se ha enfocado el interés a cannabinoides “no psicoactivos” como el cannabidiol (CBD), cannabigerol (CBG), cannabicromeno (CBC) y cannabidivarin (CBDV) por sus falta de estos efectos (Martínez et al., 2020). Cabe destacar que hay una tendencia de denominar a cannabinoides como el CBD como “no intoxicantes” debido a que podrían modular los síntomas de ciertos desórdenes neuropsiquiátricos por lo que el término “no psicoactivo” no concuerda del todo (Kicman & Toczec, 2020). Particularmente el cannabidiol y el cannabigerol han mostrado tener potencial terapéutico debido a su baja toxicidad y que no producen efectos psicomiméticos como el THC (Brierley et al., 2016; Iffland & Grotenhermen, 2017; Kicman & Toczec, 2020; Kulpa et al., 2023). Éstos se encuentran en diferentes cantidades en la planta de cannabis y actualmente son sujetos de extensivos estudios por su capacidad de interactuar con numerosos receptores en animales. Los efectos fisiológicos de los cannabinoides están mediados por múltiples mecanismos diana. Entre éstos se encuentran receptores cannabinoides (CBRs), otros receptores acoplados a proteína G, receptores de glicina, 5-HT, PPARs, TRPs, entre otros (Turner et al., 2017). Además de interactuar directamente con receptores, al ser degradado por la enzima FAAH (*fatty acid amide hydrolase*; ácido graso amida hidrolasa), principal enzima que degrada cannabinoides endógenos como la anandamida, el cannabidiol puede inhibir su actividad sobre ésta, estimulando el tono de cannabinoides endógenos y su señalización (Fernández-Ruiz et al., 2015; Toczec & Malinowska, 2018).

Numerosos estudios han descrito el perfil de seguridad del CBD, a dosis variables. Principalmente se ha observado que su administración no afecta adversamente funciones psicológicas o psicomotoras, además de no alterar parámetros fisiológicos como ritmo cardiaco, presión sanguínea y temperatura corporal. En humanos se ha reportado que el uso crónico y a dosis altas de hasta 1500 mg por día han sido muy bien toleradas (Iffland & Grotenhermen, 2017). En un estudio en ratones en donde se buscaba inducir toxicidad aguda y sub-aguda por medio de la administración de cannabidiol a dosis de 0 hasta 2460 mg/kg por la vía oral, se observaron cambios comportamentales a partir de los 600 mg/kg, como letargia, pérdida del apetito y pérdida de peso. Además, cambios bioquímicos en marcadores sanguíneos ALT y AST, así como cambios histomorfológicos en hígado. Finalmente, los autores destacan que dosis tan altas como 2460 mg/kg de cannabidiol no es aplicable en la mayoría de los casos en la vida real y señalan la necesidad de estudios crónicos y sub-crónicos (Ewing et al., 2019).

De la misma forma el cannabigerol ha sido probado en modelos animales a diferentes dosis y se ha evaluado su actividad psicomimética y estimulante del apetito con dosis de hasta 240 mg/kg. El cannabigerol administrado a diferentes dosis por vía oral en ratas pre-saciadas mostró aumentar el apetito de los animales sin efectos perjudiciales en el balance, control motor o fuerza muscular (Brierley et al., 2016). Por su parte, los estudios entorno a la toxicidad del cannabigerol en humanos son más escasos. En un estudio en ratas pre-saciadas, se utilizaron dosis máximas de 240 mg/kg de cannabigerol y se evaluó su actividad psicomimética y estimulante del apetito, y no mostró efectos similares al THC, alteraciones comportamentales o efectos perjudiciales en el balance, control motor o fuerza muscular incluso a dosis de 240 mg/kg (Brierley et al., 2016). Se ha propuesto que la actividad terapéutica de cannabinoides, y otros compuestos naturales, mejora cuando se administran simultáneamente dos o más en la misma formulación. A la interacción entre fitocannabinoides entre sí mismos u otros compuestos, como los terpenos, se le ha denominado efecto séquito. (Namdar et al., 2019).

2.2. Enfermedad Inflamatoria Intestinal

Como se ha mencionado, el cannabidiol y el cannabigerol, entre otros cannabinoides, se han estudiado por su potencial terapéutico en enfermedades de importancia en medicina

humana y medicina veterinaria, tales como enfermedades inflamatorias intestinales y una de sus comunes consecuencias, el cáncer de colorrectal (Grill et al., 2018). La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) representa a un grupo de enfermedades heterogéneas que se presentan como cuadros de inflamación gastrointestinal crónicos y recurrentes cuya exacta etiología y mecanismos patológicos permanecen inciertos (Saez et al., 2023). El término engloba ciertas enteropatías crónicas con características en común que han sido descritas en animales y humanos (Jergens & Simpson, 2012). Principalmente consiste en dos entidades muy bien establecidas pero no completamente discretas y muy relacionadas, la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerativa (CU) (Malik, 2015), descritas inicialmente por Crohn y Wilks, respectivamente, y representan dos etiologías significativas de enfermedades gastrointestinales crónicas con presencia en todo el mundo (Figura 3). Ambas se caracterizan por remisiones y recaídas con interacciones complejas entre genes, estímulos medio ambientales y respuesta inmune (Eltantawy et al., 2023).



Figura 3: Tendencias de la incidencia de EII en el mundo.

Traducido de (Malik, 2015).

Basados en síntomas, localización de la enfermedad y características histopatológicas es que se puede diferenciar a estas dos entidades. La enfermedad de Crohn es transmural, asociada a la formación de granulomas, y se puede manifestar en cualquier

parte del tracto gastrointestinal, desde la boca hasta el ano. Mientras que la colitis ulcerativa afecta áreas superficiales de la mucosa del colon (Saez et al., 2023). La etiología es incierta pero generalmente se acepta que es una enfermedad mediada por una respuesta inmune anormal contra la microbioma en individuos genéticamente susceptibles (Figura 4) (Lu et al., 2022).

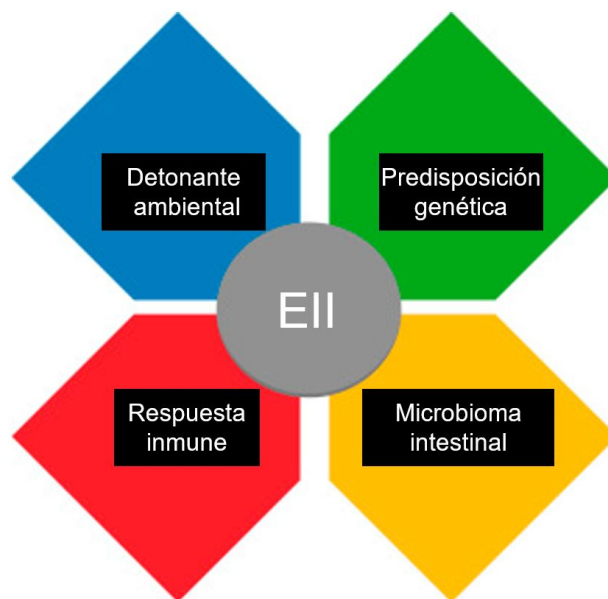


Figura 4: Mecanismo de EII.
Traducido de (Malik, 2015)

2.2.1. Epidemiología

La incidencia anual y prevalencia de EC y CU varía en todo el mundo dependiendo de la región geográfica, medio ambiente, tendencias migratorias y grupos étnicos. En Norte América, por ejemplo, ambas enfermedades se presentan en un estimado de hasta 20 personas por cada 100 mil habitantes. Por su parte, la prevalencia se ha vuelto similar para la enfermedad de Crohn y la Colitis Ulcerativa, con un estimado de 25 a 300 y de 35 a 200 por cada 100 mil habitantes, respectivamente. La mediana de edad estimada a la que se diagnostican en Norteamérica es a los 30 años, con un rango promedio entre los 33 a los

45 años, para la enfermedad de Crohn; y la media y mediana de edad de diagnóstico de la colitis ulcerativa en un rango de los 40 a 45 años (Malik, 2015).

2.2.2. Factores de riesgo

Entre los factores de riesgo se encuentran detonantes ambientales como antígenos, virus, bacterias y componentes de la dieta; autoantígenos, predisposición genética, microbiota intestinal o alteraciones en ésta por antibióticos, dieta, obesidad, medicamentos, infecciones, higiene, estrés entre otros. Fumar es un factor de riesgo para la enfermedad de Crohn pero se ha asociado el dejar de fumar como un factor de riesgo para la colitis ulcerativa, una comorbilidad psiquiátrica, una apendectomía parece ser un factor protector para la CU pero después de un diagnóstico de CU una apendectomía parece empeorar el curso de la enfermedad (Eltantawy et al., 2023; Malik, 2015).

2.2.3. Patofisiología

El sistema inmune intestinal tiene un importante rol en mantener el balance entre sí mismo y el inmenso ecosistema de alrededor de 300 a 500 especies de bacterias que habitan en el intestino. La desregulación del balance que mantiene el sistema inmune intestinal se asocia a la etiología de EII (de Mattos et al., 2015). En una EII ocurren daños en la barrera intestinal. La causa del daño puede ser un agente infeccioso, compuesto químico o alteración metabólica relacionada a disbiosis por dieta, la reacción se perpetúa por una respuesta de resolución deficiente en el proceso inflamatorio y éste se puede ver apoyado por una falla en los mecanismos de tolerancia a microorganismos comensales o a señales propias en el tejido dañado. Aun así, hay incertidumbre si las alteraciones en la barrera epitelial son previas o posteriores al proceso inflamatorio en lámina propia (Saez et al., 2023). En homeostasis, las respuestas inflamatorias, de tolerancia y resolución se encuentran equilibradas por las interacciones y dinámica entre las respuestas Th1, Th17, Th2, Th9 y Treg. El desequilibrio está principalmente asociado a células de la respuesta inmune adaptativa que responden a antígenos propios produciendo inflamación crónica. Además de esto, las alteraciones en los procesos de autofagia y la pérdida de la tolerancia a antígenos propios en la mucosa intestinal determinan la intensidad y duración de la respuesta inflamatoria en la colitis experimental. Hay sistemas que las clasifican en base a su estadio y localización. Sin embargo, realmente hay una gran cantidad de presentaciones

clínicas por lo que aunque los sistemas de clasificación de los fenotipos de EII son ampliamente utilizados, su confiabilidad puede ser limitada (de Mattos et al., 2015). Los signos clínicos pueden ser leves, moderados o severos y limitarse o no, al tracto gastrointestinal. Entre estos se encuentra el dolor en diferentes medidas, diarrea, fiebre, malnutrición, debilidad, fatiga, cambios de peso, heces o diarrea con sangre, hemorragias severas, desórdenes de crecimiento pediátrico, daño a otros órganos como ojos, piel, hígado y articulaciones, aunque estos son más evidentes en la enfermedad de Crohn (Seyedian et al., 2019). Finalmente, estos mismos factores que conllevan al desarrollo de inflamación crónica colorrectal también contribuyen a la ocurrencia de carcinogénesis inducida por inflamación, manifestándose como cáncer colorrectal (CCR) (Shah & Itzkowitz, 2022). Pacientes con EC o CU tienen hasta 25 veces más riesgo de padecer cáncer colorrectal que el resto de la población. Esto puede ocurrir debido a que la EII es una inflamación activa y persistente, la inmunosupresión, enfermedad de larga duración, un diagnóstico a temprana edad, historial familiar de CCR, colangitis esclerosante primaria coexistente, entre otros factores de riesgo (Malik, 2015).

2.2.4. Diagnóstico

El diagnóstico preciso de EII está basado en evidencia clínica, como la endoscópica, pruebas de laboratorio y de imagen. La evaluación por endoscopia actualmente es la prueba de referencia para detectar y medir el grado de inflamación intestinal, aunque resulta costoso e incómodo para el paciente. Otros exámenes menos invasivos pueden servir de apoyo al diagnóstico como colonoscopia, apoyado por exámenes de rutina como examen físico, exámenes de laboratorio, como es el conteo sanguíneo completo, ritmo de sedimentación eritrocítica, proteína C-reactiva, albumina, hierro, ferritina y examen de heces (calprotectina fecal); ultrasonido abdominal, resonancia magnética, exámenes radiológicos y capsula endoscópica (Yamamoto-Furusho et al., 2017).

2.2.5. *Tratamientos*

Dependiendo de los signos, el curso de la enfermedad y el tiempo de detección, ésta puede restituirse o no, si es una enfermedad leve. En caso contrario, sino se detecta y maneja a tiempo puede proseguir a un estadio moderado o de moderado a severo. El principal objetivo del tratamiento y diagnóstico es eliminar o detener los síntomas o el progreso de la enfermedad y mejorar la salud del paciente, así como evitar el tratamiento quirúrgico. Los objetivos del tratamiento médico son: tratamiento clínico y mejoramiento de la condición clínica, reducir los efectos clínicos secundarios, mejorar calidad de vida, reducir la toxicidad por medicamentos, apoyo nutricional y restringir la necesidad del paciente de ser internado o de requerir cirugía (Seyedian et al., 2019). Se suelen dar aminosalicilatos, corticoesteroides o ciclosporinas a individuos con manifestaciones leves, moderadas y severas, respectivamente. Otras estrategias terapéuticas pueden involucrar la manipulación de la microbioma (de Mattos et al., 2015), si los pacientes no responden se les ha tratado con inhibidores de calcineurina, tacrolimus, inhibidores de TNF α o un anticuerpo neutral, entre otros. Estos pueden ser útiles pero generalmente poco efectivos (Seyedian et al., 2019). La terapia convencional no ha logrado reducir la necesidad de intervención quirúrgica. La aproximación para estas enfermedades también logran disminuir la tasa de hospitalización, cirugía e infección, al evitar el uso de esteroides, mejorar la calidad de vida y disminuir el riesgo de cáncer y mortalidad (Malik, 2015). Además, estas terapias no logran la remisión clínica y traen consigo efectos secundarios como inmunosupresión y vulnerabilidad a infecciones, daño a órganos, altos costos o requerimiento de tecnología más avanzada (de Mattos et al., 2015). Se han estudiado algunas plantas que han mostrado eficacia en el tratamiento de EII como baicaleína, berberina, *indigo naturalis*, andrografólido, curcumina, bromeliana, entre otros, con resultados variables e interesantes (Guo et al., 2017).

Evidencia anecdótica señala a la planta de cannabis (*Cannabis sativa* L.) como una alternativa terapéutica para el tratamiento complementario para el alivio sintomático de enfermedades inflamatorias intestinales. No obstante, limitaciones importantes existen para la obtención de evidencia contundente y el desarrollo de terapias efectivas (Carvalho et al., 2020). Algunas de estas limitantes del uso de fitocannabinoides como elementos

medicinales son sus propiedades fisicoquímicas. Como su baja solubilidad en agua y su estabilidad. Los fitocannabinoides pueden degradarse debido a la influencia del calor, la luz y el almacenamiento (Reddy et al., 2023). El CBD es un buen ejemplo de esto, al ser un compuesto altamente lipofílico es difícil de administrar por la vía oral (Kok et al., 2022). Por esta vía presenta baja biodisponibilidad y perfiles farmacocinéticos variables. Debido a que es un compuesto de altamente lipofílico, generalmente se utiliza en formulaciones oleosas o alcohólicas, en capsulas de gel suave, gotas sublinguales o en spray oro-mucoso. Además, su lipofilidad disminuye el ritmo de absorción en tracto gastrointestinal por su precipitación (Grifoni et al., 2022) y tanto el CBD como el THC presentan un excesivo metabolismo de primer paso. Es decir, el metabolismo que sufren antes de llegar al sitio diana. Estas propiedades de los fitocannabinoides son responsables de sus perfiles de absorción pobre, errática y variable. Finalmente, la nanotecnología provee una gama de herramientas importantes para descartar estas limitaciones. La encapsulación de fCBs en nanoportadores, o sistemas de nanoentrega, puede protegerlos de la degradación y mejorar sus cualidades (Reddy et al., 2023).

2.3. Nanotecnología y sistemas de nanoentrega

La nanotecnología es una ciencia multidisciplinaria que engloba a la ciencia de materiales y las tecnologías derivadas de ella que pueden ser aplicadas a la biología, química, física, ingeniería y ciencia de materiales (RC, 2024; D. K. Singh et al., 2023). Esta ha sido redefinida debido a sus amplias y diversas aplicaciones. Sus diferentes definiciones enfatizan que se basa en el desarrollo de materiales altamente ordenados y nanoestructurados que pueden reaccionar de una manera predeterminada ante una serie de estímulos. Los materiales que conforman partículas a nanoescala tienen características únicas debido a su tamaño, que las hacen diferentes a los materiales en volúmenes grandes, esto es debido a características relacionadas a la relación entre su superficie y volumen. Así mismo, implica la creación de partículas, dispositivos y sistemas biológicos a escala nanométrica, que se pueden afinar para interactuar con células y tejidos a nivel molecular. Su aplicabilidad en la medicina se puede orientar a las áreas de diagnóstico y aproximación de enfermedades, tema de gran importancia a nivel mundial (Navalakhe & Nandedkar, 2007). Algunas de las ventajas que ofrece el nanodimensionamiento en la entrega de

fármacos son la disminución de la variabilidad entre la respuesta de los pacientes, aumento de la solubilidad oral, disminución de la dosis requerida y un inicio más rápido de la actividad terapéutica (Bhatia, 2016).

De la nanotecnología aplicada en las ciencias biomédicas surge el concepto de nanomedicina. Actualmente la nanotecnología ha permitido mejoras importantes en áreas como terapia anticáncer, imagenología para el diagnóstico de enfermedades, ingeniería de tejidos, sistemas de entrega de genes y fármacos. Existen numerosos sistemas de nanoentrega con sus respectivas ventajas y aplicaciones, entre los que se encuentran los nanocristales, nanopartículas poliméricas, nanopartículas metálicas, micelas, dendrímeros, nanopartículas de oro, etc. (Farjadian et al., 2019). En el campo de la biomedicina, la nanotecnología se ha aplicado a la medicina herbal. Los medicamentos herbales han ganado relevancia en todo el mundo y han mostrado ser prometedores para mantener y mejorar la salud, así como tratar enfermedades, al ser considerados más seguros y económicos a comparación de medicinas modernas (Dewi et al., 2022). Al compararlos con formulaciones farmacológicas convencionales, la nanotecnología en medicina herbal puede contribuir al control de la cinética de liberación, entrega dirigida, mejoras en solubilidad y permeabilidad, aumento de la estabilidad fisicoquímica y aumento en el tiempo de vida en almacén. El rol y la importancia de los productos naturales en la medicina está avalado por numerosa evidencia científica. Su capacidad de modular múltiples blancos biológicos, vías de señalización y de tener significancia terapéutica, sobre todo en enfermedades multifactoriales y complejas, como el cáncer, ha captado interés. (Vanti, 2021). No obstante, muchos de estos compuestos fitoquímicos tienen limitaciones tales como baja absorción y distribución y baja biodisponibilidad, que resulta en una actividad biológica reducida. El uso de sistemas de liberación basados en nanotecnología puede ayudar a superar algunas de estas limitaciones de la medicina herbal, principalmente sobre su biodisponibilidad y bioactividad (Dewi et al., 2022).

Nuevas posibilidades se han abierto para productos basados en cannabis en cuanto a rutas de administración y sistemas de entrega, debido al aumento en el número de productos cannábicos, así como sus aplicaciones médicas. Estos productos son principalmente destinados a ser administrados por la vía oral y la vía inhalada. Por estas

vías, los cannabinoides pueden ser altamente metabolizados por el hígado, por lo que se han utilizado otras vías como la oromucosa, transdermal y rectal, sin ser ampliamente utilizadas (Lazzarotto Rebelatto et al., 2023). A pesar de sus propiedades medicinales, su eficacia terapéutica en humanos es limitada por sus propiedades fisicoquímicas como su baja solubilidad en agua y estabilidad. El CBD, por ejemplo, está categorizado como una droga Clase II por el Sistema de Clasificación de Biofarmaceúticos, con alta lipofilidad ($\text{LogP}=6,97$) y baja solubilidad en agua (28.9 mg/L). Estas propiedades son responsables de perfiles de absorción pobres, erráticos y variables. Además, en humanos, este cannabinoide presenta excesivo metabolismo de primer paso por enzimas CYP (CYP3A4 y CYP2C19) que contribuyen en gran parte a la pérdida del compuesto que llega a circulación sistémica, hasta en un 75% (Reddy et al., 2023).

Se han desarrollado múltiples sistemas basados en nanotecnología para superar los retos de la administración de cannabinoides. Su encapsulación en sistemas de nanoentrega puede protegerlos de la degradación, así como mejorar sus cualidades físico-químicas, biodisponibilidad, disminuir dosis requeridas y los efectos fuera de sitios diana (Assadpour et al., 2023; Lazzarotto Rebelatto et al., 2023; Reddy et al., 2023; Dasram et al., 2022; Bhatia, 2016). Estas formulaciones se pueden dividir en dos aproximaciones generalmente reportadas: las nanosuspensiones y los nanovectores. Las primeras son soluciones acuosas en donde se dispersan compuestos insolubles en presencia de excipientes adecuados, seguido una reducción de partícula. No obstante, estos métodos no permiten la liberación controlada, la dirección activa o pasiva o la adecuada protección contra la degradación física o química. Por su parte, los nanovectores representan herramientas muy prometedoras, al poseer altos niveles de eficiencia de encapsulación lo que conlleva a un periodo en circulación extendido, tasas de eliminación reducidas, aumento en la estabilidad fisicoquímica, mejoras en la captación celular y optimización del perfil farmacocinético. De acuerdo a su naturaleza, se pueden dividir en poliméricos, que utilizan polímeros sintéticos o naturales degradables o no degradables; basados en lípidos, como nano- y microemulsiones, vesículas, nanoportadores lipídicos sólidos y nanoestructurados; e inorgánicos, que incluyen diversas nanoestructuras como Dots cuánticos, nanotubos de carbón, nanopartículas de oro, magnéticas y de sílice (Grifoni et al., 2022). En la siguiente

tabla se muestran algunos de los sistemas de nanoentrega formulados para la encapsulación de cannabidiol (Tabla 1)

Tabla 1: Ventajas y desventajas de tecnologías nano-basadas para cannabinoides.

Tipo de Nanopartícula		Ventajas	Desventajas
Sistemas coloidales basados en polímeros	Micelas poliméricas	<ul style="list-style-type: none"> -Aumento de la solubilidad de cannabinoides -Liberación controlada de fármaco -Previene los efectos psicotrópicos de los cannabinoides (estas NPs no cruzan la barrera hematoencefálica) -Efecto EPR debido a pequeño tamaño de partícula 	<ul style="list-style-type: none"> -Baja eficiencia de carga del fármaco -Baja estabilidad física in vivo -Dependencia de la concentración crítica micelar
	Nanopartículas poliméricas	<ul style="list-style-type: none"> -Liberación controlada de fármaco (varios días), particularmente interesante en terapias crónicas -Aumento de estabilidad y protección contra degradación al compararlo con entrega de fármacos sitio-específicos basados en sistemas lipídicos -El perfil de liberación de fármaco se puede ajustar dependiendo del tipo de polímero -Los métodos de preparación son versátiles 	<ul style="list-style-type: none"> -Los productos de degradación del polímero pueden ser tóxicos -Los métodos de preparación pueden utilizar solventes orgánicos tóxicos
Sistemas coloidales basados en lípidos	Liposomas	<ul style="list-style-type: none"> -La cantidad de cannabinoide liberado se puede modular por la relación fosfolípido:colesterol en la membrana -Alta biocompatibilidad e interacción con membranas biológicas 	<ul style="list-style-type: none"> -Baja eficiencia de encapsulación a comparación de otras NPs -Baja estabilidad en fluidos biológicos -Rápida distribución en tejidos o vida media baja (No apropiado para liberación sostenida del fármaco) -Los fosfolípidos pueden sufrir oxidación y reacciones similares a la hidrólisis -Altos costos de producción -El método de preparación tradicional utiliza solventes orgánicos -Puede activar una respuesta inmune

Sistemas de entrega auto-nanoemulsificantes	<ul style="list-style-type: none"> -Facilidad de preparación y ampliación -Bajo costo de producción -Proveen alta biodisponibilidad por vía oral -Reducido tamaño de partícula -Reduce el efecto de las sales biliares en la absorción de cannabinoides -Bajo inicio de la acción (Tmax reducida) 	<ul style="list-style-type: none"> -Amplio rango de tamaños de partícula debido a que las nanopartículas se forman in situ -La precipitación del fármaco en fluidos gastrointestinales es más común que en otros sistemas basados en lípidos
Nanoemulsiones	<ul style="list-style-type: none"> -Sistemas más estables que los liposomas -Aumento de solubilidad y biodisponibilidad -Mejora la hidratación cuando se utiliza de manera tópica -Bajo costo de producción -Alta eficiencia de encapsulación para cannabinoides 	<ul style="list-style-type: none"> -Se pueden observar fenómenos de inestabilidad como la coalescencia, oxidación de los aceites o lípidos utilizados en la formulación
Portadores lipídicos nanoestructurados	<ul style="list-style-type: none"> -Facilidad para producción a gran escala utilizando la técnica de homogeneización a alta presión -Las imperfecciones en la matriz lipídica acomodan a los cannabinoides más fácilmente que las nanopartículas lipídicas sólidas, lo que impacta en la eficiencia de encapsulación -Previene que la partícula coalesca debido a la matriz sólida a comparación de las nanoemulsiones 	<ul style="list-style-type: none"> -Estas partículas son más sensibles a cambios en la preparación o en los parámetros de almacenado, lo que puede conllevar a transiciones en la fase lipídica -Aunque estos sistemas son las más estables que las nanopartículas lipídicas sólidas, aún se observan problemas con la estabilidad a largo plazo tras el almacenado
Nanocapsulas lipídicas	<ul style="list-style-type: none"> -El núcleo lipídico aumenta el ritmo de incorporación de los cannabinoides además de que la envoltura polimérica provee estabilidad -Funcionalización de superficie eficiente debido a la presencia de polímero -Se pueden utilizar métodos de baja energía en su preparación sin utilizar una 	

		alta cantidad de surfactante o co-surfactante	
Suspensiones coloidales inorgánicas	Nanotubos de carbono	-Mejora las propiedades mecánicas (alta fuerza de tensión) -Penetra membranas celulares debido a un tamaño de partícula reducido -Propiedades espectroscópicas reducidas (e.g., Raman y fotoluminiscencia) que permiten el rastreo y monitoreo en tiempo real del rendimiento del fármaco	-Producción costosa Baja degradabilidad -Problemas toxicológicos (complicaciones pulmonares)
	Nanopartículas metálicas	-Propiedades ópticas y magnéticas específicas (importante para aplicaciones en cáncer) -Fuerte absorción en plasma -Aplicaciones multimodales -Generalmente se caracterizan por un tamaño y forma uniformes	-Problemas toxicológicos -Impurezas en los procesos de síntesis de estas partículas puede resultar en sistemas inestables (las nanopartículas son altamente reactivas)

Obtenido de (Lazzarotto Rebelatto et al., 2023)

Se ha reportado en modelos *in vitro* e *in vivo* la eficacia de nanoformulaciones con CBD, en donde mejoró su solubilidad y el CBD nanoencapsulado logró disminuir la expresión de marcadores inflamatorios sin signos de toxicidad observables. Así mismo, se evaluó la actividad anticancerígena de nanopartículas cargadas con CBD en líneas celulares ováricas y de cáncer de mama, así como en modelos murinos, en combinación con fármacos antitumorales paclitaxel y doxorubicina, respectivamente, donde se reportaron efectos sinérgicos *in vivo*, lo que permitió la reducción de dosis en los agentes tumorales y por ende sus efectos secundarios (Assadpour et al., 2023).

Dentro de las nanopartículas inorgánicas metálicas, las nanopartículas de oro destacan, debido a sus propiedades fisicoquímicas que las hacen ideales para varias aplicaciones, especialmente en terapia, detección y diagnóstico o entrega de fármacos precisa. En el caso de las nanopartículas de oro su excelente estabilidad y biocompatibilidad, facilidad para funcionalizar sus superficies, la baja toxicidad y transferibilidad de fármacos las hacen ser blancos de interés en biomedicina. Con el

aumento en su popularidad, también surgen cuestionamientos sobre su seguridad, dado que diferentes factores pueden influir en su toxicidad tales como el tiempo de exposición, condiciones experimentales, materiales para funcionalización y cubrimiento, la ruta de administración, carga superficial, dosis, tamaño y forma (Milan et al., 2022). Ya se han sintetizado nanopartículas de oro como nanoportadores de cannabidiol. Josiah et al., reportaron la síntesis verde de nanopartículas de oro y plata utilizando cannabidiol como agente reductor y de recubrimiento, dichos investigadores probaron su efecto citotóxico en células queratinocíticas humanas para evaluar su potencial como tratamiento para enfermedades de la piel. En este estudio se obtuvieron nanopartículas estables de oro y plata utilizando el CBD como agente reductor, de forma esférica y de tamaños menores a 10 nm. En los ensayos de citotoxicidad, estas nanopartículas mostraron ser menos citotóxicas en células HaCaT que el CBD solo. Por otra parte, las nanopartículas de oro recubiertas de CBD mostraron mayor citotoxicidad sobre esta línea celular, lo que indicaría un potencial benéfico en el tratamiento de cáncer (Josiah et al., 2021). Singh et al., también reportaron la síntesis de nanopartículas de oro a partir de extractos acuosos de diferentes partes de la planta de cannabis para evaluar su efecto de inhibición de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, obteniendo partículas de tamaños de entre 12 a 40 nm. No obstante, el enfoque de dicho estudio evaluaba el efecto extracciones acuosas de la planta en donde no se consideró la presencia de cannabinoides (P. Singh et al., 2018).

Para la encapsulación de cannabinoides con materiales poliméricos, principalmente se ha reportado la encapsulación de THC, CBD y cannabinoides sintéticos u otros derivados de la planta de cannabis. Wang et al., aprovecharon las características de la zeína, un subproducto del almidón de maíz, para formular nanopartículas de cannabidiol. La zeína posee una alta capacidad de autoensamblado para general nanopartículas y esto la hace ventajosa para encapsular nutraceuticos. Estas nanopartículas se combinaron con proteína de suero para conferir estabilidad y se obtuvieron nanopartículas homogéneas de tamaño promedio de entre 140-160 nm solubles en agua (C. Wang et al., 2022; C. C. Wang et al., 2022). Por su parte, Fraguas-Sánchez et al., formularon nanopartículas de PLGA cargadas con CBD. capaces de ser internalizadas en células de cáncer de ovario. Los autores evaluaron la estabilidad y las propiedades antitumorales *in vitro* e *in ovo* en

modelos cáncer de ovario. Las nanopartículas formuladas mostraron estabilidad en almacén al ser liofilizadas, una liberación sostenida y controlada de CBD por un periodo de 4 días y cualidades anticancerígenas *in vitro* e *in ovo* (Fraguas-Sánchez et al., 2020). El PLGA es un polímero que se ha utilizado ampliamente para el desarrollo de nanoportadores de fármacos debido a su biodegradabilidad y falta de toxicidad. La encapsulación de cannabinoides (como el THC) con PLGA ha mostrado aumentar su citotoxicidad en células cancerígenas de colon, a comparación del THC soluble, a tiempos de incubación prolongados ($t > 120$ h). Mientras que a tiempos de incubación menores (96 h) el cannabinoide soluble mostró producir más citotoxicidad. Lo que podría deberse a una liberación controlada del cannabinoide por parte de las nanopartículas (Reddy et al., 2023).

Explorar diferentes sistemas de nanoentrega para cannabinoides contribuirá a justificar su uso terapéutico en enfermedades inflamatorias intestinales, para tratar el proceso inflamatorio y otras consecuencias como el cáncer colorrectal. En el presente trabajo evalúa el potencial de la nanoformulación de diferentes sistemas de entrega basados en nanotecnología para la entrega de cannabidiol y cannabigerol, y evalúa su potencial citotóxico en líneas celulares intestinales cancerígenas y su potencial antiinflamatorio en un modelo murino de inflamación intestinal. En México, actualmente son pocas las investigaciones que buscan describir los efectos antiinflamatorios de cannabinoides solubles o en sistemas de nanoentrega sobre padecimientos de importancia humana y veterinaria, por lo que resulta de importancia integrar este tipo de perspectivas terapéuticas.

3. JUSTIFICACIÓN

La planta de cannabis ha sido utilizada por el humano durante milenios. Sus propiedades medicinales y su potencial terapéutico son objeto de interés en todo el mundo por la diversidad de enfermedades en las que puede ser útil como un tratamiento paliativo. Los extractos y componentes de la planta de cannabis (*Cannabis sativa* L.) han demostrado mejorar los signos y síntomas de numerosas enfermedades dolorosas e inflamatorias, mejorando la calidad de vida de los pacientes. Además, los rangos de seguridad y la falta de efectos secundarios de algunos de sus componentes, como lo son los fitocannabinoides no psicoactivos como el cannabidiol y el cannabigerol, hacen de éstos una herramienta terapéutica prometedora a evaluar. Los cannabinoides se han investigado por su potencial antiinflamatorio y anticancerígeno en enfermedades que afectan tanto a humanos como a animales, tales como las enfermedades inflamatorias intestinales (EII). Las EII son enteropatías crónicas incurables que pueden afectar tanto a humanos como a animales. Las consecuencias de los procesos inflamatorios intestinales disminuyen el bienestar de quienes las padecen e incluso pueden conllevar al padecimiento de cáncer y la muerte. Los tratamientos convencionales se basan en reducir la actividad del sistema inmune, pero resultan inefectivos, fallando en evitar la mejoría a mediano y largo plazo. Además, los efectos secundarios resultantes del uso de fármacos convencionales traen efectos secundarios sistémicos que comprometen aún más el bienestar y la vida. La búsqueda de alternativas terapéuticas eficaces y seguras para el tratamiento de las EII resulta de importancia para su control. Sin embargo, los fitocannabinoides al igual que un gran número de fitoterapéuticos de origen natural, tienen limitaciones fisicoquímicas que obstaculizan su administración como elemento terapéutico, así como su almacenamiento a largo plazo. La nanotecnología, particularmente los nanofarmacéuticos, proveen una solución al problema. El nanodimensionamiento de fitoterapéuticos puede contribuir a superar sus limitantes fisicoquímicas y mejorar sus cualidades farmacológicas. Actualmente son pocas las investigaciones que evalúan la eficacia de nanofarmacéuticos a base de cannabinoides en enfermedades inflamatorias intestinales. En México, actualmente son pocas las investigaciones que buscan describir los efectos antiinflamatorios de cannabinoides en EII, por lo que resulta de importancia integrar este tipo de perspectivas terapéuticas.

4. HIPÓTESIS

La administración de nanopartículas con cannabidiol y cannabigerol disminuye la respuesta inflamatoria en un modelo murino de colitis

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de los cannabinoides cannabidiol (CBD) y cannabigerol (CBG) solubles y nanoencapsulados en un modelo de colitis.

5.2. Objetivos específicos

1. Diseño y caracterización de múltiples sistemas de nanoentrega para cannabidiol y cannabigerol.
2. Analizar el efecto de los cannabinoides CBD y CBG en un modelo murino de colitis.
3. Analizar el efecto de un sistema de nanoentrega de CBD y CBG adecuado en la respuesta inflamatoria en un modelo murino de colitis.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Diseño y caracterización de sistemas de nanoentrega

Todos los reactivos químicos utilizados fueron de grado analítico y se adquirieron en Sigma-Aldrich ® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y CTR Scientific México (Monterrey, México). Los copolímeros Eudragit L-100 y ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) se adquirieron en Helm México (© HELM AG. Hamburgo, Alemania). Las metodologías para la síntesis de nanopartículas de oro, de zeína y el complejo híbrido metálico-polimérico se realizaron en el Laboratorio de Inmunobiología y Virología en la Unidad A de la Facultad de Ciencias Biológicas (UANL, San Nicolas, Nuevo León). Las metodologías para la síntesis de nanopartículas de PLGA y Eudragit L100 se realizaron en el Laboratorio de Química Analítica en la Unidad B de la Facultad de Ciencias Biológicas (UANL, San Nicolás, Nuevo León).

6.1.1. *Síntesis de nanopartículas de oro*

Primero, se estandarizó la síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs), utilizando el cannabidiol y el cannabigerol como agentes reductores. La síntesis de las nanopartículas de oro se realizó utilizando como precursor una sal de ácido tetracloroáurico (HAuCl₄) en una solución etanólica. Se probaron diferentes concentraciones del precursor de oro, de cannabinoides y NaOH hasta lograr obtener una solución color rojo vino, indicador de la presencia de nanopartículas. Durante la estandarización se utilizaron volúmenes de 5 mL de etanol absoluto y concentraciones del precursor de 2mM a 0.01mM, y diferentes concentraciones de cannabinoides en agitación magnética a temperatura ambiente. A la solución de H₂AuCl₄ se le agregaron diferentes volúmenes de cannabinoides en solución etanólica a una concentración de 0.1 g/mL y una relación 1:1 de CBD:CBG. Finalmente se agregó un volumen de 350 µl de NaOH a 0.1M y se dejó en agitación magnética por 30 minutos.

6.1.2. *Síntesis de nanopartículas de zeína*

Para la síntesis de nanopartículas poliméricas de zeína se adaptó la metodología utilizada por el equipo de trabajo del Laboratorio de Inmunobiología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas (UANL, San Nicolás, Nuevo León). Se prepararon

soluciones de 0.01 y 0.02 g de zeína en 10 mL de etanol al 80% y 0.06g de cannabinoides en una relación 1:1 CBD:CBG. La solución se calentó a 95°C durante 30 minutos. Posteriormente se colocaron 6 mL de agua desionizada en un vaso precipitado y en un homogeneizador a 5,000 rpm (Homogeneizador T 25 ULTRA-TURRAX, IKA®) durante 2 minutos. Se añadieron volúmenes por goteo lento de la solución de zeína y cannabinoides hasta que un color turquesa transparente fuera perceptible.

6.1.3. Síntesis del nanocomplejo híbrido metálico-polimérico

La solución final de AuNPs a utilizar fue de 5 mg de HAuCl₄ a 0.5mM en etanol, añadiendo 0.3 mg de solución de cannabinoides (CBD:CBG a 1:1) a una concentración de 0.1 g/mL y finalmente 0.35mL de NaOH a 0.1M en agitación magnética a temperatura ambiente por 30 minutos. La solución de AuNPs se colocó en una caja de Petri a 40°C durante 3h para retirar el etanol por evaporación. Seguido, se preparó una solución de zeína al 0.1% en etanol al 80% y se le dio tratamiento térmico calentándola a 95°C por 30 minutos. La solución de zeína tratada se utilizó para resuspender las AuNPs en un volumen final de 2 mL. Rápidamente se obtuvieron 100 µL de esta solución (zeína + AuNPs) y se colocaron por goteo en 6 mL de agua desionizada en un homogeneizador a 5,000 rpm durante 2 minutos. Finalmente se obtuvo una solución color turquesa transparente.

6.1.4. Síntesis de nanopartículas con polímero Eudragit L-100

Para esta metodología de síntesis se utilizó la técnica de nanoprecipitación. Para la preparación de la fase acuosa, donde un volumen de 10 mL de agua bidestilada, se colocó en el reactor. La fase oleosa fue preparada añadiendo 80 mg de polímero Eudragit L-100 y 20 mg de compuesto activo (CBD o CBG) a un volumen de 8 mL de metanol, que se sometió a proceso de sonicación durante 1 minuto (2510R-DTH BRANSONIC®). Posteriormente la fase oleosa fue añadida al inyector y depositada por gravedad en el reactor, formándose las nanopartículas poliméricas. Una vez formadas, fue necesaria la eliminación de solventes con destilación rotatoria al vacío, asociada a baño maría (Laborota 4003 control Heidolph®) a una velocidad de 120 rpm por 20 minutos a 25 °C. La suspensión obtenida fue llevada a volumen de 10 mL con agua bidestilada. Finalmente, se prepararon blancos siguiendo la misma metodología, sin la adición de el compuesto activo.

6.1.5. *Síntesis de nanopartículas con polímero PLGA*

La fase acuosa fue preparada midiendo un volumen de 10 mL de agua bidestilada, que fueron depositados en el reactor. La fase oleosa fue preparada añadiendo 40 mg de polímero PLGA y 4 mg de compuesto activo (CBD o CBG) a un volumen de 8 mL de acetona, que se sometieron a proceso de sonicación durante 30 segundos (2510R-DTH BRANSONIC®). Posteriormente la fase oleosa fue agregada al inyector e instantáneamente por gravedad fue cayendo al reactor, obteniendo las NP. Una vez formadas las NP se eliminaron los solventes con destilación rotatoria a vacío (Laborota 4003 control Heidolph®) a una velocidad de 120 rpm por 15 minutos a 25 °C. La suspensión de nanopartículas obtenidas fue llevada a volumen conocido de 10 mL con agua bidestilada. Finalmente, se prepararon blancos siguiendo la metodología descrita, exceptuando la adición del compuesto activo.

6.2. *Caracterización de los sistemas de nanoentrega y efecto in vitro.*

Las soluciones de nanopartículas fueron caracterizadas en base a su tamaño e índice de polidispersidad (PDI) por dispersión dinámica de luz (DLS) (Zetaseizer Nano ZS, MALVERN ®) y eficiencia de encapsulación por medio de un método indirecto a través de espectrofotometría del sobrenadante en muestras centrifugadas y lectura de absorbancia relacionada a una curva de calibración, para posteriormente determinar la cantidad de compuesto activo libre y una relación por medio de una curva de calibración de diluciones de los cannabinoides. La eficiencia fue determinada con la siguiente fórmula (1):

$$EE \% = \left(\frac{\mu\text{g activo libre} \times 100}{\mu\text{g activo total}} \right) - 100 \quad (1)$$

Adicionalmente, la solución con AuNPs se analizó por medio de espectrofotometría ultravioleta visible (UV-vis) (NanoDrop™ 2000, Thermofisher) para determinar la presencia de la resonancia del plasmón de superficie de las nanopartículas en tiempos diferentes y la interacción química entre los cannabinoides y la nanopartícula de oro por medio de espectroscopía por infrarrojo transformado de Fourier (FTIR) en un espectrómetro FTIR Spectrum One (PerkinElmer, Frontier IR/NIR systems).

6.2.1. Barrido y curva de calibración

Se prepararon soluciones estándar de 200 ppm pesando 2 mg de CBD y CBG, respectivamente, y aforando a 10 mL con metanol. Posteriormente, a partir de la solución estándar fueron preparadas soluciones a una concentración de 20 ppm, tanto para CBD, como para CBG. Por separado, se realizó un barrido de espectro de absorción abarcando las longitudes de onda de 190 a 380 nm. La curva de calibración se realizó preparando soluciones de 6, 9, 12, 15 y 18 ppm partiendo de la solución estándar de cada compuesto activo (CBD y CBG). Se leyó absorbancia de las diferentes concentraciones a 215 nm para las soluciones de CBD y 216 nm para CBG.

6.3. Cultivo celular y ensayo de viabilidad

La línea celular de adenocarcinoma de colon humano, Caco-2 (ATCC® Caco-2 HTB-37™), se cultivó y propagó durante 21 días en frascos de cultivo de 25 cm² con medio de cultivo DMEM (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EE.UU.) con antibiótico/antifúngico penicilina/estreptomicina (1% de una mezcla comercial de 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina (*Gibco*; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA)) y suero fetal bovino (SFB) al 10%, en una atmósfera húmeda estéril a 37°C y CO₂ al 5%, realizando pases cada 5-7 días. Una vez llegada a la confluencia deseada, los frascos se lavaron con PBS y se cosecharon las células con tripsina al 0.25 % (trypsin-EDTA 0.25%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Después de lavar y centrifugar las células suspendidas, se resuspendieron en medio de cultivo y se cuantificaron por el método de exclusión con azul tripán (0.4%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos (Corning; Life Sciences Inc., NY) a una densidad de 10,000 células por pozo en las condiciones de cultivo mencionadas durante 24 horas. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo, se realizaron lavados con PBS y se añadieron los tratamientos correspondientes. Los tratamientos se administraron por triplicado a diferentes concentraciones de tratamiento y se utilizaron células tratadas con vehículo y células sin tratamiento, como parte de los controles. Después del tiempo de tratamiento, se removió el medio de cultivo y se añadió una solución de medio fresco sin rojo fenol y sin SFB con 0.33% (m/V) bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA) y se incubó nuevamente durante 4 horas. Al

finalizar, se retiró el medio y se disolvieron los cristales de formazán con 100 μ L de DMSO durante 30 minutos (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Finalmente, se realizó una lectura de absorbancia por medio de espectrofotometría a una longitud de onda de 570 nm utilizando un espectrofotómetro (Agilent Biotek Epoch Microplate Spectrophotometer, Agilent Technologies, Santa Clara, CA). La evaluación del metabolismo celular dependiente de mitocondria se evaluó utilizando la siguiente fórmula (2):

$$\% \text{Viabilidad celular} = \frac{\text{Abs. Células tratadas}}{\text{Abs. Células control}} \times 100 \quad (2)$$

6.4. Efecto de los cannabinoides y los sistemas de nanoentrega *in vitro*

Se analizó en efecto de los cannabinoides cannabidiol (CBD) y cannabigerol (CBG), individualmente y en conjunto (CBD:CBG 1:1), nanopartículas de zeína (ZeNP), nanocomplejo oro-zeína (ZeAuNP), nanopartículas de Eudragit L-100 (EuNPs) y nanopartículas de PLGA (PLGA-NP), así como de sus controles de nanopartículas vacías, en la viabilidad de células Caco-2.

6.5. Efecto de los cannabinoides y un sistema de nanoentrega en un modelo *in vitro* de colitis

Se analizó el efecto de los cannabinoides en conjunto y un sistema de nanoentrega a dos concentraciones de cannabinoides (9.5 μ M y 23.7 μ M) en células Caco-2 estimuladas con 800 μ g de solución de ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS 5% Sigma-Aldrich® St. Louis, MO, EE.UU.) durante 24 y 48 horas. También se consideró el vehículo de los cannabinoides (metanol) y de los SNEs (nanopartículas vacías o Blanco-NPs) como parte de los tratamientos. El efecto de los tratamientos en la viabilidad celular se realizó por medio del ensayo de MTT con la metodología anteriormente descrita.

6.6. Modelo *in vivo* de EII

6.6.1. Estandarización del modelo de colitis inducida por ácido trinitrobenzeno-sulfónico

6.6.1.1. Modelo Animal

Se utilizaron ratones cepa BALB/c hembras de 25-30g de peso. Los cuales se mantuvieron 5 días previos a la experimentación en jaulas transparentes de policarbonato con acceso *ad libitum* a agua purificada y comida para roedores de laboratorio (Nutricubos Purina, México) y ciclo de luz/obscuridad de 12h/12h y humedad relativa de 40-60% en el Departamento de Inmunología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Los procedimientos experimentales *in vivo* se realizaron en el Departamento de Inmunología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Siguiendo la metodología de (Schicho & Storr, 2012) y (Mar-Solís et al., 2021), se estandarizó un modelo murino de colitis por medio de la administración de ácido trinitrobenzenosulfónico % (TNBS 5% Sigma-Aldrich® St. Louis, MO, EE.UU.).

6.6.1.2. Inducción de colitis

Previo a la inducción, los animales pasaron por un ayuno de 24 horas. Al día 1 de experimentación, los animales fueron anestesiados con un coctel de xilacina y tiletamina/zolazepam una dosis de 5 y 50 mg/kg respectivamente por la vía intraperitoneal colocados en posición de Trendelenburg (Figura 5 A). Una vez anestesiados y con ausencia de reflejo interdigital, se procedió a la sujeción del animal en posición de Trendelenburg con un dispositivo de sujeción y se insertó cuidadosamente el catéter plástico por la vía intrarrectal a 30mm del ano (Figura 5 B). Se administraron 100µL de solución etanólica al 50% con 4 mg de TNBS, retirando cuidadosamente el catéter. Previo al completo retiro del catéter se administró un volumen de aire previamente cargado de 50µL.

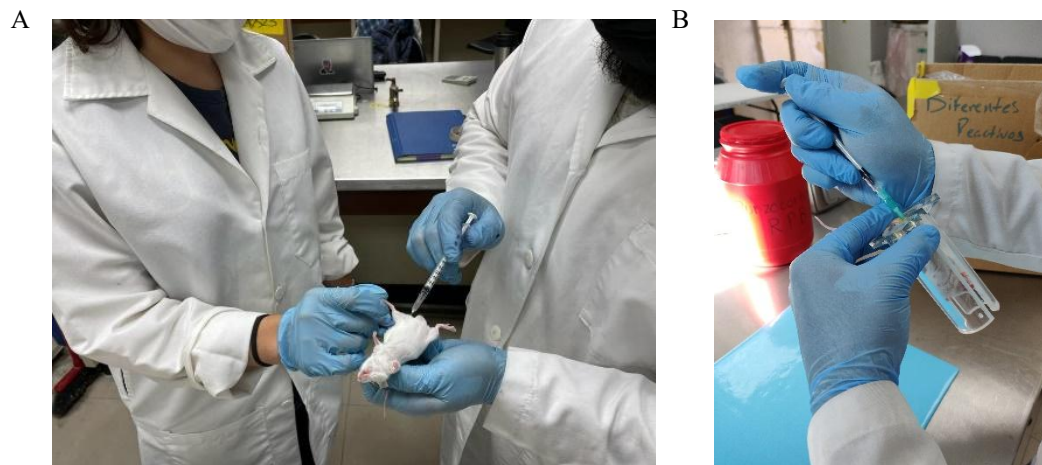


Figura 5: Manejo de los animales de laboratorio.

6.6.1.3. Modelo experimental.

Los tratamientos utilizados se exponen en la siguiente tabla (Tabla 2).

Tabla 2: Tratamientos experimentales.

Grupo 1	Control WT		Grupo 5	TNBS	CBs 100 mg/kg
Grupo 2	TNBS	WT	Grupo 6	TNBS	CBs 10 mg/kg
Grupo 3	TNBS	Eu-NP 100 mg/kg CBs	Grupo 7	TNBS	Blanco NPs
Grupo 4	TNBS	Eu-NP 10 mg/kg CBs	Grupo 8	TNBS	Vehículo CBs
			Grupo 9	WT	Blanco NPs

Se utilizaron dos dosis de cannabinoides solubilizados en polietil-glicol y de cannabinoides nanoencapsulados suspendidos en agua bidestilada, y sus respectivos vehículos (polietil-glicol y nanopartículas vacías denominadas como *Blanco NPs*). Una dosis alta, considerada como 100 mg/kg; y una dosis baja, considerada como 10 mg/kg de CBD:CBG en una relación 1:1. Los tratamientos fueron administrados diariamente durante 5 días por la vía intraperitoneal utilizando una jeringa de insulina calibre 30G x 13mm

basándonos en lo descrito por (Schicho & Storr, 2012)s. Finalmente, fueron sacrificados 24 horas después de la última administración del tratamiento correspondiente.

6.6.1.4. Eutanasia y colecta de muestras

Los animales fueron observados continuamente durante todo el ensayo. Los individuos cuyo peso corporal disminuía súbitamente (>20% PV) eran retirados del ensayo, el resto de los animales fueron sacrificados al terminar el protocolo experimental por medio de exposición prolongada a éter anhidro y punción cardíaca de acuerdo con la NOM-033-SAG/ZOO-2014. Una vez sacrificados se obtuvo la totalidad del intestino grueso a partir del ciego y se dispuso en PFA al 4% para el análisis histológico y una sección distal en tiocianato de guanidina para la extracción de ácidos nucleicos (TRIzol® Reagent, Invitrogen, CA, EE. UU.).

7. RESULTADOS

7.1. Características de los sistemas de nanoentrega

7.1.1. *Resonancia del plasmón de superficie y enlaces químicos de AuNPs.*

Los resultados de las bandas de absorbancia se graficaron y se exponen en la figura 6.

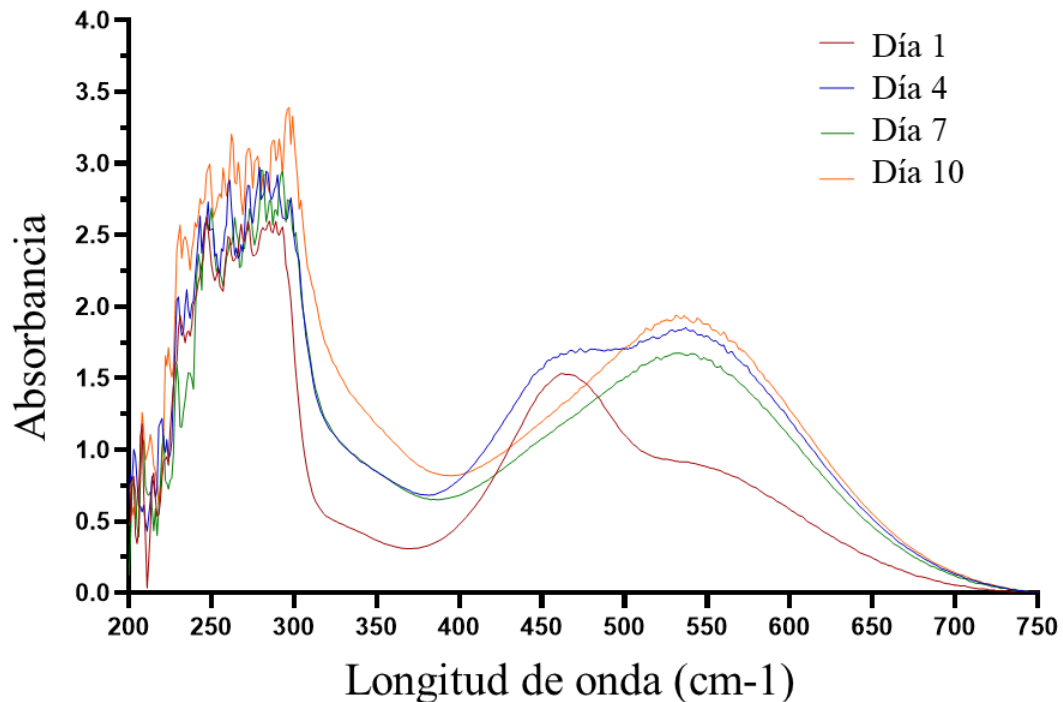


Figura 6: Presencia de la resonancia del plasmón de superficie de AuNPs por medio de espectrofotometría UV-vis.

La resonancia del plasmón de superficie de AuNPs fue evidente bajo espectrofotometría UV-vis. Al día 1 se observaron 2 bandas de máxima absorbancia a los 462 nm y 537 nm. Al día 4 se observaron las mismas bandas de absorbancia, con la diferencia de que la segunda banda a los 537 nm presentaba la mayor absorbancia y finalmente los días 7 y 10 la banda de absorbancia máxima se observó a los 537 nm. Posteriormente se analizaron los enlaces químicos entre AuNPs cargadas y los cannabinoides por medio de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), utilizando una muestra de cannabinoides en su forma pura combinados 1:1. Los resultados se graficaron y se representan en la siguiente figura (Figura 7).

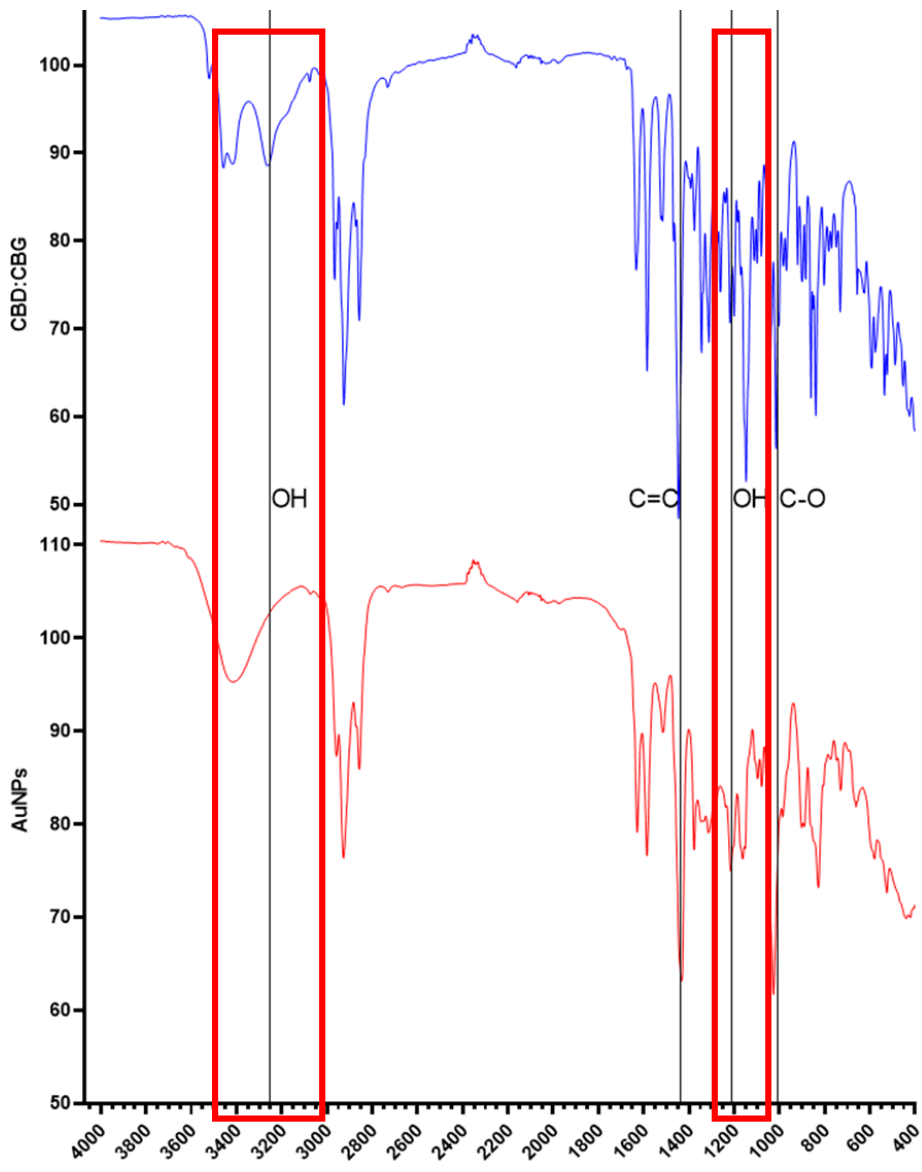


Figura 7: Enlaces químicos presentes en las nanopartículas de oro (AuNPs) en comparativa con los cannabinoides (CBD:CBG).

Se señalan con cuadros rojos los sitios de corrimiento de bandas, indicativos de cambios en la absorbancia de luz infrarroja por parte de los compuestos químicos.

Mediante esta metodología se observaron algunos corrimientos en las bandas señaladas con rectas negras verticales, indicándonos posibles interacciones con los grupos funcionales indicados en cada recta. El más destacable corresponde a la desaparición de una banda visible en los análisis de los cannabinoides individuales a los 3280 nm (marcada en rectángulo rojo), que desaparece la muestra de AuNPs. Esto también se observa a los 1280 nm (marcado en un rectángulo rojo). Esto indica que uno de los

radicales OH de la estructura de los cannabinoides (Figura 8) es el que está fungiendo como donador de electrones de la molécula de ácido cloroaúrico (HAuCl₄).

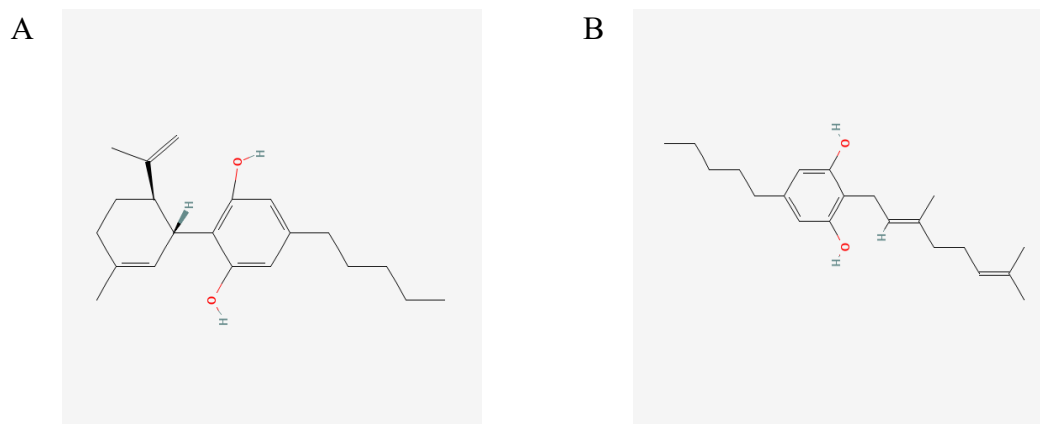


Figura 8: Estructura química de los cannabinoides.

A) Cannabidiol (PubChem ID: 644019). B) Cannabigerol (PubChem ID: 5315659).

7.1.2. Tamaño, índice de polidispersidad (PDI) y eficiencia de encapsulación/atrapamiento (EE)

Las características de las nanopartículas se resumen en la siguiente tabla (Tabla 3).

Tabla 3: Características de nanopartículas.

Tipo de NP	Tamaño promedio	PDI	EE%
ZeNPs	144.8 nm ± 41.6 nm	0.148	69.99 ± 2.68
AuNPs	121.1 ± 13.52 nm	0.392	88.4% ± 0.78
ZeAuNPs	229.9 ± 79.12 nm	0.070	67.83% ± 5.94
EuNPs CBD	50.6 ± 0.40 nm	0.189	94.3%
EuNPs CBG	41.8 ± 0.67 nm	0.121	98.73%
PLG-NPs CBD	144.8 ± 2.40 nm	0.099	92.12%
PLG-NPs CBG	123.9 ± 1.25 nm	0.089	98.83%

NP: nanopartícula; PDI: índice de polidispersidad; EE%: eficiencia de encapsulación/atrapamiento; CBD: Cannabidiol; CBG: Cannabigerol;

Los SNEs, EuNPs y PLGA-NPs mostraron los parámetros más adecuados para las características observadas de nanopartículas, con tamaños menores a 150 nm, PDIs menores a 0.2 y %EE superiores al 90%.

7.2. Efecto de los cannabinoides y sistemas de nanoentrega sobre la viabilidad celular.

El efecto de los cannabinoides, nanopartículas y sus componentes en la viabilidad celular se analizó por medio del ensayo de MTT, utilizando diferentes dosis de los tratamientos. Los resultados se graficaron tal como se muestra en la figura 9.

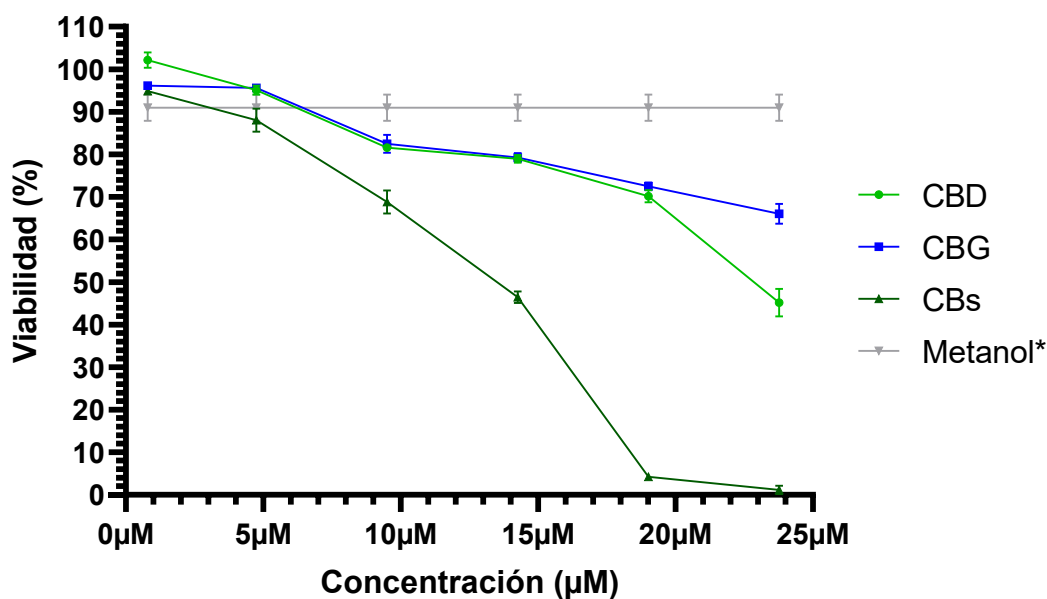


Figura 9: Efecto del cannabidiol (CBD) y cannabigerol (CBG) solos y en combinación en la viabilidad de células Caco-2.

*Se utilizó metanol al 0.33% como vehículo en todas las dosis de cannabinoides y se graficó como datos comparativos.

A las dosis de 0.8 µM y 4.7 µM los cannabinoides se comportaron de manera similar ($P > 0.05$). A 9.5 µM el cannabidiol mostró tener significativamente menos efecto, disminuyendo la viabilidad que los cannabinoides en conjunto ($P < 0.05$). A 14.2 µM los cannabinoides en conjunto mostraron un efecto en mayor medida que el cannabidiol ($P < 0.05$), el cannabigerol ($P < 0.001$) y el vehículo ($P < 0.05$). Esta tendencia se repite a 19 µM (CBD $P < 0.001$; CBG $P < 0.00001$; y vehículo $P < 0.005$) y a 23.7 µM (CBD $P < 0.05$;

CBG $P < 0.0001$; y vehículo $P < 0.00001$), mostrando un efecto dosis dependiente. Se calculó la IC50 de los cannabinoides individuales y en conjunto, como se muestra en la tabla 4, la IC50 de los cannabinoides en conjunto en una relación 1:1 de CBD:CBG fue menor a la de los cannabinoides administrados individualmente.

Tabla 4: IC50 de los cannabinoides en líneas celulares Caco-2 a las 24h.	
Tratamiento	IC 50
Cannabidiol	$24.53 \pm 1.95 \mu\text{M}$
Cannabigerol	$42.63 \pm 7.25 \mu\text{M}$
Cannabinoides (CBD:CBG - 1:1)	$12.76 \pm 0.43 \mu\text{M}$

Inicialmente el efecto de los cannabinoides cannabidiol (CBD) y cannabigerol (CBG) en la viabilidad celular fue evaluado en la línea celular humana Caco-2 (adenocarcinoma de colon). Los cannabinoides se utilizaron en una relación de 1:1 CBD:CBG, utilizando metanol como solvente a concentraciones desde 0.793 a 0.23.774 μM . Debido a que el peso molecular del cannabidiol y el cannabigerol son muy similares (314.47 g/mol y 316,48 g/mol, respectivamente), los valores de molaridad hacen referencia a las concentraciones de los cannabinoides en conjunto en el tratamiento.

El efecto de los SNEs de cannabinoides en la viabilidad celular se evaluó a las mismas concentraciones utilizadas en los cannabinoides solubles. Los ensayos se llevaron a cabo a las 24 horas de exposición a los tratamientos y los resultados de absorbancia y actividad metabólica del ensayo de MTT se graficaron y analizaron (Figura 10).

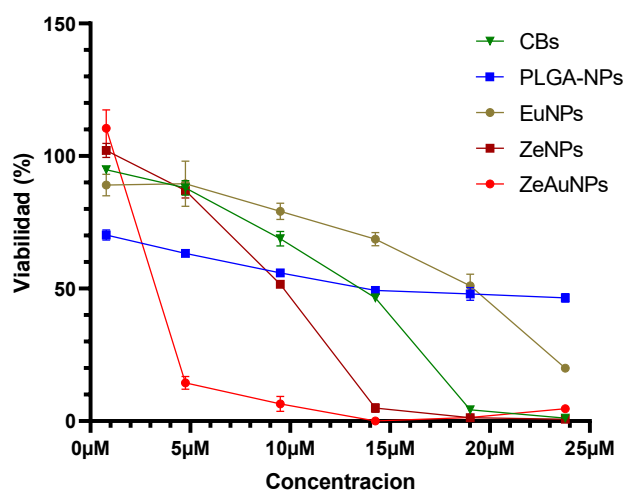


Figura 10: Efecto de los sistemas de nanoentrega de cannabinoides en la viabilidad de células Caco-2.

Al comparar los diferentes sistemas de nanoentrega de cannabinoides y los cannabinoides solubles, el sistema EuNP destaca por mantener una mayor viabilidad que los CBs a las mismas concentraciones, contrario al sistema ZeAuNPs. Los resultados de viabilidad se graficaron en porcentaje y la concentración del tratamiento en molaridad.

Las nanopartículas de oro se sintetizaron en medio etanólico el cual mostró afectar la supervivencia de las células tratadas y las adyacentes por lo que no fue considerado para esta evaluación (no se muestran los datos). Las diferencias entre tratamientos son evidentes a partir de la concentración de 4.7 μM , en donde las células tratadas con PLGA-NPs mostraron valores de viabilidad menores que ZeNPs ($P < 0.05$) y mayores que ZeAuNPs ($P < 0.005$), mientras que ZeAuNPs mostraron tener menor impacto que ZeNPs ($P < 0.001$) y su blanco ($P < 0.05$). A la concentración de 9.5 μM las PLGA-NPs, EuNPs y ZeNPs disminuyeron la viabilidad significativamente menos que ZeAuNPs ($P < 0.05$). Además, ZeAuNPs y ZeNPs tuvieron menos efecto disminuyendo la viabilidad que EuNPs ($P < 0.05$). A la concentración de 14.26 μM de cannabinoides, ZeNPs y ZeAuNPs mostraron el mayor impacto en la viabilidad al compararlos con EuNPs (ZeNPs $P < 0.05$); ZeAuNPs ($P < 0.005$) y PLGA-NPs (ZeNPs $P < 0.005$); ZeAuNPs $P < 0.001$). A esta concentración EuNPs mostraron afectar menos la viabilidad que el tratamiento de PLGA-NPs (0.05). A 19 μM , ZeAuNPs y ZeNPs mostraron disminuir la viabilidad celular en mayor medida ($P < 0.05$), siendo igual entre ellos ($P > 0.05$) así como PLGA-NPs y EuNPs ($P > 0.05$). A la dosis más alta, PLGA-NPs mostró menos efecto que EuNPs ($P < 0.05$),

ZeNPs ($P < 0.005$) y ZeAuNPs ($P < 0.05$), de forma similar que EuNPs tuvo significativamente menos efecto que ZeNPs ($P < 0.05$). Posteriormente se calculó la IC50 de los diferentes SNEs de cannabinoides (Tabla 5)

Tabla 5: IC50 de los sistemas de nanoentrega de cannabinoides.

Tratamiento	IC 50
EuNPs	$18.67 \pm 0.54 \mu\text{M}$
PLGA-NPs	$16.13 \pm 2.73 \mu\text{M}$
ZeNPs	$9.22 \pm 0.37 \mu\text{M}$
ZeAuNPs	$2.77 \pm 0.18 \mu\text{M}$

El sistema de EuNPs fue evaluado *in vitro* en líneas celulares Caco-2 estimuladas con 800 μg de TNBS durante 24 y 48 horas a dos concentraciones de cannabinoides. Los resultados de viabilidad celular se graficaron y analizaron en la Figura 11.

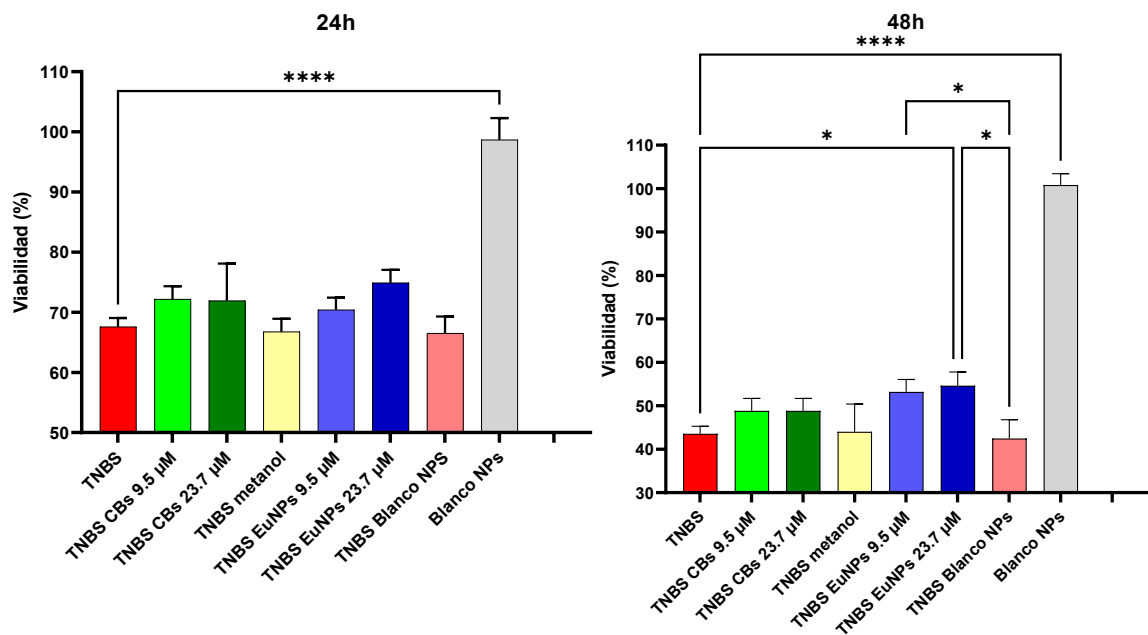


Figura 11: Efecto del sistema EuNPs de cannabinoides (CBD:CBG) en células Caco-2 estimuladas con TNBS durante 24 y 48 horas en la viabilidad celular.

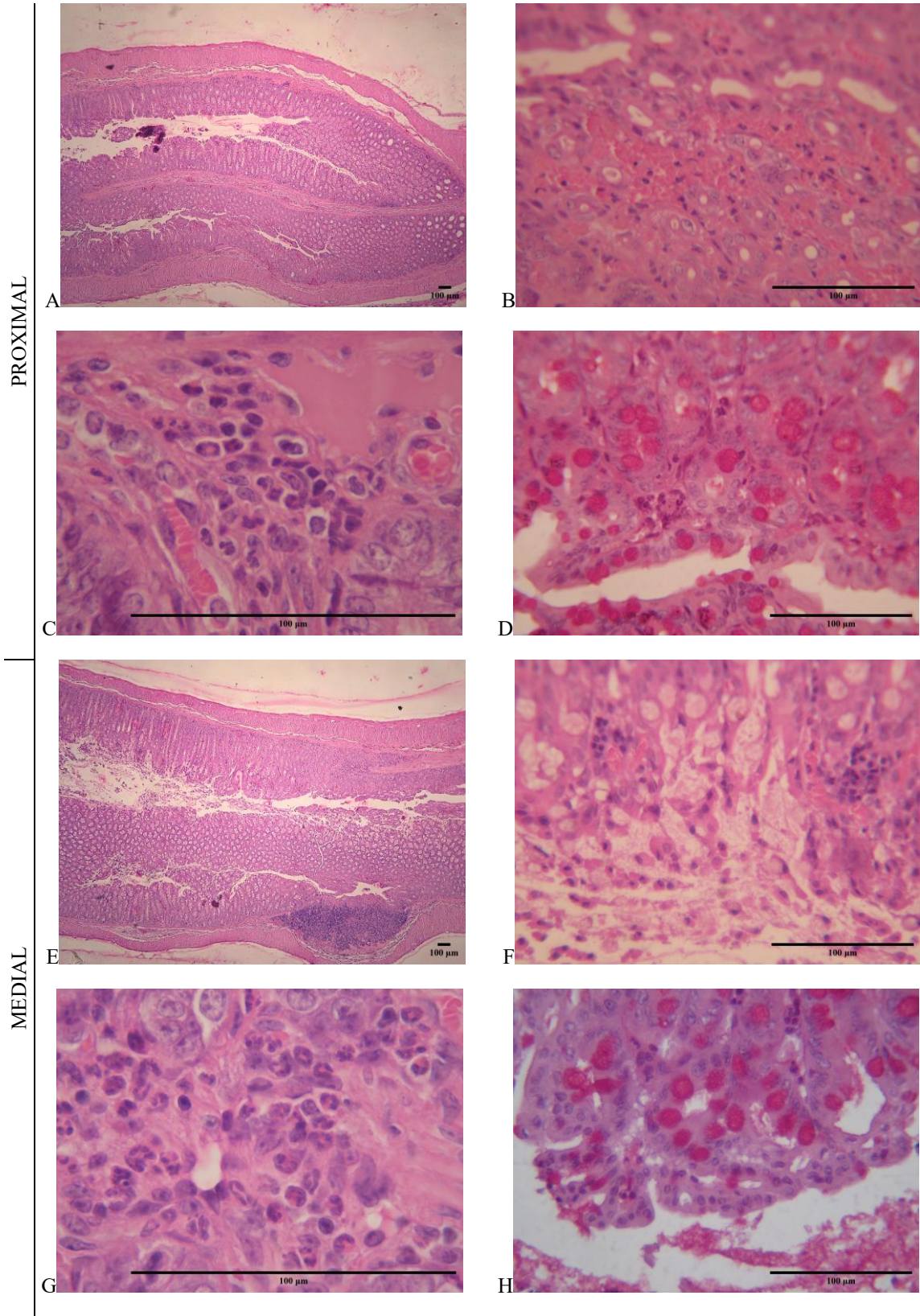
TNBS: ácido trinitrobenzenosulfónico; CBs: cannabinoides; EuNPs: nanopartículas de Eudragit L-100; Blanco NPs: vacías; WT: sin tratamiento. * $P < 0.05$ **** $P < 0.0001$.

Todas los grupos de células tratadas con TNBS mostraron una significativa disminución de su viabilidad a comparación de las células sin tratamiento o que solo fueron tratadas con nanopartículas vacías (Blanco NPs) ($P < 0.05$). A las 24 horas, todos los tratamientos de cannabinoides se comportaron estadísticamente igual ($P > 0.05$) que las células que solo fueron tratadas con TNBS, TNBS y metanol y TNBS y Blanco NPs. Interesantemente, a las 48 horas post tratamiento, las células tratadas con EuNPs a 23.7 μM de cannabinoides mostraron mayor porcentaje de viabilidad que las células tratadas con TNBS y nanopartículas vacías ($P < 0.05$). La viabilidad de las células tratadas con nanopartículas con 9.5 μM de cannabinoides mostraron un efecto similar al compararlas con las células tratadas con TNBS y Blanco NPs ($P > 0.05$) pero no fueron estadísticamente diferentes a las células únicamente tratadas con TNBS ($P > 0.05$).

7.3. Modelo murino de colitis inducido por ácido trinitrobencenosulfónico y efecto de los cannabinoides y los sistemas de nanoentrega.

7.3.1. *Análisis histológico de colon*

Las muestras de colon fueron procesadas por la técnica histológica y teñidas con la tinción de H&E y la histoquímica de PAS. Las laminillas fueron observadas bajo un microscopio de luz y se tomaron micrografías representativas de 3 secciones del colon: una sección proximal, medial y distal. Bajo el presente protocolo de inducción de colitis se registró una mortalidad anticipada del 25% en todos los grupos tratados con TNBS. Los individuos que a la inspección se observaban notablemente decaídos fueron sacrificados humanitariamente y se colectaron muestras para observar el proceso inflamatorio. Como se describe en la figura 4, los principales hallazgos en estos individuos fueron áreas diseminadas de erosión del epitelio intestinal con zonas de hemorragia y congestión, observable a lo largo de todo el intestino (Figura 12 A-C, E-G e I-K). En la histoquímica de PAS, que evidencia la presencia de compuestos ricos en hidrocarburos, como los encontrados la capa apical de mucina en el epitelio intestinal y las células caliciformes que la producen, se observó una pérdida de la PAS-positividad en las áreas erosionadas del epitelio y una reducción variable de esta, en la región apical epitelial (Figura 12D, H y L).



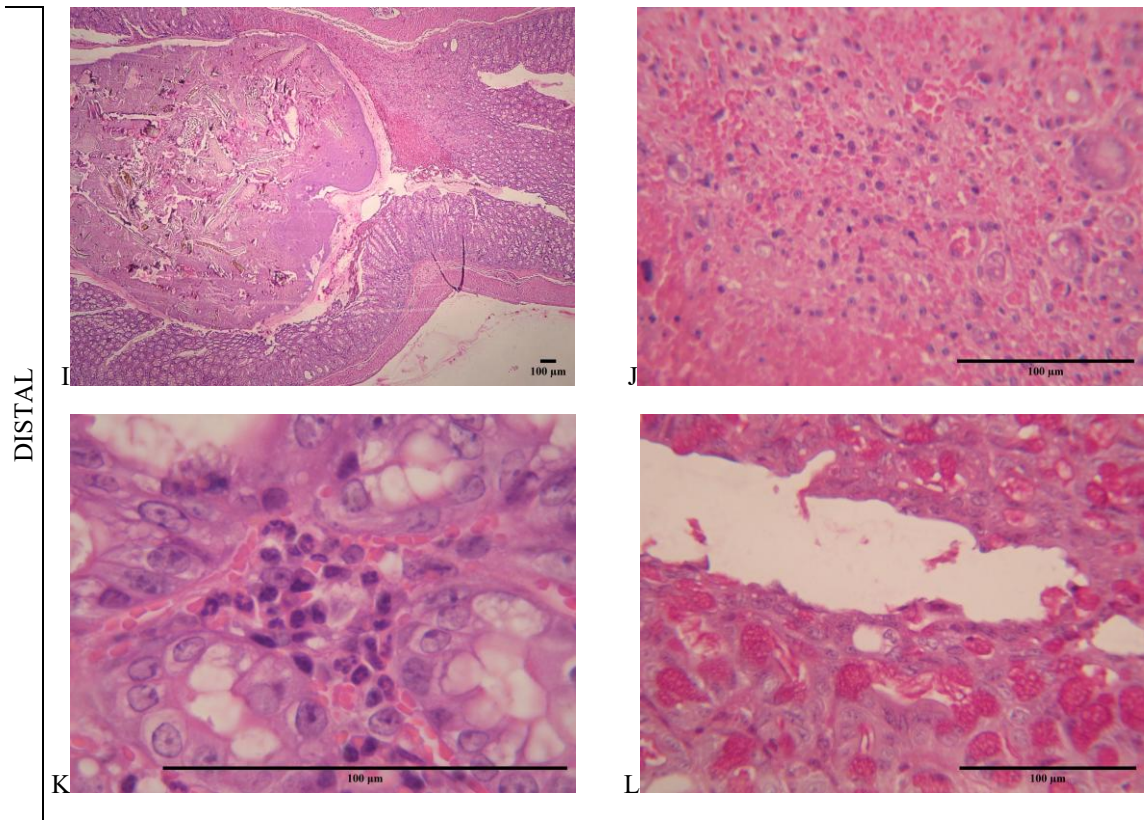
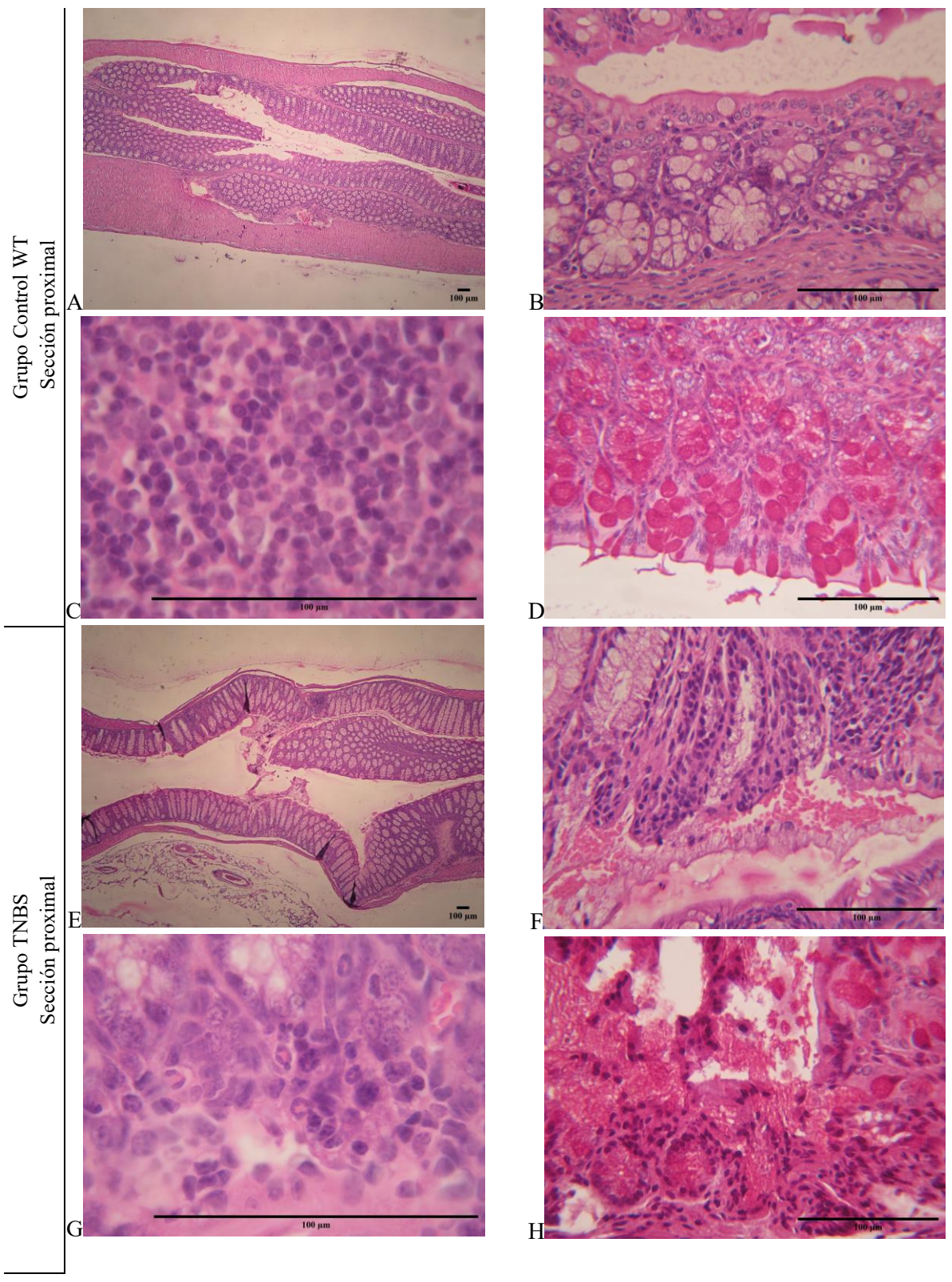


Figura 12: Cambios morfológicos en porciones proximal, medial y distal de colon de ratones BALB/c con colitis inducida por TNBS.

A, B, C, E, F, G, I, J, K: tinción H&E. D, H y L: histoquímica PAS. Barra de escala a 100µm.

Los individuos que culminaron el ensayo de experimentación mostraron un menor grado de erosión epitelial y hemorragia, con zonas de congestión (Figura 13). Al comparar el colon de estos individuos con el de los controles WT (Figura 13 A-D), los principales hallazgos observables fueron zonas de erosión epitelial, hemorragia y congestión en grados variables (Figura 13E y F, I y J, y M y N), la presencia de zonas de infiltrado celular mixto de grados variables en mucosa y submucosa, se encontraban en las 3 zonas observadas en colon (Figura 13C, G, K y Ñ) y pérdida de PAS-positividad en la región apical y en zonas erosionadas (Figura 13D, H, L y O).



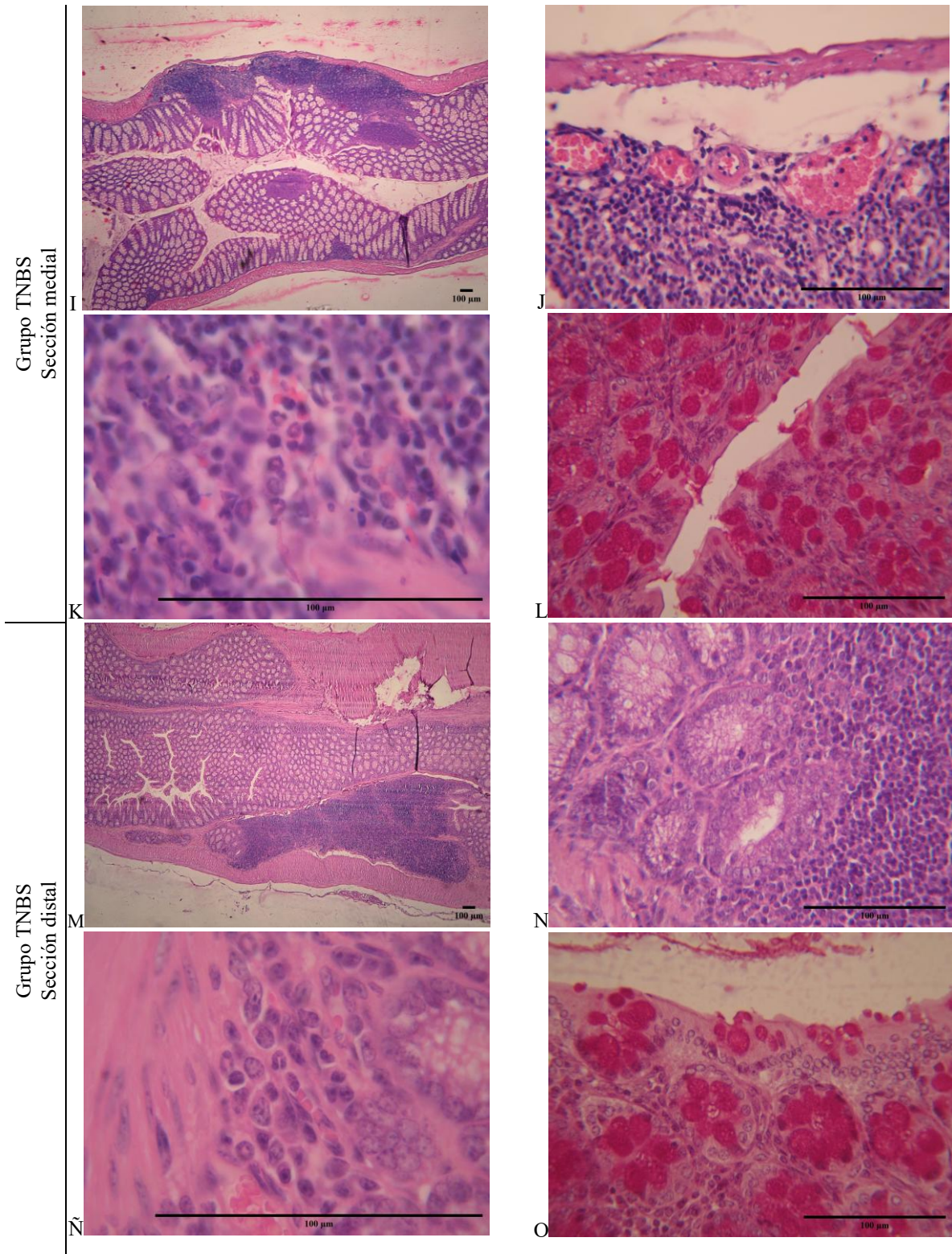
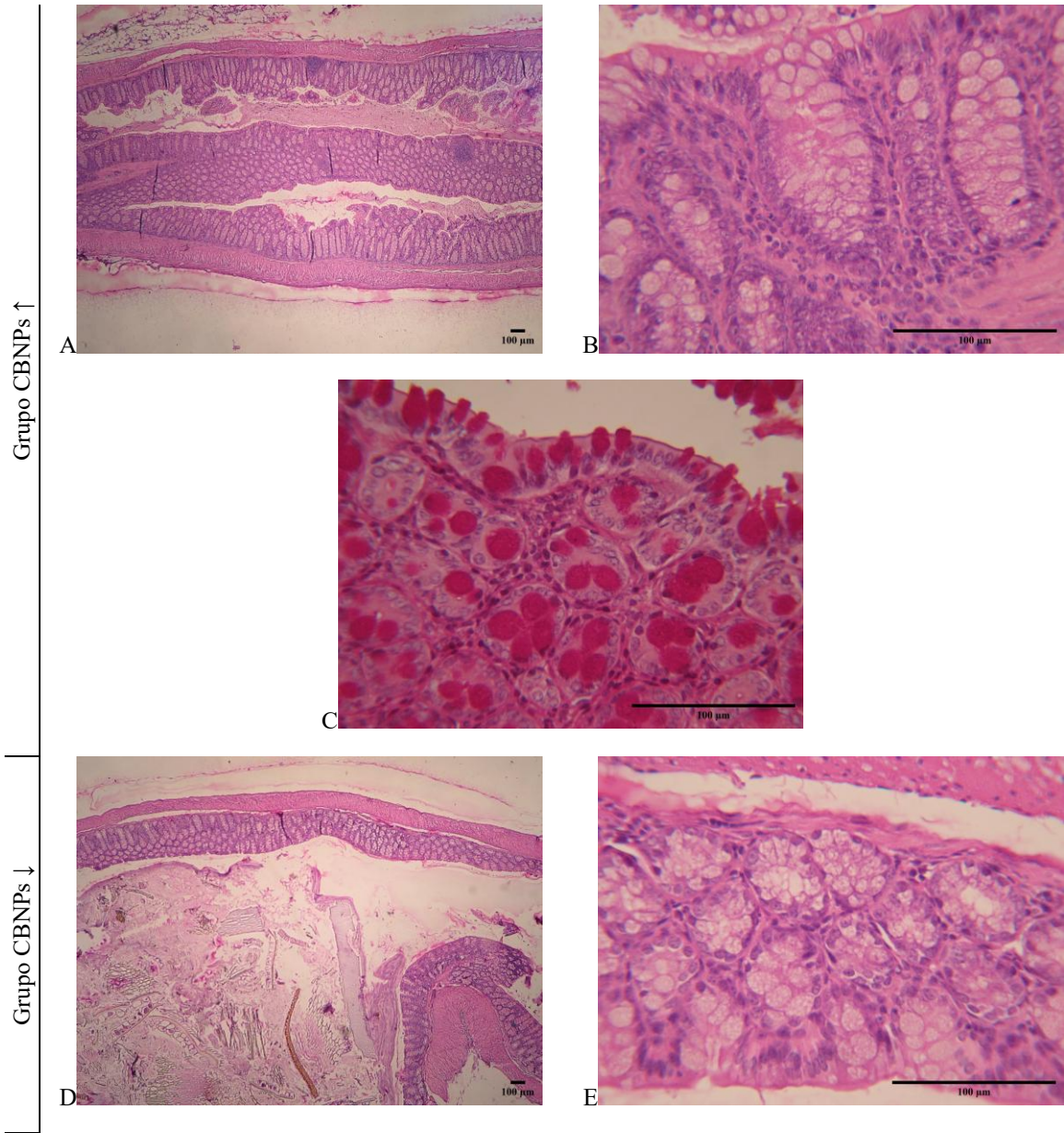
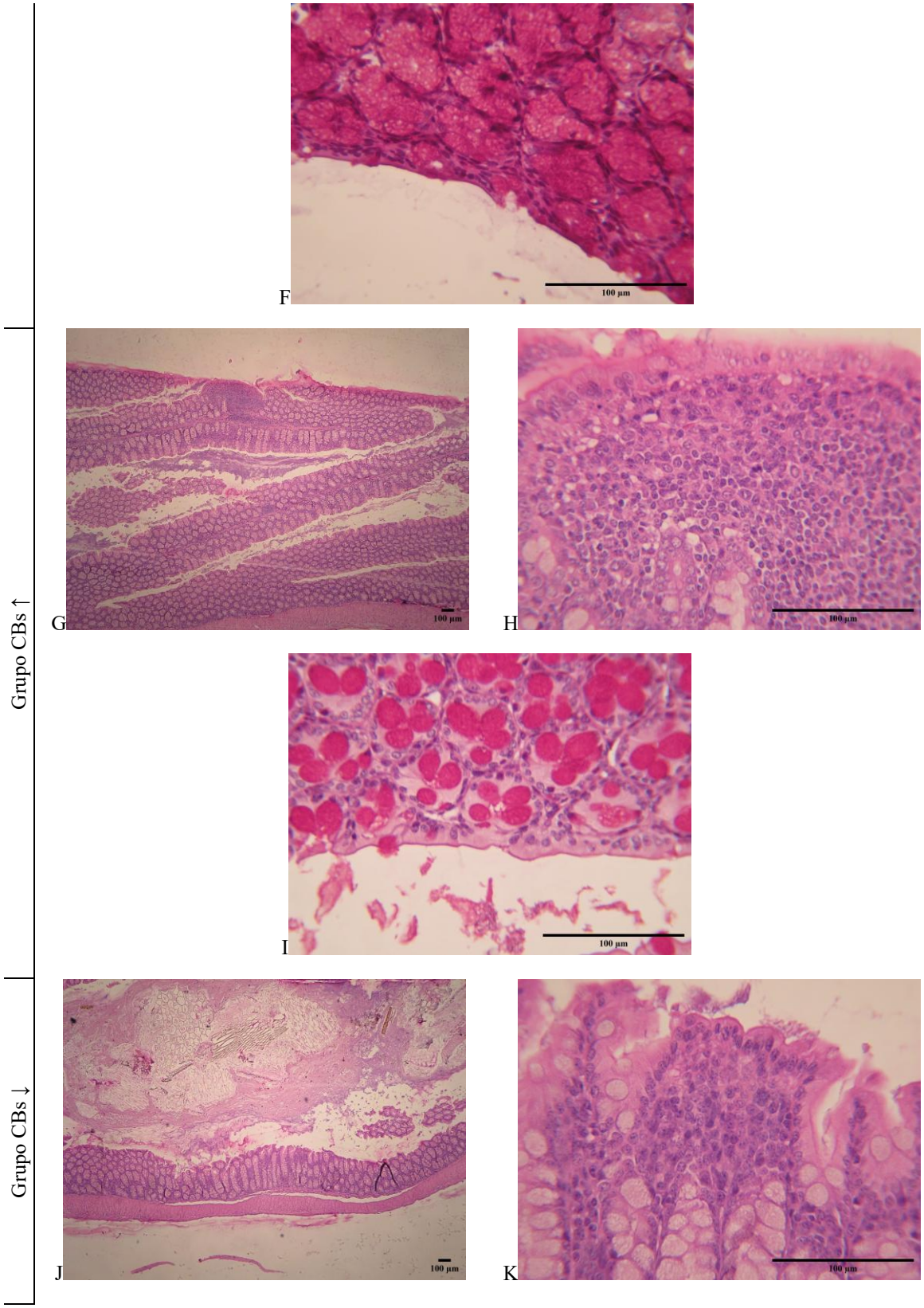


Figura 13: Cambios morfológicos en colon de ratones BALB/c sanos (Grupo WT) y como modelo murino de colitis inducida por TNBS.

A, B, C, E, F, G, I, J, K, L, M, Ñ tinción H&E. D, H, L y O histoquímica PAS. Barra de escala a 100µm.

Interesantemente, en los grupos tratados con cannabinoides (y nanopartículas de cannabinoides) (Figura 14) se observaron estas regiones extendidas de erosión epitelial o hemorragia (Figura 14 A y B; D y E; G y H). Esto no era evidente en el colon de animales tratados con solo con TNBS y los vehículos (Figura 14 M-Ñ).





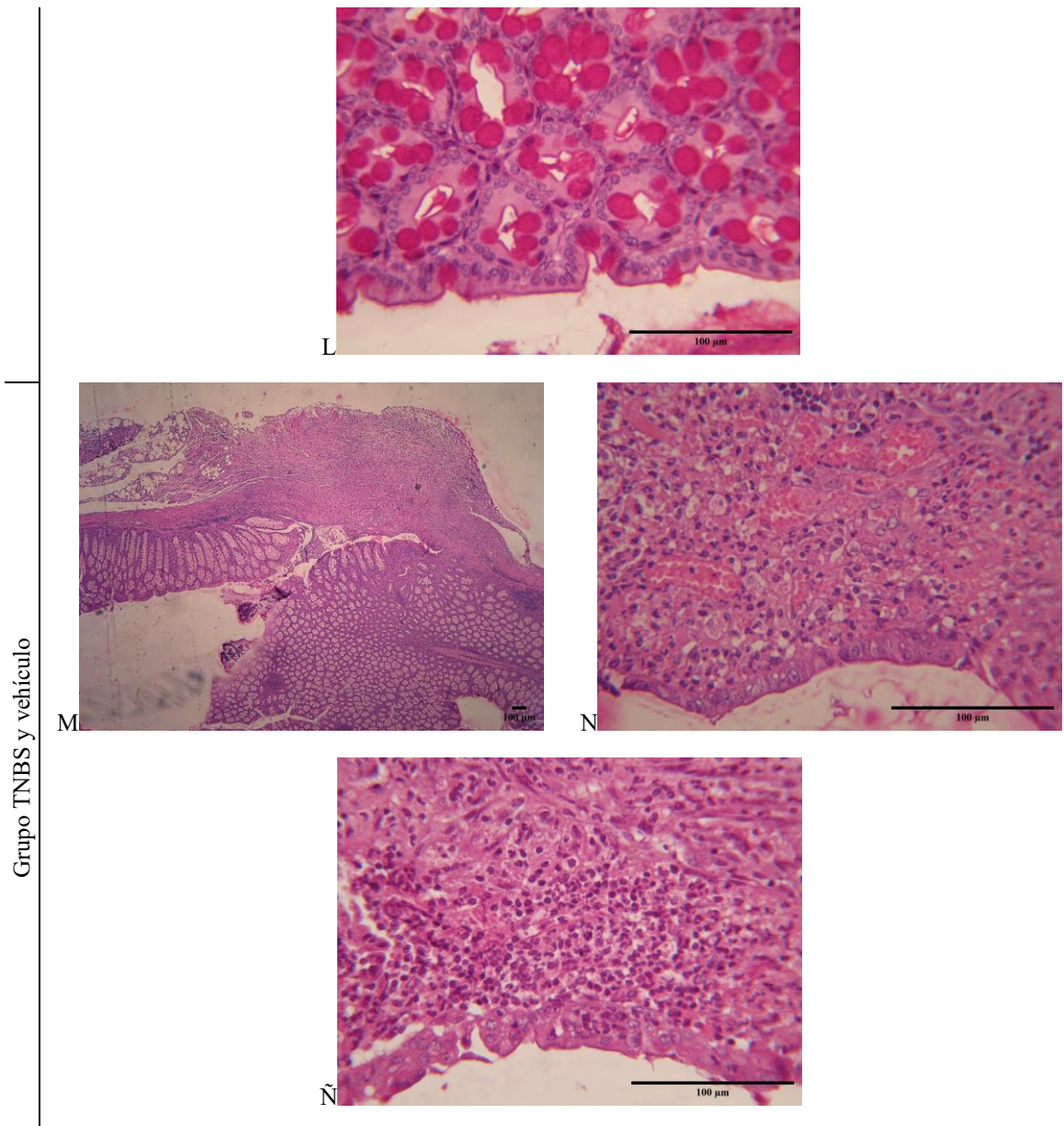


Figura 14: Cambios morfológicos en secciones de colon de ratones BALB/c como modelo murino de colitis inducida por TNBS bajo efecto de los diferentes tratamientos.

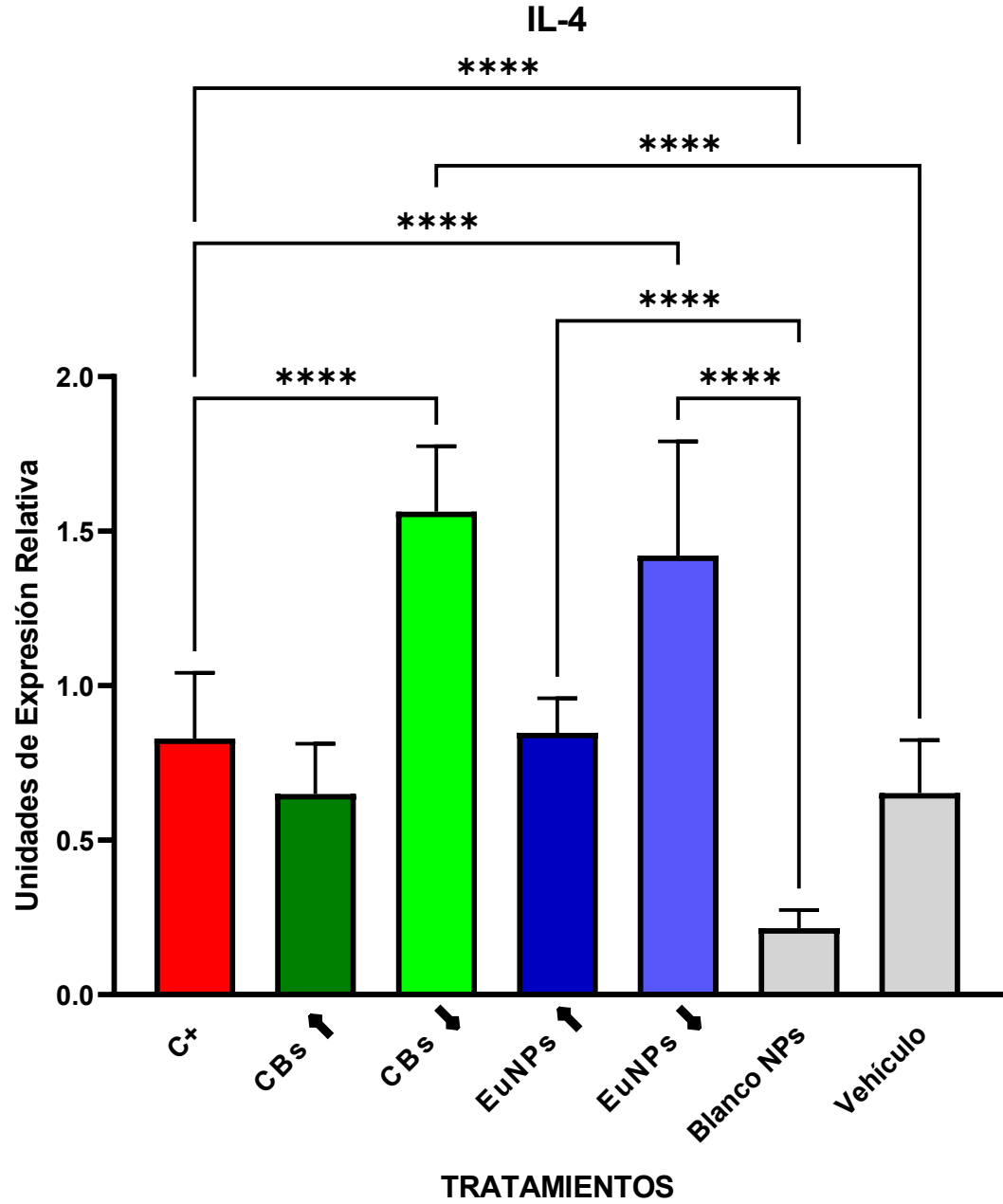
CBNPs, Nanopartículas de cannabinoides; CBs, cannabinoides; ↑, dosis alta; ↓, dosis baja. A, B, D, E, G, H, J, K, M y N tinción H&E. C, F, I, L y Ñ histoquímica PAS. Barra de escala a 100μm.

7.3.2. *Análisis de expresión de ARNm de tejido colónico*

Se tomaron secciones de colon y se dispusieron en tiocianato de guanidina (TRIzol) para la conservación del contenido genómico y disociación de proteínas. Se realizó una extracción de ARN total y una retrotranscripción. Posteriormente ese realizó el qPCR de

un gen antiinflamatorio IL-4, un gen proinflamatorio TNF α y un gen normalizador Gpd-1. Los resultados se analizaron utilizando el método $2^{\Delta\Delta Ct}$ y se graficaron (Figura 15).

A



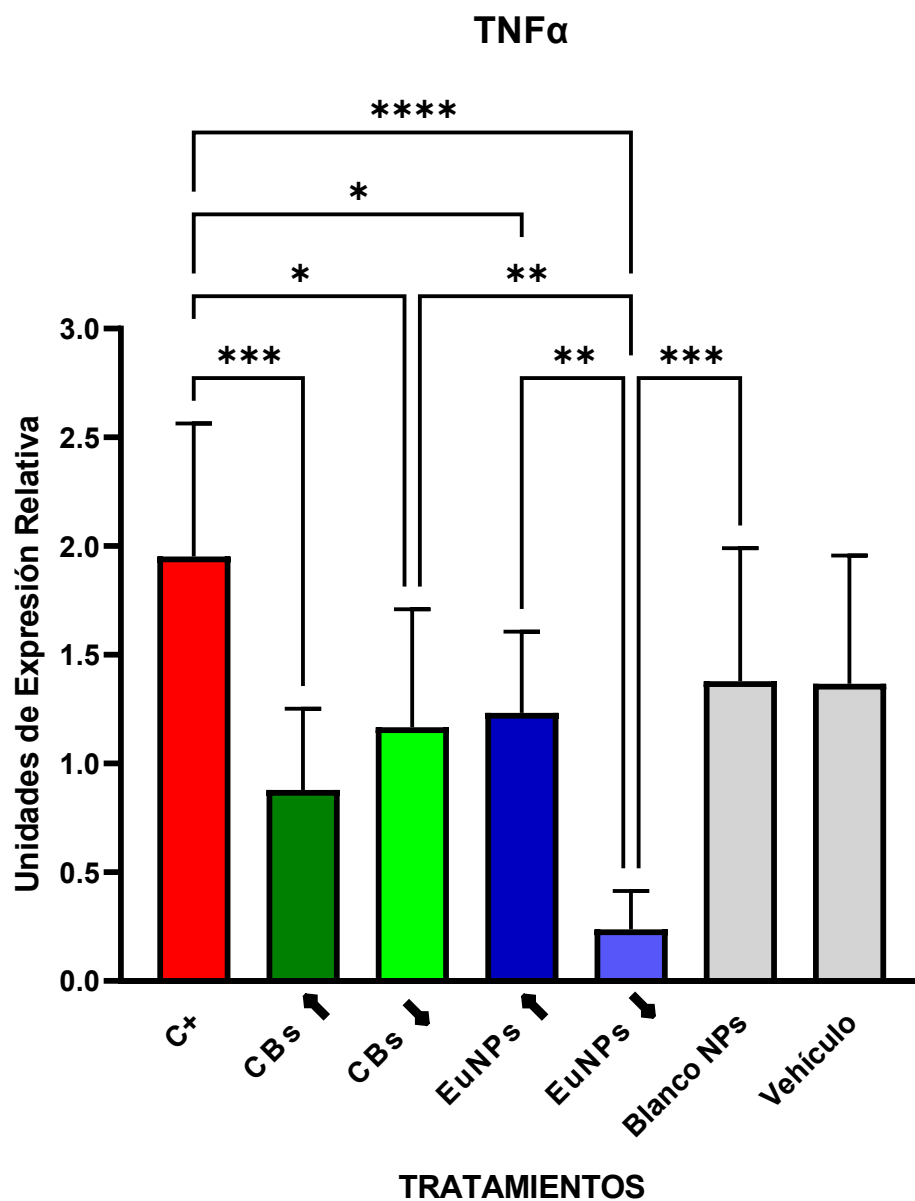
B

Figura 15: Efecto de los cannabinoides y EuNPs en la expresión de ARNm de A) IL4 y B) TNF α en colon de un modelo de colitis inducido por TNBS.

TNBS: ácido trinitrobenzenosulfónico; C+: control positivo a colitis; CBs: cannabinoides; EuNPs: nanopartículas de Eudragit L-100; Blanco NPs: nanopartículas vacías; ns: no significativo. *P< 0.05 **P<0.01 ***P<0.005 ****P<0.0001

Los tratamientos con cannabinoides y nanopartículas de cannabinoides a dosis baja incrementó significativamente la expresión de IL-4 en individuos con colitis inducida por TNBS (Figura 15A). Este aumento fue estadísticamente mayor en comparación con el

grupo control positivo de colitis, así como con los grupos tratados con nanopartículas vacías y con el vehículo del tratamiento ($P < 0.0001$). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con cannabinoides y nanopartículas a dosis baja ($P > 0.05$), indicando que ambos ejercen un efecto similar sobre la expresión de IL-4. En contraste, el tratamiento con nanopartículas a dosis alta no generó un aumento significativo de IL-4 respecto al control positivo. Sin embargo, presentó diferencias con respecto al grupo de nanopartículas vacías ($P < 0.0001$), sugiriendo un efecto moderado.

En cuanto a la expresión de TNF- α (Figura 15B), se observó una reducción tras el tratamiento con cannabinoides y nanopartículas, tanto en dosis alta como baja. Esta disminución fue significativa para los cannabinoides a dosis alta y baja ($P < 0.05$), así como para las nanopartículas a dosis alta ($P < 0.05$) y baja ($P < 0.0001$). No obstante, en la mayoría de los casos, estos tratamientos no mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto a sus controles con vehículo ($P > 0.05$), excepto en el tratamiento con nanopartículas de cannabinoides a dosis baja, el cual presentó una reducción significativa en la expresión de TNF- α , a comparación con el grupo tratado con nanopartículas vacías ($P < 0.005$). Este mismo tratamiento fue además el más efectivo, mostrando una mayor disminución de TNF- α en comparación con los cannabinoides a dosis baja y con las nanopartículas a dosis alta ($P < 0.01$).

Estos resultados en conjunto destacan que el tratamiento con nanopartículas de cannabinoides a dosis baja es el más eficaz dentro de los evaluados, al promover simultáneamente un aumento significativo en la expresión de IL-4, una citocina antiinflamatoria; y reducción marcada de TNF- α , un mediador clave de la inflamación.

8. DISCUSIÓN

En el tracto gastrointestinal se encuentran expresados componentes del sistema endocannabinoide y endocannabinoidoma, como receptores CB1 y CB2, los endocannabinoides anandamida (AEA) y 2-araquidonil glicerol (2-AG) (Camilleri & Zheng, 2023); así como otros receptores con afinidad por cannabinoides, tales como GPR55, GPR119, PPARs y TRPV1; junto con ligandos similares a endocannabinoides. Estos componentes han sido asociados con una variedad de funciones biológicas, como regulación de la neurotransmisión del sistema nervioso entérico en la permeabilidad y motilidad intestinal, la función del sistema inmune, la homeostasis de glucosa y el metabolismo lipídico, entre otros. Además, desempeñan un papel crucial en procesos inflamatorios intestinales. Diversos estudios han explorado el rol de la endocannabinoidoma y el potencial antiinflamatorio de cannabinoides como el cannabidiol y el cannabigerol en diferentes modelos celulares, animales y estudios clínicos (Deiana, 2017; Pistis & O'Sullivan, 2017), así como su implicación en la inflamación crónica intestinal (Carvalho et al., 2020; Lima et al., 2022).

En modelos *in vitro* de células Caco-2, se ha investigado el papel de algunos de estos receptores y ligandos. Por ejemplo, se ha descrito que los endocannabinoides y mediadores similares a endocannabinoides están involucrados en la regulación de la permeabilidad intestinal (Alhamoruni et al., 2010; Karwad et al., 2019). En un estudio de (Lee et al., 2022), se describió brevemente el efecto del cannabidiol en células Caco-2, reportando una IC50 de 20 μ M para esta línea celular utilizando la técnica de MTT. Mientras que en otro estudio, se reportó una IC50 de 48.58 μ M a las 24 horas y de 35.13 μ M a las 72 horas (Russo et al., 2021). Por su parte, (Rožanc et al., 2021) evaluaron extractos de la planta de cannabis, así como los cannabinoides puros THC y CBD, en células Caco-2 y células epiteliales humanas de intestino (HUIEC). Los extractos utilizados contenían otros cannabinoides, como cannabícromeno, ácido cannabigerólico y cannabíinol. Los autores reportaron que estos extractos redujeron selectivamente la viabilidad celular, siendo este efecto más pronunciado en células Caco-2, especialmente con los cannabinoides puros CBD y THC. Similarmente, en el presente estudio se analizó

el impacto individual y combinado del cannabidiol y el cannabigerol en la actividad metabólica de estas células por medio del ensayo de MTT.

Nuestros resultados muestran una disminución dosis-dependiente de la actividad metabólica celular, especialmente al tratar las células con una combinación de los cannabinoides en conjunto, lo que se reflejó con una IC₅₀ de 12.75 μM . Por separado, la IC₅₀ para el cannabidiol fue de 24.37 μM , mientras que para el cannabigerol fue de 40.62 μM . Estos resultados contrastan con los hallazgos de (Rožanc et al., 2021), quienes utilizaron extractos de cannabis que contenían más de dos cannabinoides de diferentes familias químicas, sobre la línea celular Caco-2. En su estudio, los extractos con múltiples cannabinoides tuvieron un impacto menor en la viabilidad celular en comparación con los cannabinoides solos, reportando una IC₅₀ de cannabidiol de 19.27 μM . Esta discrepancia podría deberse a las diferencias en las concentraciones relativas de los cannabinoides presentes en los extractos utilizados y, posiblemente, a un evento conocido como “efecto séquito”, en el cual la presencia de varios cannabinoides puede generar interacciones farmacodinámicas que modulan los efectos de los compuestos individuales (Christensen et al., 2023). Además, diversos estudios han utilizado agentes farmacológicos para evaluar su efecto en la inflamación inducida por el ácido trinitrobenceno sulfónico (TNBS) en modelos de colitis (Sui et al., 2024). Un estudio, células Caco-2 tratadas con ácido dinitrobencenosulfónico (DNBS), demostró que la administración de cannabidiol redujo la producción de especies reactivas de oxígeno y la peroxidación lipídica, lo que sugiere un efecto protector frente a los daños causados en la inflamación intestinal (Borrelli et al., 2009).

Uno de los principales desafíos en el uso terapéutico de los cannabinoides es su baja solubilidad en agua. De acuerdo con la literatura, los sistemas de nanoentrega pueden conferir solubilidad a moléculas lipofílicas e insolubles en agua, como es el caso de los cannabinoides. Su naturaleza lipofílica es una de las principales razones que explican su absorción irregular. Principalmente, el empleo de sistemas de nanoentrega ha demostrado ser eficaz para mejorar la solubilidad de compuestos como los cannabinoides, lo que podría contribuir a incrementar su biodisponibilidad (Grifoni et al., 2022). En este contexto, las nanopartículas poliméricas de PLGA, Eudragit L-100 y zeína han demostrado ser

vehículos de nanodimensionamiento de cannabinoides prometedores para mejorar la solubilidad acuosa de los cannabinoides. De manera similar a la metodología utilizada en el presente estudio, un trabajo previo sintetizó nanopartículas de zeína y proteína de suero cargadas con cannabinoides mediante la técnica de precipitación antisolvente. Este estudio reportó tamaños de partículas que variaban entre 203.6 ± 1.87 nm a 344.28 ± 4.14 nm, dependiendo de las concentraciones de reactivos. Además, se reportaron índices de polidispersidad (PDI) en rangos de entre 0.20 a 0.36; y una eficiencia de encapsulación (EE) del 69% (C. Wang et al., 2022). En el presente estudio, las nanopartículas de zeína mostraron un tamaño promedio de 144.8 ± 41.6 nm, un PDI de 0.148 y una EE del $69.99\% \pm 2.68$. Por otro lado, (Fraguas-Sánchez et al., 2020) emplearon una metodología de emulsión y evaporación de solvente para sintetizar nanopartículas de PLGA cargadas de CBD. Los autores reportaron tamaños de nanopartículas entre 229 ± 2 y 236 ± 12 nm, con PDI de 0.165 y una EE que varió entre $78.08\% \pm 1.98$ y $95.22\% \pm 3.12$. En este estudio, utilizando una metodología similar, las nanopartículas de PLGA cargadas con CBD y CBG mostraron tamaños de 144.8 ± 2.40 nm y 123.9 ± 1.25 nm, con PDIs de 0.089 y 0.099, respectivamente. La EE de 92.12% y 98.83% , en nanopartículas de PLGA cargadas de CBD y CBG, respectivamente, valores que se encuentran dentro de los rangos reportados por Fraguas-Sánchez et al., (2020). En relación con el polímero Eudragit L-100, se realizó un estudio en el que se sintetizaron sistemas de nanodimensionamiento cargados con CBD y CBG a base de fibras electrohiladas hidrosolubles por medio de la técnica de electrohilado (Andriotis et al., 2021).

Los resultados mostraron tamaños de $1\mu\text{m}$ a $5.87\mu\text{m}$, con EEs de un 90.5 a un 99%. Es importante señalar que el sistema de nanoentrega desarrollado por Andriotis et al., (2021) es diferente en notables aspectos al reportado en este estudio, tanto en la morfología de las fibras electrohiladas como su metodología de síntesis, que en nuestro caso se centró en la producción de nanopartículas. Nuestros sistemas basados en Eudragit L-100 presentaron tamaños de 41.8 ± 0.67 nm y 50.64 ± 0.40 nm; con EEs de 94.3% y 98.73% , para partículas de CBD y CBG, respectivamente, lo que refleja una eficiencia de encapsulación comparable a la observada en otros sistemas. Por último, las nanopartículas metálicas han ganado importancia gracias a sus cualidades físico-químicas únicas (Lazzarotto Rebelatto et al., 2023).

En un estudio previo, se formularon nanopartículas de oro y plata mediante una “síntesis verde” a partir de extractos acuosos de *Cannabis sativa* con el fin de evaluar su efecto en la inhibición de biofilms (efecto antimicrobiano). Sin embargo, un extracto acuoso no es el vehículo óptimo para obtener cannabinoides debido a su cualidad lipofílica (P. Singh et al., 2018). Una de las principales razones para descartar el uso de nanopartículas de oro (AuNPs) fue la insolubilidad de los cannabinoides en medios acuosos. El vehículo utilizado para la síntesis en el presente estudio fue etanol, obstaculizando su administración en cultivos celulares y en animales. Finalmente, la síntesis del nanocomplejo oro-zeína (ZeAuNPs), aunque *in vitro* mostró resultados interesantes en la concentración más baja, la reproducibilidad de la metodología de síntesis requería de una re-estandarización, lo que aumentó el tiempo necesario para obtener resultados consistentes. Al analizar los resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad celular mediante la técnica de MTT en células Caco-2, tratadas con cannabinoides libres y los diferentes sistemas de entrega, las nanopartículas EuNP y PLGA-NP mostraron menor citotoxicidad a concentraciones similares de cannabinoides al tratarse durante 24 horas. En base a estos resultados, la elección de utilizar EuNPs como sistema de nanoentrega de cannabinoides para estudios posteriores se fundamentó en su efecto más constante sobre la viabilidad celular a diferentes concentraciones, así como en su IC50 más alta en comparación con otros SNEs y CBs, además de la alta reproducibilidad de la metodología de síntesis por precipitación antisolvente. Este SNE fue empleado en células Caco-2 tratadas con TNBS para evaluar su efecto en la viabilidad celular. Nuestros hallazgos indican que la administración de 23.7 μ M de cannabinoides nanoencapsulados con Eudragit L100 inhibió el efecto del TNBS en la disminución de la viabilidad celular a las 48 horas de tratamiento. En trabajos previos han diseñado sistemas nanométricos para la entrega de cannabinoides, principalmente de cannabidiol, para su evaluación *in vitro*. Por ejemplo, (Navarro et al., 2021) desarrollaron nanopartículas a base de los polímeros de PLGA, polietilenglicol-PLGA (PEG-PLGA) y PEG-PLGA-Maleimida (PEG-PLGA-Mal), cargadas con el cannabinoide sintético JWH-133, cannabinoide agonista selectivo CB2, para tratamiento de ateroma. Los autores obtuvieron partículas de tamaño promedio de 150-200 Mas recientemente, (Alcantara et al., 2024) diseñaron nanopartículas lipídicas sólidas cargadas con CBD para tratar inflamación crónica. Estas NPs tuvieron tamaño

promedio de 123 ± 2.00 nm con eficiencia de carga del 95.16% mostrando propiedades de liberación controlada y prolongada. Los estudios *in vitro* indicaron que las nanopartículas mostraron reducir especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico y citocinas proinflamatorias TNF α e IL-6 en líneas celulares de condrocitos y macrófagos.

En cuanto al modelo de colitis inducido por TNBS fue basado en lo reportado por (Schicho & Storr, 2012) y (Mar-Solís et al., 2021). Por su parte, (Schicho & Storr, 2012) evaluaron el efecto de la administración de cannabidiol (CBD) en el proceso inflamatorio inducido por TNBS en colon de ratones CD1. En ambos trabajos, el tratamiento con TNBS mostró provocar lesiones características de colitis en colon, tales como destrucción del epitelio intestinal y aumento en el infiltrado celular inflamatorio. En nuestro estudio, la administración intrarrectal de TNBS en ratones BALB/c produjo daños similares en distintas partes del colon, visto a través de tinción H&E e histoquímica de PAS. (Schicho & Storr, 2012) concluyeron que la administración de cannabidiol por la vía intraperitoneal e intrarrectal representaban rutas de administración útiles para tratar la inflamación de colon. En la literatura revisada, solo un trabajo ha evaluado el efecto antiinflamatorio de nanopartículas de cannabinoides en un modelo *in vivo* de enfermedad inflamatoria intestinal. En este estudio, (Zhang et al., 2024) diseñaron nanopartículas autoensamblantes de polímeros inulina, bromuro de trifetilfosfonio y ácido α -lipóico (TPP-IN-LA), para mejorar las cualidades anticolitis del cannabidiol. Las nanopartículas obtenidas tuvieron un tamaño de 143 ± 3.11 nm y eficiencia de encapsulación de 59.71%. Las nanopartículas y sus respectivos controles, en donde se incluyó CBD libre, fueron administrados durante 21 días en un modelo murino de colitis ulcerativa inducido por DSS en el agua potable, iniciando al día 15 de los tratamientos. Se realizó análisis de cuantificación de niveles de actividad de mieloperoxidasa (MPO), un indicador de la actividad neutrofílica relacionado al grado de inflamación, y de factores proinflamatorios como NO, TNF α , IL-1 β , IL-4 e IL-10 en tejido de colon, además de análisis histológico por tinción H&E e histoquímica de PAS, entre otros. Los autores reportaron que los tratamientos con cannabinoide libre y nanoencapsulado mostraron disminuir los efectos productores de colitis del DSS como la pérdida de peso, diarreas, heces con sangre y daño tisular. Finalmente, los autores reportaron que el CBD libre y nanoencapsulado mostraron disminuir los niveles de factores proinflamatorios y aumentar los antiinflamatorios, reportando un mayor efecto

antiinflamatorio en los animales tratados con nanopartículas de CBD. De manera similar, en el presente estudio, ambas formas de administración de cannabinoides (CBs y EuNPs) mostraron proteger al colon del daño causado por el TNBS, así como disminuir la expresión de la citocina proinflamatoria TNF α y aumentar la de IL-4, teniendo un mayor efecto mencionado cuando los cannabinoides se encontraban encapsulados con el polímero Eudragit L100.

9. CONCLUSIONES

La nanoencapsulación de cannabinoides permite mantenerlos en una solución acuosa, aumentando potencialmente su biodisponibilidad y disminuyendo su citotoxicidad *in vitro*.

Los cannabinoides CBD y CBG en una relación 1:1 nanoencapsulados muestran un efecto citoprotector *in vitro* e *in vivo* ante la exposición del agente productor de colitis TNBS en células Caco-2.

La administración de CBD y CBG solubles y nanoencapsulados con el polímero Eudragit L100 disminuyen el efecto proinflamatorio del TNBS en colon, siendo superior cuando se encuentran nanoencapsulados.

10. PERSPECTIVAS

El presente trabajo de investigación es de los primeros en evaluar el efecto antiinflamatorio de los cannabinoides CBD y CBG solubles y nanoencapsulados en un modelo *in vivo* de colitis inducido por TNBS. Los resultados indican que la nanoencapsulación de cannabinoides para el tratamiento de colitis es una herramienta terapéutica con potencial benéfico para quienes padecen enfermedad inflamatoria intestinal y es una alternativa que merece ser explorada a profundidad

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcantara, K. P., Malabanan, J. W. T., Nalinratana, N., Thitikornpong, W., Rojsitthisak, P., & Rojsitthisak, P. (2024). Cannabidiol-Loaded Solid Lipid Nanoparticles Ameliorate the Inhibition of Proinflammatory Cytokines and Free Radicals in an In Vitro Inflammation-Induced Cell Model. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(9). <https://doi.org/10.3390/ijms25094744>
- Alhamoruni, A., Lee, A. C., Wright, K. L., Larvin, M., & O'Sullivan, S. E. (2010). Pharmacological effects of cannabinoids on the Caco-2 cell culture model of intestinal permeability. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 335(1), 92–102. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.168237>
- Andriotis, E. G., Chachlioutaki, K., Monou, P. K., Bouropoulos, N., Tzetzis, D., Barmpalexis, P., Chang, M.-W., Ahmad, Z., & Fatouros, D. G. (2021). Development of Water-Soluble Electrospun Fibers for the Oral Delivery of Cannabinoids. *AAPS PharmSciTech*, 22(1), 23. <https://doi.org/10.1208/s12249-020-01895-7>
- Assadpour, E., Rezaei, A., Das, S. S., Krishna Rao, B. V., Singh, S. K., Kharazmi, M. S., Jha, N. K., Jha, S. K., Prieto, M. A., & Jafari, S. M. (2023). Cannabidiol-Loaded Nanocarriers and Their Therapeutic Applications. *Pharmaceuticals*, 16(4), 487. <https://doi.org/10.3390/ph16040487>
- Bhatia, S. (2016). Natural Polymer Drug Delivery Systems. In *Natural Polymer Drug Delivery Systems: Nanoparticles, Plants, and Algae*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-41129-3>
- Borrelli, F., Aviello, G., Romano, B., Orlando, P., Capasso, R., Maiello, F., Guadagno, F., Petrosino, S., Capasso, F., Di Marzo, V., & Izzo, A. A. (2009). Cannabidiol, a safe and non-psychotropic ingredient of the marijuana plant *Cannabis sativa*, is protective in a murine model of colitis. *Journal of Molecular Medicine*, 87(11), 1111–1121. <https://doi.org/10.1007/s00109-009-0512-x>
- Brierley, D. I., Samuels, J., Duncan, M., Whalley, B. J., & Williams, C. M. (2016). Cannabigerol is a novel, well-tolerated appetite stimulant in pre-satiated rats. *Psychopharmacology*, 233(19–20), 3603–3613. <https://doi.org/10.1007/s00213-016-4397-4>
- Camilleri, M., & Zheng, T. (2023). Cannabinoids and the Gastrointestinal Tract. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 21(13), 3217–3229. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2023.07.031>
- Carvalho, A. C. A. de, Souza, G. A. de, Marqui, S. V. de, Guiguer, É. L., Araújo, A. C., Rubira, C. J., Goulart, R. de A., Flato, U. A. P., Bueno, P. C. D. S., Buchaim, R. L., & Barbalho, S. M. (2020). Cannabis and Canabidinoids on the Inflammatory Bowel Diseases: Going Beyond Misuse. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8), 2940. <https://doi.org/10.3390/ijms21082940>
- Christensen, C., Rose, M., Cornett, C., & Allesø, M. (2023). Decoding the Postulated

- Entourage Effect of Medicinal Cannabis: What It Is and What It Isn't. *Biomedicines*, 11(8), 1–25. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11082323>
- Dasram, M. H., Walker, R. B., & Khamanga, S. M. (2022). Recent Advances in Endocannabinoid System Targeting for Improved Specificity: Strategic Approaches to Targeted Drug Delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21). <https://doi.org/10.3390/ijms232113223>
- de Mattos, B. R. R., Garcia, M. P. G., Nogueira, J. B., Paiatto, L. N., Albuquerque, C. G., Souza, C. L., Fernandes, L. G. R., Tamashiro, W. M. D. S. C., & Simioni, P. U. (2015). Inflammatory Bowel Disease: An Overview of Immune Mechanisms and Biological Treatments. *Mediators of Inflammation*, 2015, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2015/493012>
- Deiana, S. (2017). Potential Medical Uses of Cannabigerol: A Brief Overview. In *Handbook of Cannabis and Related Pathologies: Biology, Pharmacology, Diagnosis, and Treatment*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800756-3.00115-0>
- Dewi, M. K., Chaerunisaa, A. Y., Muhaimin, M., & Joni, I. M. (2022). Improved Activity of Herbal Medicines through Nanotechnology. *Nanomaterials*, 12(22). <https://doi.org/10.3390/nano12224073>
- ElSohly, M. A., Radwan, M. M., Gul, W., Chandra, S., & Galal, A. (2017). Phytochemistry of Cannabis sativa L. In *Phytocannabinoids: Unraveling the Complex Chemistry and Pharmacology of Cannabis sativa* (Springer, Vol. 103, pp. 1–36). Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45541-9_1
- Eltantawy, N., El-Zayyadi, I. A. E. H., Elberry, A. A., Salah, L. M., Abdelrahim, M. E. A., & Kassem, A. B. (2023). A review article of inflammatory bowel disease treatment and pharmacogenomics. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s43088-023-00361-0>
- Ewing, L. E., Skinner, C. M., Quick, C. M., Kennon-McGill, S., McGill, M. R., Walker, L. A., ElSohly, M. A., Gurley, B. J., & Koturbash, I. (2019). Hepatotoxicity of a Cannabidiol-Rich Cannabis Extract in the Mouse Model. *Molecules*, 24(9), 1694. <https://doi.org/10.3390/molecules24091694>
- Farag, S., & Kayser, O. (2017). The Cannabis Plant: Botanical Aspects. In A. Press (Ed.), *Handbook of Cannabis and Related Pathologies: Biology, Pharmacology, Diagnosis, and Treatment* (Issue January, pp. 3–12). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800756-3.00001-6>
- Farjadian, F., Ghasemi, A., Gohari, O., Roointan, A., Karimi, M., & Hamblin, M. R. (2019). Nanopharmaceuticals and nanomedicines currently on the market: Challenges and opportunities. In *Nanomedicine* (Vol. 14, Issue 1). <https://doi.org/10.2217/nmm-2018-0120>
- Fernández-Ruiz, J., Romero, J., & Ramos, J. A. (2015). Endocannabinoids and Neurodegenerative Disorders: Parkinson's Disease, Huntington's Chorea,

- Alzheimer's Disease, and Others. In R. G. Pertwee (Ed.), *Endocannabinoids* (Vol. 231, pp. 233–259). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20825-1_8
- Fraguas-Sánchez, A. I., Torres-Suárez, A. I., Cohen, M., Delie, F., Bastida-Ruiz, D., Yart, L., Martin-Sabroso, C., & Fernández-Carballido, A. (2020). PLGA nanoparticles for the intraperitoneal administration of CBD in the treatment of ovarian cancer: In vitro and in Ovo assessment. *Pharmaceutics*, *12*(5), 1–19. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12050439>
- Gaoni, Y., & Mechoulam, R. (1964). Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *Journal of the American Chemical Society*, *86*(8), 1646–1647. <https://doi.org/10.1021/ja01062a046>
- Grifoni, L., Vanti, G., Donato, R., Sacco, C., & Bilia, A. R. (2022). Promising Nanocarriers to Enhance Solubility and Bioavailability of Cannabidiol for a Plethora of Therapeutic Opportunities. *Molecules*, *27*(18). <https://doi.org/10.3390/molecules27186070>
- Grill, M., Hasenoehrl, C., Storr, M., & Schicho, R. (2018). Medical Cannabis and Cannabinoids: An Option for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease and Cancer of the Colon? *Medical Cannabis and Cannabinoids*, *1*(1), 28–35. <https://doi.org/10.1159/000489036>
- Gülck, T., & Møller, B. L. (2020). Phytocannabinoids: Origins and Biosynthesis. *Trends in Plant Science*, *25*(10), 985–1004. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.05.005>
- Guo, B., Bian, Z., Qiu, H., Wang, Y., & Wang, Y. (2017). *Biological and clinical implications of herbal medicine and natural products for the treatment of inflammatory bowel disease*. 37–48. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nyas.13414>
- Hourfane, S., Mechqoq, H., Bekkali, A. Y., Rocha, J. M., & El Aouad, N. (2023). A Comprehensive Review on Cannabis sativa Ethnobotany, Phytochemistry, Molecular Docking and Biological Activities. *Plants*, *12*(6), 1–43. <https://doi.org/10.3390/plants12061245>
- Iffland, K., & Grotenhermen, F. (2017). An Update on Safety and Side Effects of Cannabidiol: A Review of Clinical Data and Relevant Animal Studies. *Cannabis and Cannabinoid Research*, *2*(1), 139–154. <https://doi.org/10.1089/can.2016.0034>
- Jergens, A. E., & Simpson, K. W. (2012). Inflammatory bowel disease in veterinary medicine. *Frontiers in Bioscience - Elite*, *4 E*(4), 1404–1419. <https://doi.org/10.2741/e470>
- Josiah, A. J., Pillai, S. K., Cordier, W., Nell, M., Twilley, D., Lall, N., & Ray, S. S. (2021). Cannabidiol-Mediated Green Synthesis, Characterization, and Cytotoxicity of Metal Nanoparticles in Human Keratinocyte Cells. *ACS Omega*, *6*(43), 29078–29090. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c04303>
- Karwad, M. A., Couch, D. G., Wright, K. L., Tufarelli, C., Larvin, M., Lund, J., &

- O'Sullivan, S. E. (2019). Endocannabinoids and endocannabinoid-like compounds modulate hypoxia-induced permeability in CaCo-2 cells via CB1, TRPV1, and PPAR α . *Biochemical Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.07.017>
- Kicman, A., & Toczek, M. (2020). The effects of cannabidiol, a non-intoxicating compound of cannabis, on the cardiovascular system in health and disease. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 18). <https://doi.org/10.3390/ijms21186740>
- Klumpers, L. E., & Thacker, D. L. (2019). A brief background on cannabis: From plant to medical indications. *Journal of AOAC International*, 102(2), 412–420. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.18-0208>
- Kok, L. Y., Bannigan, P., Sanaee, F., Evans, J. C., Dunne, M., Regenold, M., Ahmed, L., Dubins, D., & Allen, C. (2022). Development and pharmacokinetic evaluation of a self-nanoemulsifying drug delivery system for the oral delivery of cannabidiol. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 168(November 2021), 106058. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.106058>
- Kulpa, J., Lefever, T. W., Trexler, K. R., Henderson, R. G., MacNair, L., Toth, M. L., Vanapalli, S. A., Rahman, M., Gupta, S., & Bonn-Miller, M. O. (2023). Toxicity of Cannabigerol: Examination of Long-Term Toxicity and Lifespan in *Caenorhabditis elegans* and 14-Day Study in Sprague Dawley Rats. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 8(S1), S62–S70. <https://doi.org/10.1089/can.2023.0035>
- Lazzarotto Rebelatto, E. R., Rauber, G. S., & Caon, T. (2023). An update of nano-based drug delivery systems for cannabinoids: Biopharmaceutical aspects & therapeutic applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 635(February), 122727. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.122727>
- Lee, S.-H., Lee, H.-S., Tamia, G., Song, H.-J., & Wei, C.-I. (2022). Anticancer Activity of Cannabidiol (CBD) in Human Colorectal Cancer Cells: A Mechanistic Study. *Current Developments in Nutrition*. <https://doi.org/10.1093/cdn/nzac052.013>
- Lima, P. A., Berg, B. B., & Castor, M. G. M. e. (2022). Involvement of the cannabinoid system in chronic inflammatory intestinal diseases: opportunities for new therapies. *Intestinal Research*, 20(4), 392–417. <https://doi.org/10.5217/ir.2021.00160>
- Lu, Q., Yang, M. F., Liang, Y. J., Xu, J., Xu, H. M., Nie, Y. Q., Wang, L. S., Yao, J., & Li, D. F. (2022). Immunology of Inflammatory Bowel Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutics. *Journal of Inflammation Research*, 15(March), 1825–1844. <https://doi.org/10.2147/JIR.S353038>
- Malik, T. A. (2015). Inflammatory Bowel Disease. Historical Perspective, Epidemiology, and Risk Factors. In *Surgical Clinics of North America* (Vol. 95, Issue 6, pp. 1105–1122). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2015.07.006>
- Mar-Solís, L. M., Soto-Domínguez, A., Rodríguez-Tovar, L. E., Rodríguez-Rocha, H., García-García, A., Aguirre-Arzola, V. E., Zamora-Ávila, D. E., Garza-Arredondo, A. J., & Castillo-Velázquez, U. (2021). Analysis of the Anti-Inflammatory Capacity of Bone Broth in a Murine Model of Ulcerative Colitis. *Medicina*, 57(11), 1138.

<https://doi.org/10.3390/medicina57111138>

- Martínez, V., Iriondo De-Hond, A., Borrelli, F., Capasso, R., Del Castillo, M. D., & Abalo, R. (2020). Cannabidiol and other non-psychoactive cannabinoids for prevention and treatment of gastrointestinal disorders: Useful nutraceuticals? *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(9).
<https://doi.org/10.3390/ijms21093067>
- Milan, J., Niemczyk, K., & Kus-Liśkiewicz, M. (2022). Treasure on the Earth—Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications. *Materials*, *15*(9).
<https://doi.org/10.3390/ma15093355>
- Namdar, D., Voet, H., Ajjampura, V., Nadarajan, S., Mayzlish-Gati, E., Mazuz, M., Shalev, N., & Koltai, H. (2019). Terpenoids and phytocannabinoids co-produced in cannabis sativa strains show specific interaction for cell cytotoxic activity. *Molecules*, *24*(17). <https://doi.org/10.3390/molecules24173031>
- Navalakhe, R. M., & Nandedkar, T. D. (2007). Application of nanotechnology in biomedicine. *Indian Journal of Experimental Biology*, *45*(2), 160–165.
<https://doi.org/10.38007/ajeb.2022.030306>
- Navarro, L. M., Cala, C. M. C., González, M. D. H., Fuentes, J. Á., & Banderas, L. M. (2021). Development of selective cannabinoid nanoparticles to target the atheroma plaque. *RESCIFAR Revista Española de Ciencias Farmacéuticas*, *2*(2), 79–80.
- Pistis, M., & O’Sullivan, S. E. (2017). The Role of Nuclear Hormone Receptors in Cannabinoid Function. In *Advances in Pharmacology* (pp. 291–328).
<https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.03.008>
- Reddy, T. S., Zomer, R., & Mantri, N. (2023). Nanoformulations as a strategy to overcome the delivery limitations of cannabinoids. *Phytotherapy Research*, *37*(4), 1526–1538. <https://doi.org/10.1002/ptr.7742>
- Rožanc, J., Kotnik, P., Milojević, M., Gradišnik, L., Hrnčič, M. K., Knez, Ž., & Maver, U. (2021). Different cannabis sativa extraction methods result in different biological activities against a colon cancer cell line and healthy colon cells. *Plants*, *10*(3), 1–16. <https://doi.org/10.3390/plants10030566>
- Russo, C., Lavorgna, M., Nugnes, R., Orlo, E., & Isidori, M. (2021). Comparative assessment of antimicrobial, antiradical and cytotoxic activities of cannabidiol and its propyl analogue cannabidivarin. *Scientific Reports*, *11*(1), 1–13.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-01975-z>
- Saez, A., Herrero-Fernandez, B., Gomez-Bris, R., Sánchez-Martinez, H., & Gonzalez-Granado, J. M. (2023). Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease: Innate Immune System. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(2).
<https://doi.org/10.3390/ijms24021526>
- Schicho, R., & Storr, M. (2012). Topical and Systemic Cannabidiol Improves Trinitrobenzene Sulfonic Acid Colitis in Mice. *Pharmacology*, *89*(3–4), 149–155.
<https://doi.org/10.1159/000336871>

- Seyedian, S. S., Nokhostin, F., & Malamir, M. D. (2019). A review of the diagnosis, prevention, and treatment methods of inflammatory bowel disease. *Journal of Medicine and Life*, *12*(2), 113–122. <https://doi.org/10.25122/jml-2018-0075>
- Shah, S. C., & Itzkowitz, S. H. (2022). Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease: Mechanisms and Management. *Gastroenterology*, *162*(3), 715-730.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.10.035>
- Singh, D. K., Singh, S., & Singh, P. (2023). Nanomaterials: Advances and Applications. In *Nanomaterials: Advances and Applications* (Issue January). <https://doi.org/10.1007/978-981-19-7963-7>
- Singh, P., Pandit, S., Garnæs, J., Tunjic, S., Mokkaapati, V. R. S. S., Sultan, A., Thygesen, A., Mackevica, A., Mateiu, R. V., Daugaard, A. E., Baun, A., & Mijakovic, I. (2018). Green synthesis of gold and silver nanoparticles from Cannabis sativa (Industrial hemp) and their capacity for biofilm inhibition. *International Journal of Nanomedicine*, *13*, 3571–3591. <https://doi.org/10.2147/IJN.S157958>
- Sui, Y., Jiang, R., Niimi, M., Wang, X., Xu, Y., Zhang, Y., Shi, Z., Suda, M., Mao, Z., Fan, J., & Yao, J. (2024). Gut bacteria exacerbates TNBS-induced colitis and kidney injury through oxidative stress. *Redox Biology*, *72*(February), 103140. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2024.103140>
- Toczek, M., & Malinowska, B. (2018). Enhanced endocannabinoid tone as a potential target of pharmacotherapy. *Life Sciences*, *204*(2017), 20–45. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.04.054>
- Turner, S. E., Williams, C. M., Iversen, L., & Whalley, B. J. (2017). Molecular Pharmacology of Phytocannabinoids. In *Progress in the chemistry of organic natural products* (Spanier, Vol. 103, Issue January 2017). Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45541-9_3
- Vanti, G. (2021). Recent strategies in nanodelivery systems for natural products: a review. In *Environmental Chemistry Letters* (Vol. 19, Issue 6, pp. 4311–4326). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01276-x>
- Wang, C. C., Cui, B., Sun, Y., Wang, C. C., & Guo, M. (2022). Preparation, stability, antioxidative property and in vitro release of cannabidiol (CBD) in zein-whey protein composite nanoparticles. *Lwt*, *162*(April), 113466. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113466>
- Wang, C., Wang, J., Sun, Y., Freeman, K., Mchenry, M. A., Wang, C., & Guo, M. (2022). Enhanced Stability and Oral Bioavailability of Cannabidiol in Zein and Whey Protein Composite Nanoparticles by a Modified Anti-Solvent Approach. *Foods*, *11*(3), 376. <https://doi.org/10.3390/foods11030376>
- Yamamoto-Furusho, J. K., Bosques-Padilla, F., de-Paula, J., Galiano, M. T., Ibañez, P., Juliao, F., Kotze, P. G., Rocha, J. L., Steinwurz, F., Veitia, G., & Zaltman, C. (2017). Diagnosis and treatment of inflammatory bowel disease: First Latin American Consensus of the Pan American Crohn's and Colitis Organisation. *Revista de Gastroenterología de México (English Edition)*, *82*(1), 46–84.

<https://doi.org/10.1016/j.rgmxe.2016.07.003>

Zhang, X., Gao, X., Yi, X., Yu, H., Shao, M., Li, Y., & Shen, X. (2024). Multi-targeting inulin-based nanoparticles with cannabidiol for effective prevention of ulcerative colitis. *Materials Today Bio*, 25(58), 100965.
<https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2024.100965>

