



Universidad de la República, Facultad de Ciencias
Instituto de Química Biológica, Laboratorio de Enzimología
Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

Potencial antiaterogénico de extractos de *Cannabis sativa*: implicancias en procesos iniciales de la aterosclerosis

Lic. Bruno Musetti

Tutora: Dra. Leonor Thomson

Cotutores: Dr. Edward Moreira-Bahnson

Dr. Javier Varela

Montevideo,
octubre 2023

Agradecimientos

Instituciones financiadoras:

- Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por la beca de maestría.
- Comisión académica de Posgrados (CAP) por la beca de doctorado.
- Programa de desarrollo de la ciencia básica (PEDECIBA) por brindar alcuotas de dinero anuales destinadas a estudiantes e investigadores del programa, la financiación de pasantía en el país y en el exterior y asistencia a congreso.
- Comisión sectorial de investigación científica (CSIC) por la financiación de pasantía y asistencia a congreso en el exterior y la financiación del proyecto I+D de Leonor Thomson

Índice

Resumen	7
Lista de abreviaturas	9
1. Introducción	13
Ateroesclerosis	
13	
Oxidación de LDL	
18	
Reconocimiento de LDL oxidada por receptores <i>scavenger</i>	
20	
SR-A1 / MSR-1 / CD204	20
SR-B2 / CD36	21
SR-E1 / OLR1.....	21
Sistema endocannabinoide	
24	
Endocannabinoides	24
Receptores de cannabinoides.....	26
Otros receptores de cannabinoides	26
Fitocannabinoides	28
Cannabinoides y aterosclerosis	
29	
2. Hipótesis	31
3. Objetivos.....	32
Objetivo general	
32	
Objetivos específicos	
32	
Estrategia experimental	
32	
4. Materiales y métodos	33
Reactivos	
33	
Fitocannabinoides y ligandos del SEC	33

Obtención y caracterización de extractos de <i>Cannabis sativa</i>	
33	
Muestreo #1 y generación de extractos.....	33
Muestreo #2 y generación de extractos.....	34
Ensayo de oxidación de LDL	
35	
Aislamiento de LDL humana	35
Lipoperoxidación de LDL <i>in vitro</i>	35
Oxidación y marcado fluorescente de LDL	
36	
Análisis del grado de oxidación lipídica por TBARS.....	37
Análisis del grado de oxidación proteica por Electroforesis nativa..	37
Cultivo celular	
37	
Células J774.1.....	37
Células THP-1	37
Análisis por microscopía de fluorescencia de la formación de células espumosas	
38	
Análisis por espectroscopia de fluorescencia de la Internalización de LDLox	
38	
Efecto de antagonistas y agonistas del SEC sobre la internalización de LDLox	39
Efecto de quelantes de Ca ²⁺ intra y extracelulares sobre la internalización de LDLox	39
Ensayo de citotoxicidad	
39	
Activación macrofágica	
40	
Preparación de lisados celulares	40
Análisis de proteínas por SDS-PAGE y Western Blot	
40	
SDS-PAGE	40
Western Blot.....	40
Cuantificación de NO ₂ ⁻	
41	

Análisis estadísticos	
41	
5. Resultados.....	42
Caracterización química de los extractos de <i>Cannabis sativa</i>	
42	
Obtención y caracterización de extractos serie #1.....	42
Obtención y caracterización de extractos serie #2.....	44
Extractos de cannabis sativa disminuyen la oxidación de LDL <i>in vitro</i>	
46	
Efecto de los extractos de la Serie #1 sobre la oxidación de LDL mediada por Cu ²⁺	46
Efecto de los extractos de la serie #2 sobre la oxidación de LDL mediada por Cu ²⁺	47
Inhibición de la formación de células espumosas	
50	
Oxidación y marcado fluorescente de LDL.....	50
Análisis por microscopía de fluorescencia de la formación de células espumosas.....	52
Análisis por espectroscopia de fluorescencia de la endocitosis de LDLox-DiI.....	53
Ensayo de citotoxicidad.....	55
Participación de los receptores de CB1 y CB2 en la inhibición de la formación de células espumosas.....	58
Participación de receptores no clásicos del SEC en la formación de células espumosas.....	60
Efecto de los extractos de cannabis sobre la acumulación de los receptores <i>scavenger</i>	63
Efecto de los extractos de cannabis sobre la respuesta inmune celular	
65	
Efecto de los cannabinoides sobre la polarización M1 de macrófagos	
65	
Efecto de los cannabinoides sobre la polarización M2 de macrófagos	
68	
6. Discusión.....	70

Efecto antioxidante *in vitro* de extractos de *Cannabis sativa*

70

Extractos de *Cannabis sativa* y fitocannabinoides inhiben la endocitosis de LDLox

70

Efecto anti-inflamatorio de extractos de *Cannabis sativa* en macrófagos J774.1

.

72

7. Conclusiones.....	75
8. Publicaciones	76
9. Referencias.....	77

Resumen

En Uruguay y gran parte del mundo, las enfermedades relacionadas con la aterosclerosis son la principal causa de muerte. La generación de placa ateromatosa en el endotelio vascular se relaciona con la formación de células espumosas, donde la oxidación y consecuente internalización de lipoproteína de baja densidad (LDLox), por macrófagos principalmente, juegan un papel fundamental. Existen reportes del efecto antiinflamatorio y del potencial antiaterogénico de fitocannabinoides aislados, aunque los mecanismos moleculares subyacentes están escasamente identificados. El objetivo principal de este trabajo fue explorar el efecto de extractos ricos en fitocannabinoides sobre procesos relacionados al inicio y desarrollo de la placa ateromatosa.

En una primera aproximación se analizaron extractos de muestras frescas de partes florales pistiladas de tres cultivares estables de *Cannabis sativa*, recolectadas a diferentes tiempos de maduración durante el final del período de floración. La composición de los extractos se analizó mediante $^1\text{H-NMR}$, siendo los principales cannabinoides hallados el ácido Δ^9 -tetrahidrocannabinólico (THCA) y el tetrahidrocannabinol (THC). En la primera colecta, en dos de los cultivares el contenido de THCA (242 ± 62 mg/g) y THC (7.3 ± 6.5 mg/g) aumentó más del doble en las muestras más maduras. El extracto del tercer cultivar mostró una concentración más baja y constante de THCA y THC (177 ± 25 y 1 ± 1 , respectivamente). La capacidad de los extractos de cannabis y cannabinoides puros de inhibir la lipoperoxidación se midió en un ensayo de oxidación de LDL inducida por Cu^{2+} . Los extractos de cannabis ricos en THCA/THC aumentaron la fase de latencia de la oxidación de LDL en un factor de 1.2-3.5 veces/ μg y ralentizaron la fase de propagación de la lipoperoxidación, con una dosis efectiva 50 (DE_{50}) de 1.7-4.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El THC puro alargó la duración de la fase de latencia en un factor de 21 veces/ μg agregado, mientras que para la fase de propagación mostró un DE_{50} de 0.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Por el contrario, el THCA no pudo mejorar ningún parámetro en las condiciones ensayadas. Mientras tanto, el CBD y CBDA aumentaron la fase de latencia inicial en un factor de 4.8 y 9.4 veces/ μg , respectivamente, pero no tuvieron efecto en la fase de propagación.

En una segunda etapa se seleccionaron y analizaron por UPLC otro tres cultivares de *Cannabis sativa* con diferente composición relativa de cannabinoides, pertenecientes a los quimiotipos 1, 2 y 3. Los extractos obtenidos (E1, E2 y E3) mostraron relaciones de THC(A)/CBD(A) para E1 de 16 (intoxicante), E2 de 0.5 (intermedio) y E3 de 0.04 (fibra). Los extractos nuevos también fueron capaces de prevenir la formación de dienos conjugados generados por la oxidación de LDL mediada por Cu^{2+} , afectando las dos fases de la lipoperoxidación: alargando la latencia (3.7-4.9 veces/ μg) y enlenteciendo la propagación (DE_{50} 2-8 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Adicionalmente, los extractos inhibieron la internalización de LDL oxidada (LDLox) por macrófagos murinos J774.1. La inhibición de la internalización de LDLox, marcada con la sonda fluorescente lipofílica "DiI", se evidenció empleando microscopia confocal y espectroscopia de fluorescencia, mostrando un DE_{50} de 5-12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto y escasa toxicidad. Esta inhibición de la internalización de LDLox también se observó en presencia de los fitocannabinoides puros, con DE_{50} de 3.5-7.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para evidenciar la participación de receptores del sistema endocannabinoide en el efecto de los extractos sobre la internalización de LDLox, se utilizaron agonistas y antagonistas específicos de los principales receptores. Los antagonistas de los receptores CB1, y CB2, AM251 y AM630

respectivamente, tuvieron efectos marginales sobre la inhibición de la internalización de LDLox por los macrófagos. Por otro lado, los agonistas de los receptores GPR55, TRPV1 y TRPV4 (ML184, Capsaicina y GSK1016790A respectivamente), aumentaron la internalización de LDLox. Mientras que, el antagonista de TRPV1 (AMG9810) provocó una disminución leve en la internalización de LDLox aún en ausencia de extractos.

Además, se analizó la cantidad relativa de los receptores *scavenger* encargados del reconocimiento de LDLox, para determinar si la inhibición en la internalización de LDLox que inducen los extractos de cannabis se corresponde con una bajada en el nivel de receptores CD36, OLR1 y SR-A1. Efectivamente los extractos ricos en cannabinoides disminuyen la cantidad relativa de dichos receptores *scavenger* en macrófago J774.1 tratados con LDLox.

Adicionalmente, se exploró si los extractos de cannabis tienen impacto sobre la polarización de macrófagos hacia un fenotipo proinflamatorio o hacia un fenotipo prorresolutivo. En las células J774.1 los extractos de cannabis disminuyeron la fosforilación de I κ B y de p65 en las células estimuladas con LDLox, lo que llevaría a una disminución en la actividad de NF- κ B. Aunque no fue posible detectar la producción de proIL-1 β y NOS2 en las células estimuladas con oxLDL, el tratamiento con los extractos disminuyó los niveles de proIL-1 β y NOS2 en células J774.1 estimuladas con un estímulo inflamatorio clásico (LPS e INF γ). Por otro lado, el tratamiento con extractos generó un aumento en la síntesis de HO-1, enzima cuya regulación se encuentra principalmente estimulada por Nrf2, por lo que su activación podría ser indicativo de comportamiento prorresolutivo.

En suma, los extractos de *Cannabis sativa* presentaron múltiples efectos protectores frente a procesos relevantes en el inicio de la aterosclerosis, previniendo la oxidación de LDL, la transformación de los macrófagos expuestos a LDLox en células espumosas y la producción de mediadores proinflamatorios. El efecto de los extractos de cannabis en el proceso de internalización resultó escasamente dependiente de los receptores canónicos (CB1 y CB2), pero relacionado a la acción de GPR55, TRPV1 y TRPV4. Además, los extractos disminuyeron la producción de mediadores inflamatorios propios de una diferenciación M1, e indujeron la producción de HO-1, pudiendo indicar un viraje hacia un fenotipo prorresolutivo.

Lista de abreviaturas

- . ¹H-RMN, resonancia magnética nuclear de protón
- . 2-AG, 2-aradoquidonilglicerol
- . 4 α -PDD, 4- α -forbol-12,13-didecanoato
- . ABHD6/12, α/β -hidrolasa
- . ABS, absorbancia
- . AC, adenilato ciclasa
- . AEA, araquidoniletanolamida
- . AM251, 1-(2,4-Diclorofenil)-5-(4-iodofenil)-4-metil-N-1-piperidinil-1H-pirazol-3-carboxamida
- . AM630, 6-Iodo-2-metil-1-[2-(4-morfolin)etil]-1H-indol-3-il](4-metoixifenil)metanona
- . AMG9810, 2E-N-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il)-3-[4-(1,1-dimetiletíl)fenil]-2-Propenamida
- . AMPc, adenosina monofosfato cíclico
- . AP3, proteína adaptadora 3
- . ARE, elemento de respuesta antioxidante
- . BSA, albúmina bovina
- . Bach-1, factor de transcripción de la familia *Cap n' collar* con dominio de unión a proteínas tipo *Broad-Complex* homólogo 1
- . CBD, cannabidiol
- . CBDV, cannabidivarin
- . CBG, cannabigerol
- . CBGA, ácido cannabigerólico
- . CBV, cannabivarin
- . CB1, receptor cannabinoide 1
- . CB2, receptor cannabinoide 2
- . CBC, cannabicromeno
- . CBDA, ácido cannabidiólico
- . CBDV, cannabidivarin
- . CBN, cannabinol
- . CRP, proteína C reactiva
- . CaV, canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje
- . Cap o capsaicina, 8-metil-N-vanillil-6-nonenamida
- . CDCl₃, cloroformo deuterado
- . CID16020046, ácido 4-[4,6-dihidro-4-(3-hidroxifenil)-3-(4-metilfenil)-6-oxopirrol[3,4-c]pirazol-5(1H)-il]benzoico
- . CE, colesterol esterificado
- . CL, colesterol libre
- . COX-2, ciclooxigenasa-2
- . CREB, proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc
- . DAG, diacilglicerol
- . DE₅₀, dosis efectiva al 50%
- . Dil, (2Z)-2-[(E)-3-(3,3-dimetil-1-octadecilindol-1-il-2-il)prop-2-enilideno]-3,3-dimetil-1-octadecilindol)
- . DL₅₀, dosis letal al 50%
- . DMEM, medio Eagle modificado por Dulbecco

- . EC, célula endotelial
- . ECV, enfermedades cardiovasculares
- . F-actina, filamentos de actina
- . FAAH, amida hidrolasa de ácidos grasos
- . FL, fosfolípidos
- . GASP1, proteína de clasificación asociada a receptores de proteínas G 1
- . GDE, glicerofosfodiesterasa
- . GDP, guanina difosfato
- . GPR, receptores de membrana asociados a proteínas G
- . GR, glutatión reductasa
- . GPx, glutatión peroxidasa
- . GTP, guanina trifosfato
- . GSK1016790A, N-[(1S)-1-[[4-[(2S)-2-[[2,4-diclorofenil]sulfonil]amina]-3-hidroxi-1-oxopropil]-1-piperazinil]carbonil]-3-metilbutil]benzo[b]thiofeno-2-carboxamida
- . HCO67047, 2-metil-1-(3-morfolin-4-il-propil)-5-feil-N-[3-(trifluorometil)fenil]pyrrol-3-carboxamida
- . HETE-G, hidroxieicosatetraenoil glicerol
- . HNE, 4-hidroxinonenal
- . HO-1, hemooxigenasa 1
- . ICAM-1, molécula de adhesión intercelular 1
- . IL-1 β , interleucina-1 β
- . I κ B α , inhibidor de NF- κ B
- . I κ K α , quinasa del I κ B α subunidad α
- . I κ K β , quinasa del I κ B α subunidad β
- . I κ K γ , quinasa del I κ B α subunidad γ
- . I κ K ϵ , quinasa del I κ B α subunidad ϵ
- . IP $_3$, inositoltrifosfato
- . IP $_3$ R, receptores de IP $_3$
- . IT, índice terapéutico
- . JNK2, quinasa N-terminal de c-Jun 2
- . L \cdot , radical lipídico alquilo
- . LOO \cdot , radical lipoperoxilo
- . LOX, lipoxigenasa
- . LDL $_{eox}$, lipoproteína de baja densidad extensamente oxidada
- . LDL $_{mox}$, lipoproteína de baja mínimamente densidad oxidada
- . LDL $_{ox}$, lipoproteína de baja densidad oxidada
- . LPC, lisofosfatidilcolina
- . LPI, lisofosfatidiltidilinositol
- . LPS, lipopolisacáridos de pared bacteriana
- . LDLR, receptor de LDL
- . M $^{+}$, iones metálicos
- . MDA, malondialdehído
- . MAPK, quinasa activada por mitógenos
- . ML184, 3-[[4-(2,3-dimetilfenil)-1-piperazinil]carbonil]-N,N-dimetil-4-(1-pirrolidinil)benzenesulfonamida
- . MPO, mieloperoxidasa
- . NAAA, amidasa del ácido N-aciletanolamina
- . NADA, N-araquidonildopamina

- . NAPE, N-araquidonilfosfatidiletanolamida
- . NAPE-PLD: fosfolipasa D específica de NAPE
- . NAT, N-aciltransferasa
- . NF- κ B, factor nuclear potenciador de la cadena ligera *kappa* de células B activadas
- . NLRP3, complejo tipo NOD con dominio rico en leucinas y dominio pirina 3
- . NOD1/2, PRR con dominio de oligomerización de nucleótidos 1/2
- . Nox2, NADPH-oxidasa inducible
- . NOS2 o iNOS, isoforma 2 o inducible de la óxido nítrico sintasa
- . NOS3, isoforma 3 o endotelial de la óxido nítrico sintasa
- . Nrf2, factor nuclear eritroide 2
- . P450, monooxigenasas del citocromo P450
- . PBS, amortiguador fosfato salino
- . PG-EA, prostaglandina etanolamida
- . PGI2, prostaciclina
- . PLA2, fosfolipasa A2
- . PLC, fosfolipasa C
- . PUFA, ácido graso poliinsaturado
- . PPAR, receptor de activado por la proliferación de peroxisoma
- . PIP₃K, quinasa que produce 3-4-5-fosfatidilinositoltrifosfato
- . PKA, proteína quinasa A
- . PKB, proteína quinasa B
- . PKC proteína quinasa C
- . PKD, proteína quinasa D
- . PRR, receptor de reconocimiento de patrones
- . PMA, forbol-12-miristato-13-acetato
- . PW, ancho de pulso
- . Prx, peroxiredoxina
- . PTPN22, proteína tirosina fosfatasa 22 no receptora
- . RE, retículo endoplásmico
- . SR, receptores *scavenger*
- . RD, tiempo de relajación
- . RPMI, Medio Roswell Park Memorial Institute 1640
- . RTK, receptores de membrana asociados a quinastas de tirosina
- . SFP, sulforafano
- . SNC, sistema nervioso central
- . SEC, sistema endocannabinoide
- . SFB, suero fetal bovino
- . SOD, superóxido dismutasa
- . THC, Δ^9 -tetrahidrocannabinol
- . Δ^8 THC, Δ^8 -tetrahidrocannabinol
- . THCA, ácido Δ^9 -tetrahidrocannabinólico
- . TLR2, receptor tipo toll 2
- . TLR4, receptor tipo toll 4
- . TMS, tetrametilsilano
- . TG, triglicéridos
- . TBA, 2-tiobarbitúrico
- . TBARS, ensayo de especies que reaccionan con TBA
- . TNF α , factor de necrosis tumoral α

- . TRP, receptores de potencial transitorio
- . TRPC, receptor de potencial transitorio canónico
- . TRPV, receptor de potencial transitorio de unión a vainilloides
- . TRPM, receptor de potencial transitorio relacionado a melastína
- . TRPA, receptor de potencial transitorio con repetidos de ankyrina
- . TR, tioredoxina reductasa
- . TRx, tioredoxina
- . VCAM, molécula de adhesión de células vasculares
- . VSMC, células del musculo liso vascular

1. Introducción

Ateroesclerosis

La aterosclerosis es la principal impulsora de las enfermedades cardiovasculares (ECV), siendo estas la principal causa de muerte a nivel mundial (~34%) [1]. Es una condición crónica y progresiva que da lugar a la formación de lesiones en las paredes arteriales, caracterizadas por la formación de una placa de ateroma, la cual consiste principalmente en restos celulares cargados de lípidos, calcificaciones y tejido conectivo fibroso. La deposición gradual de placa en la fracción subendotelial reduce el calibre y endurece las arterias con el tiempo, disminuyendo el flujo de sangre a tejidos y órganos. En etapas avanzadas de la enfermedad, la placa de ateroma se puede desestabilizar y romper, exponiendo factores desencadenantes de la coagulación al torrente sanguíneo e incrementando el riesgo de trombogénesis [2]. En este sentido, la aterotrombosis corresponde a cerca del 75% de los trombos coronarios que llevan al infarto de miocardio o la muerte [3]. Existe evidencia del rol causal del proceso inflamatorio en todas las etapas del desarrollo de la aterosclerosis [4],[5], de hecho, en el estudio CANTOS (*Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study*) se demostró que el tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-interleucina-1 β (IL-1 β) reduce el riesgo de sufrir infarto de miocardio, accidentes vasculares o la muerte por un evento cardiovascular en pacientes con valores elevados de proteína C reactiva (CRP), un biomarcador de inflamación, incluso en pacientes con niveles normales de lipoproteína de baja densidad (LDL) en circulación [6]. En suma, la incidencia de la inflamación y el consecuente estrés oxidativo/nitrosativo en el desarrollo de la lesión aterosclerótica es de amplio conocimiento [7],[8].

En las primeras etapas de la progresión de la enfermedad aterosclerótica, la generación de placa ateroma se impulsa por la disfunción endotelial, seguido de la infiltración de leucocitos y migración de células del músculo liso vascular (VSMC) al espacio subendotelial, donde se cargan de lípidos derivados principalmente de la lipoproteína de baja densidad oxidada (LDL_{ox}), perdiendo su funcionalidad y transformándose en células espumosas. El desbalance entre la oxidación de LDL, la secreción de mediadores proinflamatorios, el reclutamiento de células inmunes y vasculares y la formación de células espumosas forma un circuito de retroalimentación que exacerba el daño y da lugar a la acumulación de restos celulares cargados de lípidos, proceso fundamental para el desarrollo de la placa [9] (Figura 1).

La disfunción endotelial es reconocida como un paso clave en el inicio del proceso aterosclerótico, involucrando un cambio fenotípico en el endotelio vascular. En situación normal, el endotelio contribuye a la homeostasis vascular mediante la producción y liberación de mediadores extracelulares que regulan el tono vascular y la adhesión celular. Las células endoteliales generan óxido nítrico (NO) y prostaciclina (PGI_2) que disminuyen la síntesis de moléculas de adhesión y mediadores inflamatorios en células endoteliales y leucocitos [9]. La isoforma 3 o endotelial de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS3) es la fuente principal de NO en el endotelio vascular normal, se expresa de manera constitutiva. Su activación, por calcio-calmodulina y por fosforilación, es promovida por el estrés tangencial que provoca el flujo sanguíneo normal [10] (Figura 2).

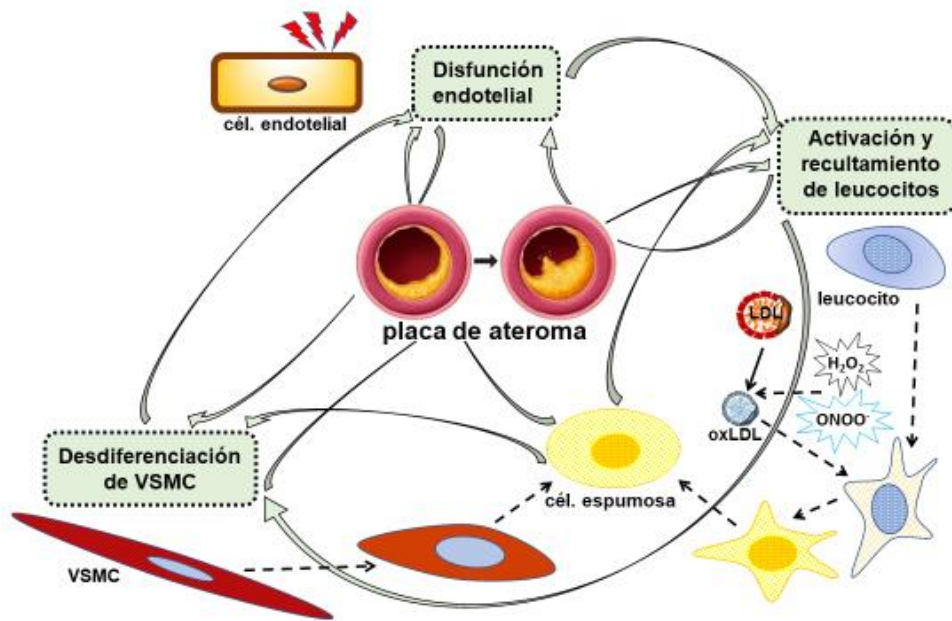


Figura 1. Esquema de procesos celulares que favorecen la generación de placa ateroma en el subendotelio vascular.

En el endotelio vascular, el flujo sanguíneo turbulento (propio de las bifurcaciones vasculares y potenciado por la hipertensión arterial) y la presencia de LDLox, activan cascadas de señalización que involucran a receptores del tipo dominio de oligomerización de nucleótidos 1/2 (NOD-1/2) que conduce a la activación de la quinasa activada por mitógenos (MAPK) y del factor nuclear potenciador de la cadena ligera *kappa* de células B activadas (NF- κ B) [11]. De esta manera, se induce la síntesis de proteínas de adhesión como la molécula de adhesión de células vasculares 1 (VCAM-1), la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y las selectinas E y P, y también de mediadores proinflamatorios como el precursor de la IL-1 β (proIL-1 β). Además, las células pierden la capacidad para producir NO a demanda debido a la inhibición de la NOS3 [12].

La activación del complejo tipo NOD con dominio rico en leucinas y dominio pyrin 3, mejor conocido como el inflammasoma NLRP3, en células endoteliales y leucocitos subendoteliales también contribuye a la progresión de la aterosclerosis [13]. El inflammasoma NLRP3 es el mejor caracterizado de este tipo de complejos macromolecular de proteínas citoplasmáticas. NLRP3 al ensamblarse, media la respuesta inflamatoria temprana del sistema inmune innato al servir como plataforma molecular para la activación de caspasa-1 (Casp-1) [14]. La activación de esta proteasa lleva al procesamiento de los precursores de proIL-1 β y proIL-18, ambas citoquinas en su forma activa promueven fuertemente el reclutamiento y la activación de células inflamatorias, amplificando y sosteniendo el proceso inflamatorio en el tiempo. De esta manera se promueve la infiltración de monocitos circulantes y su activación, además de la desdiferenciación de VSMC.

Durante el desarrollo de la placa de ateroma, se desencadena una producción excesiva de oxidantes por los leucocitos subendoteliales. De este modo, la activación de las vías inflamatorias promueve la producción del radical superóxido (O₂⁻) por la NADPH-oxidasa (Nox2) [15]. Aunque el O₂⁻ es un oxidante débil, su dismutación espontánea o catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD), produce H₂O₂ [16]. En los leucocitos, el H₂O₂ regula la activación

de factores de transcripción sensibles al estado redox celular, como NF- κ B y el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2), a través de la oxidación de cisteínas específicas [17].

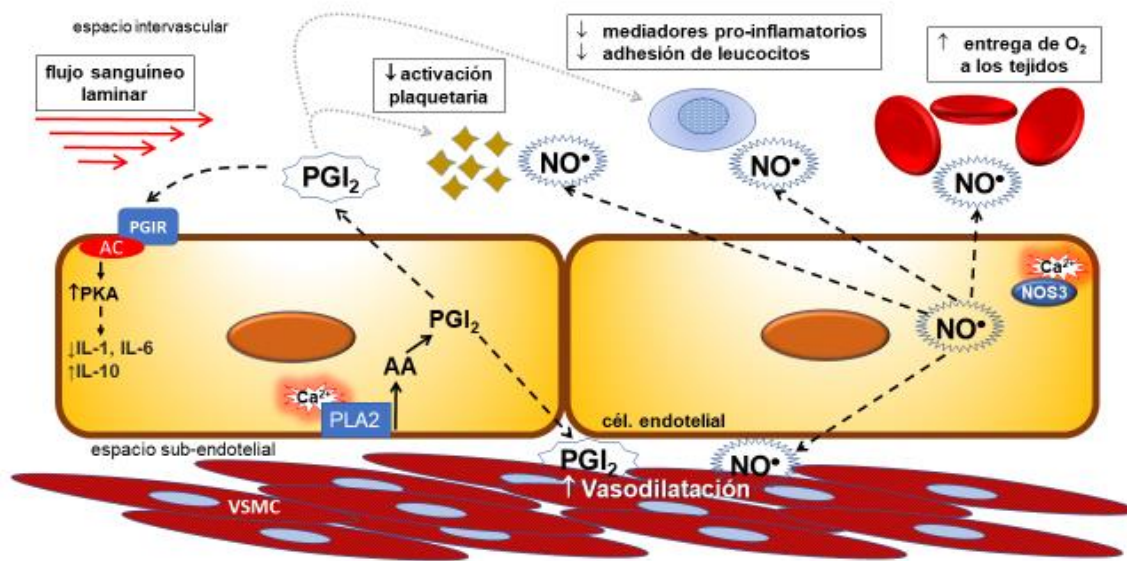


Figura 2. Endotelio en condiciones normales. El flujo sanguíneo laminar promueve una función adecuada de la barrera endotelial sanguínea, permitiendo un intercambio efectivo y una regulación mutua. Enzimas endoteliales como NOS3 y fosfolipasa A2 (PLA2) participan en esta acción concertada. La producción de NO y PGI₂ promueve la relajación de las células musculares lisas vasculares (VSMC) y la vasodilatación, impidiendo la adhesión de leucocitos a la membrana endotelial e inhibiendo la liberación de citoquinas proinflamatorias por parte de los leucocitos y las células endoteliales. Publicado en [18].

Por su parte, la traslocación de Nrf2 al núcleo activa la expresión de genes que componen el elemento de respuesta antioxidante (ARE), que codifican para la síntesis de enzimas antioxidantes como la SOD, catalasa, peroxiredoxina (Prx) y los sistemas glutatión peroxidasa (GPx)/glutatión reductasa (GR) y tioredoxina (Trx)/tioredoxina reductasa (TR), participando en la respuesta de defensa celular al estrés generado por oxidantes. La activación de Nrf2 también induce la síntesis de enzimas involucradas en el metabolismo de compuestos exógenos y endógenos, como la glutatión transferasa (GST) y la hemo oxigenasa 1 (HO-1) [19]. En el caso del factor NF- κ B, su activación provoca la transcripción de mediadores proinflamatorios como IL-1 β , IL-6, factor de necrosis tumoral α (TNF α), la ciclooxygenasa 2 (COX-2), ICAM-1 y la forma inducible NOS2 o iNOS. Además, la oxidación de residuos clave en otras proteínas puede potenciar señales proinflamatorias y prooxidantes, al estimular las vías dependientes de MAPK, amplificando el daño a los tejidos [20]. Las isoformas p42/p44 MAPKs se activan en respuesta a estímulos asociados a la comunicación con el exterior celular, a través de receptores de membrana asociados a quinasas de tirosina (RTK) o asociados a proteínas G (GPR). Las p42/p44 MAPKs están principalmente asociadas a la fosforilación de proteínas que activan la proliferación y diferenciación celular [21]. En el caso de p38 MAPK, su actividad quinasa está más vinculada a la señalización posterior al reconocimiento de PAMPs y DAMPs, colaborando en la activación de vías proinflamatorias, como NF- κ B [22]. (Figura 3)

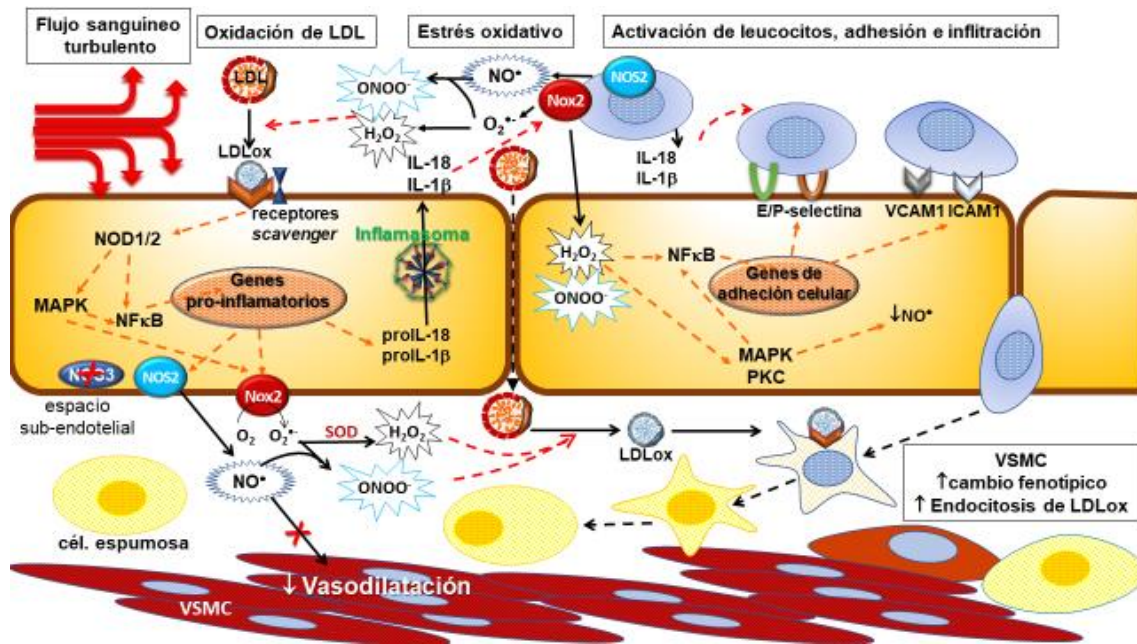


Figura 3. Proceso inflamatorio en la aterosclerosis. El flujo sanguíneo turbulento sostenido, junto con la presencia de una alta concentración de LDLox, desencadena la disfunción endotelial llevando a la activación de la señalización de NFκB, la síntesis de quimioquinas y moléculas de adhesión, la infiltración de leucocitos de la circulación al espacio subendotelial, el cambio fenotípico de macrófagos y las VSMC a células espumosas, junto con la producción de oxidantes debido a la activación de Nox2 y NOS2. Publicado en [18].

El H_2O_2 en presencia de iones metálicos (M^+) o hemoglobina [23] puede llevar a la producción de $\cdot OH$ a través de reacciones tipo Fenton [24], una especie radicalar altamente oxidante que conduce a modificaciones tanto en los componentes lipídicos de las LDL como en la porción proteica (apoB100). Además, la reacción entre $O_2^{\cdot-}$ y NO^{\cdot} genera $ONOO^{\cdot}$, y este produce modificaciones oxidativas y nitrosativas en las proteínas que impulsan hipercoagulabilidad y eventos cardiovasculares adversos [25–27]. El $ONOO^{\cdot}$ también es responsable de la oxidación y nitración de la LDL, provocando la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) presentes en fosfolípidos (FL) y colesterol esterificado (CE), además de otros productos lipídicos de oxidación como el 7-cetocolésterol [28], e incluso aductos entre algunos de estos lípidos derivados de la lipoperoxidación y residuos de la ApoB100 [29] o aductos proteicos ditirosina entre dos moléculas de ApoB100 [30] (Figura 4). Los monocitos reclutados al espacio subendotelial y los macrófagos residentes, en presencia de LDLox, saturan su espacio citoplasmático de depósitos lipídicos enriquecidos en CE, por lo que se las conoce como células espumosas. Estas células pierden su capacidad de remover cuerpos apoptóticos (eferocitosis) y secretan mediadores proinflamatorios, quimiotácticos y prooxidantes. Esta transformación se genera como consecuencia del reconocimiento y endocitosis de LDLox por receptores *scavenger* (SR), particularmente por SR-A1/1.1 (CD204), SR-B2 (CD36) y SR-E1 (OLR1), presentes en la membrana plasmática de monocitos/macrófagos y otros tipos celulares [31]. Estos SR no son saturables, a diferencia del receptor de LDL (LDLR), además, el reconocimiento de LDLox modula la activación de las vías proinflamatorias MAPK y NF-κB [32].

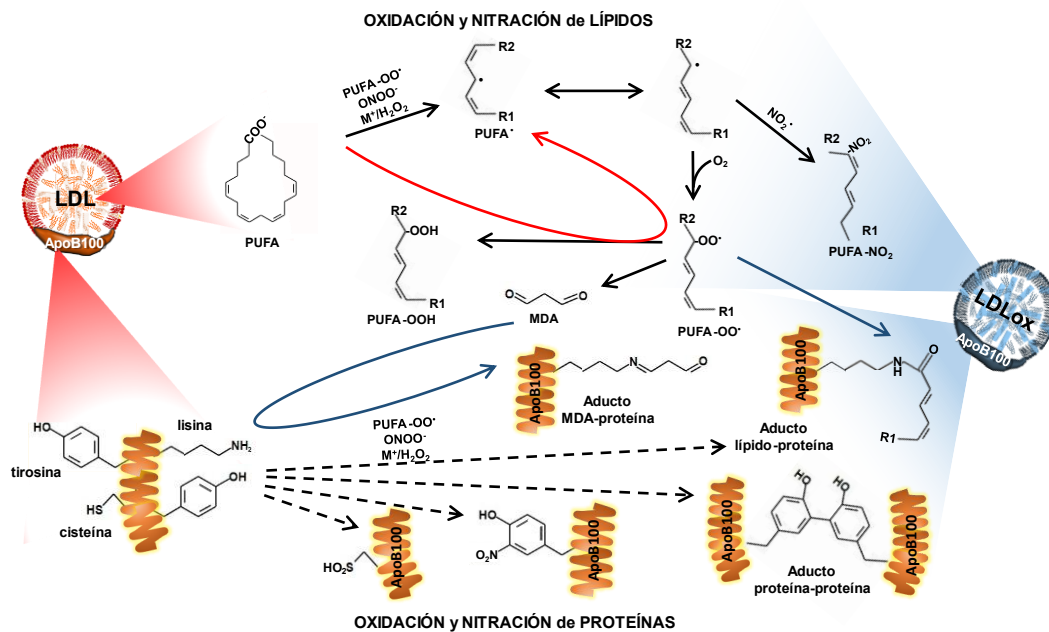


Figura 4. Oxidación de LDL. En la LDL, tanto la fracción lipídica como la proteína (ApoB100) pueden oxidarse. Varias moléculas endógenas, incluidos los radicales derivados de la reacción de H_2O_2 con iones metálicos (M^+) y la descomposición del $ONOO^-$, junto con los radicales producidos durante la oxidación cíclica de PUFAs (flecha roja), incluidos los radicales alquilo ($PUFA^\bullet$) y peroxilo ($PUFA-OO^\bullet$), impulsan la abstracción de un átomo de hidrógeno de los componentes de la LDL, generando LDL con modificaciones oxidativas. Como productos, se forman PUFA-OOH, aductos lípido-proteína (flechas azules) y aminoácidos oxidados (flechas negras punteadas), generando motivos moleculares que pueden ser reconocidos por receptores *scavenger*. También se representan los aductos de proteínas con MDA, uno de los productos secundarios de la lipoperoxidación. Publicado en [18].

Las VSMC por su parte, en el contexto de la lesión aterosclerótica, sufren cambios fenotípicos que les permiten aportar al desarrollo de la lesión. Entre estos cambios se destacan la pérdida de contractilidad y consecuente ganancia de capacidad migratoria, la endocitosis de LDLox, y además, la síntesis y secreción de mediadores proinflamatorios y componentes de matriz extracelular [33–35].

Oxidación de LDL

Existen varios componentes oxidables en la LDL, como FL, colesterol libre (CL) y esterificado (CE) y triglicéridos (TG), siendo los PUFAs, en especial el ácido araquidónico (AA) y el ácido linoleico, los más propensos a ser oxidados [28]. La oxidación de los PUFAs tiene lugar a través de tres fases principales: iniciación, propagación y terminación (Fig. 5).

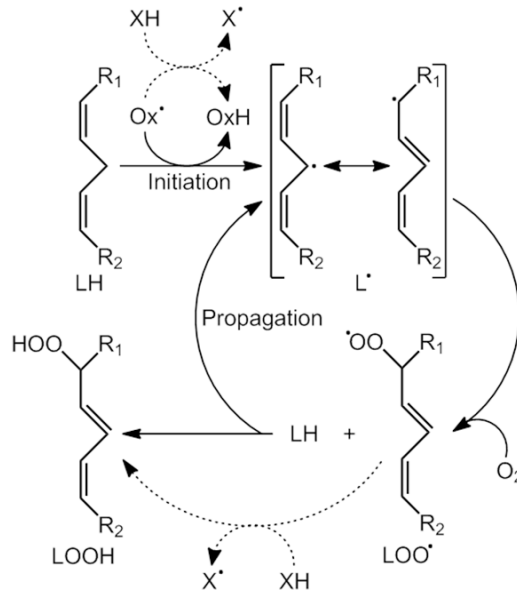
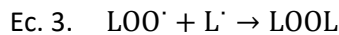
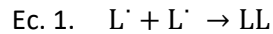


Figura 5. Etapas de la lipoperoxidación de PUFAs. En el primer paso, el PUFA (LH) es atacado por un oxidante altamente reactivo, e.g. un radical libre (Ox^{\bullet}), abstrayendo un hidrógeno bis-alílico, formando un radical alquilo (L^{\bullet}), que reacciona rápidamente con O_2 generando el radical lipoperoxilo correspondiente (LOO^{\bullet}). La etapa de propagación se sustenta en reacciones entre L^{\bullet} y LOO^{\bullet} con PUFAs reducidos adyacentes (LH). Alternativamente, moléculas fácilmente oxidables podrían actuar como anti-oxidantes (XH) y ceder un electrón, previniendo el paso inicial o interrumpiendo las cadenas de propagación. Publicado en [36].

La fase de iniciación es promovida por una molécula altamente reactiva (e.g. un radical libre) capaz de romper un enlace alílico. Esta reacción provoca la formación de un radical lipídico alquilo (L^{\bullet}). Este radical se estabiliza por resonancia con grupos adyacentes, formando dienos conjugados que presentan una absorción máxima característica a 234 nm [37]. El oxígeno molecular reacciona rápidamente con los radicales alquilo para formar un radical lipoperoxilo (LOO^{\bullet}), intermediario clave en la cadena de propagación. Al formarse esta especie radicalar, podrá oficiar de iniciador y así la cadena de reacciones oxidativas continuará al generar radicales alquilo en otros ácidos grasos cercanos [38]. La fase de iniciación es determinada por una latencia en el comienzo de la iniciación, que está ligada a la presencia y concentración de los antioxidantes endógenos presentes en la LDL, entre los que se destacan los tocoferoles, el ubiquinol, el licopeno y los carotenoides [39]. Por otro lado, la fase de propagación se caracteriza por reacciones cíclicas de L^{\bullet} con O_2 y LOO^{\bullet} con LH adyacentes, o hasta que reacciones secundarias de terminación tengan lugar. Dentro de las posibles reacciones de terminación, se destacan las reacciones entre radicales derivados de PUFAs (Ecs. 1-3), reacciones de adición de Michael [40] con grupos ϵ -amino de lisinas en la apoB100 [41] (Ec. 4) o con moléculas antioxidantes [42].



De esta manera, algunas moléculas fácilmente oxidables (XH en la Figura 5), ya sean endógenas o no, tienen la capacidad de intervenir en una o ambas fases de la lipoperoxidación, previniendo o retrasando la aparición de productos de oxidación lipídica.

La oxidación de los PUFAs puede llevar a la fragmentación y consecuente generación de aldehídos altamente reactivos como lo son el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonenal (HNE). Las modificaciones oxidativas también tienen lugar en residuos de la ApoB100. En particular, la oxidación de lisinas, cisteínas, triptófanos, tirosinas e histidinas generan un fuerte aumento de la carga negativa neta en la LDL oxidada [43]. Además, el entrecruzamiento entre residuos proteicos de la ApoB100 y aldehídos electrofílicos producto de la lipoperoxidación, generan que las partículas de LDL reduzcan su tamaño y se vuelvan más densas [44], afectando su migración electroforética. La ApoB100 también puede ser nitrada por ONOO⁻ o clorada por el HOCl generado por la enzima mieloperoxidasa (MPO, presente en monocitos y neutrófilos), principalmente a nivel de los residuos de tirosina [45].

El grado de oxidación de la LDL determinará qué receptores celulares serán capaces de reconocerla y, además, qué vías de señalización se podrían estar activando de acuerdo con los cambios expuestos en la superficie de las partículas. En este sentido, el grado de oxidación *ex vivo* de la LDL se puede dividir en 3 difusas categorías: mínima, moderada y extensamente oxidada [46]. Se entiende como LDL extensamente oxidada (LDLeox) a la versión que además de contar con un alto contenido de lípidos oxidados (>30 nmol MDA/mg ApoB100), contiene suficientes modificaciones a nivel de la ApoB100 que las tornan irreconocible por los LDLR. Por otro lado, se considera LDL mínimamente oxidada (LDLmox) a las partículas de LDL que pueden ser reconocidas por el LDLR, pero a diferencia de la LDL sin modificar, inducen la síntesis de mediadores proinflamatorios en las células endoteliales, macrófagos y VSMC, a través de la exposición de productos primarios de la lipoperoxidación en los ácidos grasos de fosfolípidos o esterificados a colesterol. La LDLmox cuenta con un nivel de oxidación lipídica de 3-12 nmol MDA/mg apoB100 y un bajo contenido de modificaciones a nivel de la proteína, al punto de que no induce la producción de anticuerpos que reconozcan el aducto MDA-ApoB100 [47]. En el caso de la LDL ligera o moderadamente oxidada (LDLox), una categoría aún menos definida, se diferenciaría de LDLmox por presentar productos de lipoperoxidación secundarios que forman aductos con la porción proteica [48], pero no al punto de la LDLeox, con un alto porcentaje de residuos proteicos modificados.

La oxidación, así como la reducción de tamaño, el aumento de la carga negativa y la asociación a elementos de la matriz extracelular favorecen la formación de agregados de partículas de LDL [49]. Otro factor que induce la agregación, es la formación de complejos inmunes entre LDL modificada y anticuerpos generados a partir de estos epítopes [50]. La agregación genera partículas de mayor tamaño que ingresan a las células a través de mecanismos fagocíticos, y

participan en la génesis de células espumosas a partir de macrófagos residentes de tejidos arteriales sanos [49]. Por este motivo, la fagocitosis de partículas producto de la agregación de LDL modificada se vinculan de forma fundamental con el inicio de la lesión aterosclerótica [51], a través de la activación de vías de señalización del sistema inmune innato que promueven la acumulación de lípidos mediante de la inducción de SRs, además de la secreción de mediadores pro-inflamatorios; en particular se ha observado que IL-6, IL-15 [51], IL-32 [52] e IL-34 [53] afectan la acumulación de lípidos *in vitro*.

Reconocimiento de LDL oxidada por receptores *scavenger*

En la década de 1970, Joseph Goldstein, Michael Brown y sus colaboradores investigaron y describieron por primera vez piezas clave de la regulación del metabolismo lipídico y su implicancia en la fisiopatología de la aterosclerosis, desde la regulación de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGCR), enzima limitante en la síntesis de colesterol, hasta la identificación y caracterización del funcionamiento y regulación del receptor de LDL (LDLR) [54]. Incluso, aportando a la primer observación de receptores celulares capaces de reconocer LDL con modificaciones [55]. De esta manera, en 1990 se caracterizó el primer SR en macrófagos, el MSR-1, capaz de reconocer a varios tipos de ligandos, entre ellos LDL con diferentes modificaciones, pero no LDL sin modificar. Actualmente, se engloba a los receptores *scavenger* como aquellos receptores capaces de reconocer y remover partículas o compuestos exógenos y endógenos, que exponen diversos motivos, generalmente aniónicos; dentro de los que se incluyen componentes lipídicos y proteicos de lipoproteínas modificadas, cuerpos apoptóticos, bacterias gram-negativas, ferritina y proteoglicanos, entre otros [31]. Para su clasificación, los receptores *scavenger* se pueden agrupar en clases de la A-J por homología de secuencia [32].

SR-A1 / MSR-1 / CD204

El primer receptor *scavenger* descrito a nivel molecular es el SR-A1, que consta de una glicoproteína de membrana tipo 2 con un dominio extracelular tipo colágeno [56], con dos isoformas (A1 y A1.1) que derivan del *splicing* alternativo de un único producto génico [57]. El receptor SR-A1 reconoce varios ligandos con cargas negativas, como lo son LDL modificadas, así como diferentes tipos de bacterias y otros ligandos polianiónicos [58]. SR-A1 y A1.1 presentan afinidad similar por la LDL oxidada o acetilada [59] y ambas isoformas pueden sintetizar de manera endógena en las mismas células [60]. El receptor SR-A1 se sintetiza predominantemente en los macrófagos y su síntesis es inducida durante la diferenciación de monocitos a macrófagos, con una sobre acumulación en células espumosas derivadas de macrófagos en lesiones ateroscleróticas, según se reporta para muestras humanas [61] y de conejo [62]. También se ha demostrado que los receptores SR-A se expresan en células de músculo liso [63].

Se considera que el receptor SR-A1 posee mayor especificidad para la LDL extensamente oxidada que para sus versiones mínima o moderadamente oxidada, ya que reconoce modificaciones a nivel de las lisinas de la apoB100 como pueden ser la adición de grupos acetilo, acetal, succinilo además de aductos con PUFAs o productos secundarios de la lipoperoxidación como el MDA o HNE. En este sentido, fue reportado que se requirió la modificación de al menos el 15-20% de lisinas de la LDLox para que sea reconocida por el receptor SR-A1, mostrando una tendencia al

aumento de la internalización proporcional a las lisinas modificadas [64]. En la misma línea, también ha sido demostrado que apolipoproteínas deslipidadas, obtenidas a partir de LDLox, también son reconocidas por el receptor SR-A1 de macrófagos [65]. Además de los receptores SR-A1, se han identificado varios otros miembros como parte de la clase de receptores *scavenger* tipo A, pero no se ha demostrado que participen sustancialmente para la captación de LDL oxidada [66,67].

La activación de señales proinflamatorias lleva a una mayor actividad del receptor SR-A1. En un modelo *in vivo* de aterosclerosis, se demostró que la activación de quinasa N-terminal de c-Jun 2 (JNK2) lleva a la fosforilación del receptor SR-A1 y la consecuente acumulación intracelular de lípidos. Además, el bloqueo selectivo o la eliminación de esta quinasa revierte el desarrollo de la placa [68]. Sin embargo, también se ha reportado que SR-A1 compite con ligandos del receptor tipo *toll* 4 (TLR4), por lo que su ausencia o su bloqueo con anticuerpos específicos aumenta la fosforilación de p42/44 y p38 MAPK, JNK1/2 y la traslocación nuclear de NF-κB en macrófagos tratados con lipopolisacáridos de pared bacteriana (LPS) [69].

SR-B2 / CD36

Existen tres miembros de la clase SR-B con pocas diferencias estructurales, siendo proteínas transmembrana con dos dominios intermembrana y una región central extracelular glicosilada. Sin embargo, solo el SR-B2, también conocido como CD36, es el que reconoce y media la endocitosis de LDL con modificaciones oxidativas [70]. En este sentido, SR-B2 reconoce productos secundarios truncados de la oxidación de fosfolípidos, presentes en etapas intermedias y avanzadas de la oxidación de LDL [71]. Por el contrario, SR-B2 no reconoce LDL sin modificar, ni la apolipoproteína tras ser deslipidada. Otros ligandos del SR-B2 son ácidos grasos de cadena larga, cuerpos apoptóticos, motivos bacterianos y fúngicos [72]. El receptor SR-B2 está vinculado a la internalización de LDL oxidada, fue reportado que monocitos en cultivo de individuos que carecen de este receptor (Nak^a-negativo tipo I) o al tratar monocitos normales con anticuerpos anti-SR-B2, la internalización de LDLox disminuyó cerca del 50% [73].

El reconocimiento de fosfolípidos oxidados en la LDL por SR-B2 activa las vías de señalización JNK1/2 y p38 MAPK, lo que induce una mayor acumulación del mismo receptor y la activación de la vía Wnt-5 [74] y del factor nuclear PPARγ [75], facilitando la acumulación intracelular de lípidos. Además, se ha demostrado que la activación de SR-B2 produce la heterodimerización de los receptores TLR4 y TLR6, activando el factor NF-κB tras el reconocimiento de LDL con modificaciones oxidativas u otros ligandos [76]. Paralelamente, la señalización intracelular mediada por SR-B2 lleva a la activación de las proteínas de la familia Vav. Estas proteínas impulsan la actividad de proteínas homologas a *Ras* (Rho) con dominio de unión a guanina trifosfato (GTPasas), involucradas en la remodelación de fibras de actina, repercutiendo en la fluidez de la membrana, la migración y la adhesión celular [72].

SR-E1 / OLR1

El receptor clasificado como SR-E1 es una proteína transmembrana tipo II con un dominio de unión tipo lectina, también conocido como OLR1 o LOX-1 por su capacidad de unir LDL oxidada, fue descrito en células endoteliales, donde se expresa en cantidades apreciables [77], pero la

inducción de su síntesis se ha reportado en leucocitos y VSMC expuestos a LDL oxidada [78]. Otros ligandos que reconoce SR-E1 son la CRP, plaquetas y fosfatidilserina de cuerpos apoptóticos [79], además de motivos moleculares de bacterias gram-positivas y negativas [80]. Se considera que SR-E1 posee una mayor afinidad por la forma moderadamente oxidada (LDLmodox) que por la LDLox, como se demuestra en [81]. Los autores reportan que LDL oxidada con un contenido de 5 nmol MDA/mg apoB100 es suficiente para que pueda ser reconocida por SR-E1, mientras que el reconocimiento por anticuerpos policlonales anti-apoB100 no se vio afectado ante este nivel de oxidación moderado de la LDL, aunque su movilidad electroforética sí. Además, se ha demostrado que SR-E1 reconoce a la LDL tratada con oxidantes y deslipidada, aunque es probable esté reconociendo los fosfolípidos presentes en aductos con la apoB100, y no necesariamente las modificaciones proteicas como es el caso del reconocimiento por SR-A1, ya que SR-E1 no reconoce a la LDL acetilada [82].

La activación de SR-E1 por LDL con modificaciones oxidativas induce la señalización de vías pro-inflamatorias que llevan a la disfunción endotelial, la formación de células espumosas [83] y la apoptosis de VSMC [84]. Dentro de las vías de señalización involucradas, se destacan la activación de las vías dependientes de p38 y p42/44 MAPK [85]; [86] y la traslocación nuclear de NF- κ B [87]; [88]. En otra línea, SR-E1 es capaz de actuar como correceptor y cooperar con el TLR2 para que ejerza su función de señalización, reconociendo una proteína de membrana conservada en la familia *Enterobacteriaceae* que TLR2 no puede reconocer por si solo [89], mostrando un vínculo directo con el sistema inmune innato.

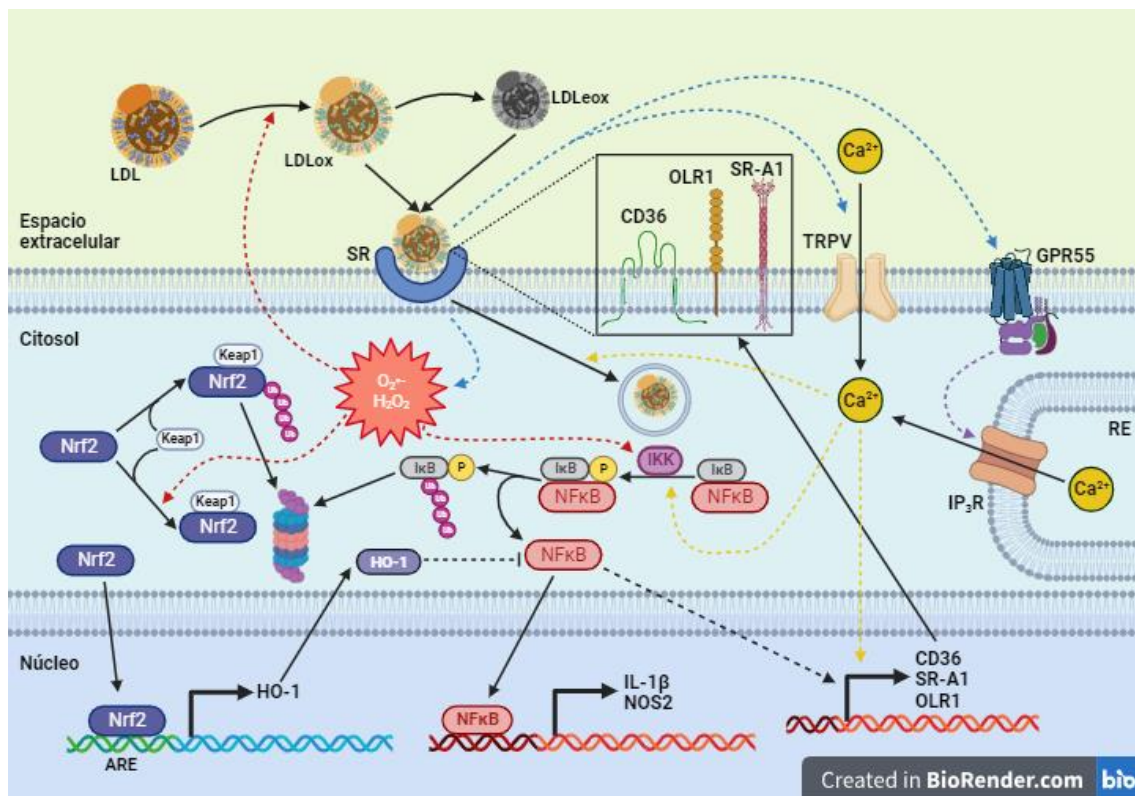


Figura 6. Esquema globalizador de las vías de señalización activadas por LDLox. Las partículas de LDL sufren sucesivas modificaciones oxidativas que les permite ser reconocidas por los SR y consecuentemente internalizadas. La endocitosis de LDLox induce un aumento en la generación de especies oxidantes como el $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 que impactan directamente sobre la actividad de IKK. La

fosforilación de I κ B por I κ K induce su degradación a través del proteosoma, liberando al factor de transcripción NF- κ B, que regula la expresión de genes vinculados a la respuesta inflamatoria como IL-1 β y NOS2. Además, NF- κ B promueve la síntesis de SR. La producción de O $_2^{\cdot-}$ y H $_2$ O $_2$ también lleva a la oxidación de residuos específicos en la proteína tipo *Kelch* asociada a EHC 1 (Keap1) que se une a Nrf2, impidiendo la ubiquitinación de Nrf2 y secuestrando las unidades de Keap1 disponibles asociadas a Nrf2. Al encontrarse menos disponible Keap1, las nuevas unidades de Nrf2 sintetizadas podrán translocar al núcleo gracias a su señal de localización nuclear expuesta, induciendo la expresión de genes asociados a la detoxificación y la homeostasis redox. HO-1 es una proteína cuya síntesis se encuentra regulada por la vía Nrf2 y su presencia inhibe la vía NF- κ B. Los receptores TRPV1 y GPR55 tras su activación inducen un aumento en la concentración citosólica de Ca $^{2+}$, por lo que su activación en este contexto podría contribuir a un aumento en la endocitosis de LDLox, también aumentan la actividad de la quinasa I κ K y además inducen un aumento en la acumulación de SR.

Sistema endocannabinoide

A partir del año 1988 se comenzó a describir la red de señalización y regulación celular que se conoce como el sistema endocannabinoide (SEC). Actualmente, el SEC es foco de investigación para el descubrimiento de blancos terapéuticos que podrían tener impacto en enfermedades del sistema cardiovascular [90],[91], entre otras afectaciones relacionadas a la inflamación [92–95]. En este sentido, la caracterización química del principal componente psicoactivo del cannabis, el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC), en 1964 por Menchoulam & Gaoni [96], precedió el camino a la identificación de los primeros y más abundantes receptores celulares que reconocen cannabinoides [97]. En primer lugar, se identificó un receptor asociado a proteína G (GPR) que interacciona con el THC, el receptor cannabinoide 1 (CB1), siendo abundante en el sistema nervioso central (SNC) y responsable del efecto psicotrópico de este fitocannabinoide [98,99]. Posteriormente, se identificó un segundo receptor que reconoce cannabinoides (CB2), presente mayoritariamente en células del sistema inmune [100]. En los años siguientes se caracterizaron los principales ligandos endógenos de CB1 y CB2, los endocannabinoides N-araquidoniletanolamida o anandamida (AEA) [101] y 2-araquidonilglicerol (2-AG) [102], así como las enzimas involucradas en la biosíntesis y degradación de estos endocannabinoides [103][104] (Figura 7). Actualmente, con la identificación de nuevos receptores, ligandos endógenos y variadas interacciones con vías de señalización celular, la definición del SEC está en continuo cambio [105], interaccionando con receptores celulares del tipo GPRs, receptores de potencial transitorio (TRPs) y receptores de activados por la proliferación de peroxisoma (PPARs), entre otros, que son modulados por endocannabinoides o cannabinoides exógenos de origen natural o sintético.

Endocannabinoides

Los endocannabinoides se biosintetizan principalmente a partir del AA que es liberado de los fosfolípidos de membrana [106], para formar amidas, aminas, ésteres o éteres que ejercen potentes efectos moduladores de las funciones celulares, de manera autocrina y paracrina, a través de la interacción con los receptores CB1 y CB2, además de otros receptores posteriormente descritos [107]. Los endocannabinoides actúan como neuromoduladores en el sistema nervioso [105] y regulan la respuesta inmune y el metabolismo energético, entre otros, en tejidos periféricos [108]. La AEA y el 2-AG fueron los primeros en ser identificados como agonistas de CB1 y CB2, posteriormente se identificaron otros endocannabinoides como la N-araquidonildopamina (NADA), el éter de 2-araquidonilgliceril (2-AG éter), la O-araquidoniletanolamina [109–111]. También se han identificado endocannabinoides biosintetizados a partir de otros ácidos grasos como el ácido palmítico y el oleico [112] (Tabla 1).

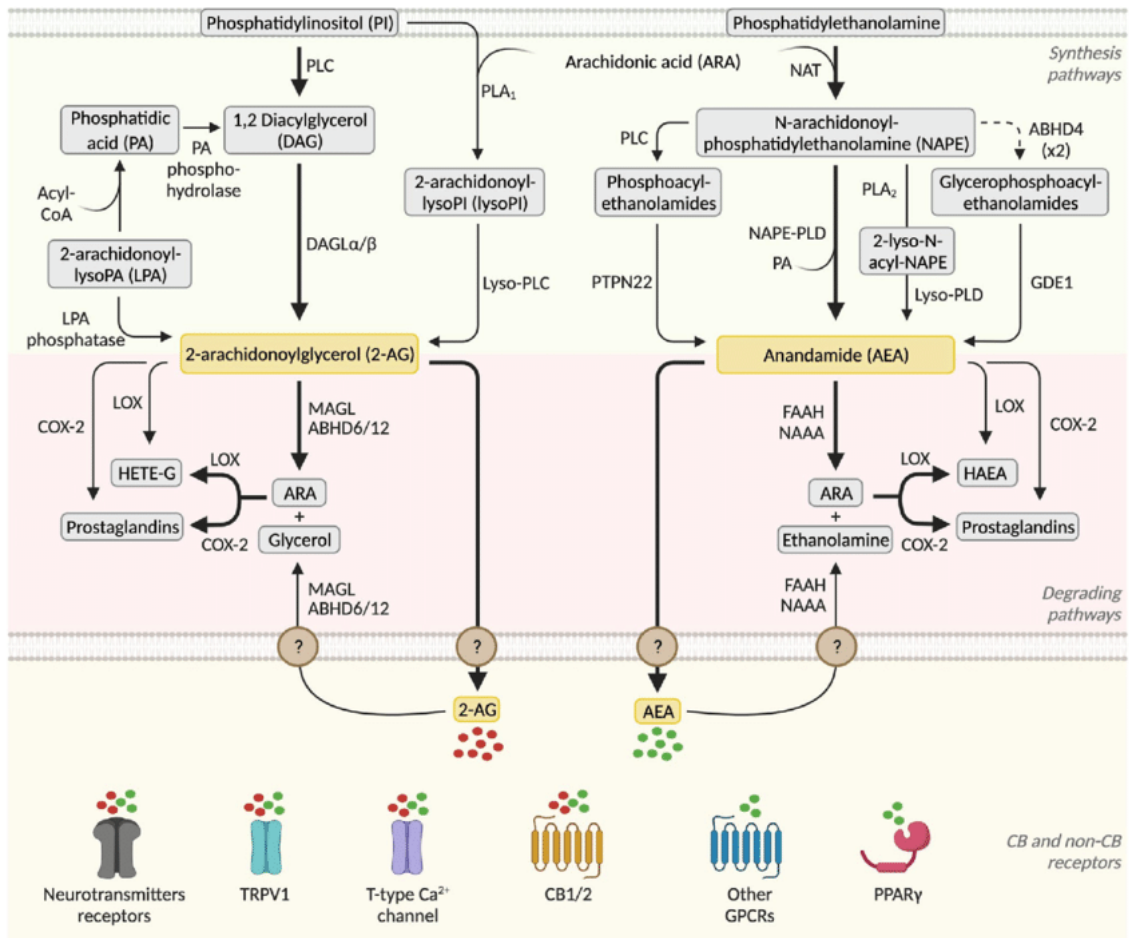


Figura 7. Representación esquemática de las vías de síntesis y degradación de los endocannabinoides AEA y 2-AG. Abreviaturas: NAT, N-aciltransferasa; NAPE-PLD: fosfolipasa D específica de NAPE; ABHD6/12, α/β -hidrolasa; GDE, glicerofosfodiesterasa; PLA2, fosfolipasa A2; PLC, fosfolipasa C; PTPN22, proteína tirosina fosfatasa 22 no receptora; FAAH, amida hidrolasa de ácidos grasos; NAAA, amidasa del ácido hidrolizante de N-aciletanolamina; COX-2, ciclooxigenasa-2; LOX, lipoxigenasa; P450, monooxigenasas del citocromo P450; PG-EA, prostaglandina-etanolamida; HETE-G, hidroxieicosatetraenoil glicerol. Tomado de [113]

Tabla 1. Afinidad de endocannabinoides por CB1 y CB2

Ligando	Kd (nM)		Referencias
	CB1	CB2	
AEA	89-252	371-581	[114,115]
2-AG	472-3423	1194-1400	[114,116]
2-AG éter	21	>3000	[117,118]
NADA	250	>10000	[119]

Receptores de cannabinoides

Los receptores de cannabinoides más estudiados son CB1 y CB2, se encuentran en la membrana plasmática y de organelos, ambas proteínas poseen 7 dominios transmembrana y presentan 44% de similitud en la secuencia aminoacídica [120]. Ambos receptores se acoplan a proteínas G de clase A y tras el reconocimiento de un ligando, se da el intercambio de guanina difosfato (GDP) por GTP, liberándose así las subunidades activas α y $\beta\gamma$ que median la señalización intracelular [121]. El receptor CB1 se encuentra principalmente en botones presinápticos de neuronas, donde actúan modulando la neurotransmisión, participando de varios procesos neurológicos como la percepción del dolor, la cognición, la percepción del entorno y los circuitos de recompensa en las adicciones [122]. CB1 también está presente en menor medida en tejido adiposo, cardiovascular e inmune, entre otros [123]. Los receptores CB2 se distribuyen principalmente en células hematopoyéticas y del sistema inmune y su activación está asociada a una disminución en la liberación de mediadores proinflamatorios y generación de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno [124]. También se encuentran receptores CB2 en la microglía [125] y en células del endotelio vascular [126] y VSMC [127], entre otras.

CB1 y CB2 están principalmente acoplados a proteínas G con subunidades de tipo $\alpha_{i/o}$ y su activación lleva a la inhibición de la adenilato ciclasa (AC), consecuentemente induciendo una rápida bajada en los niveles de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) [128]. El AMPc es necesario para la activación de la proteína quinasa A (PKA) que activa por fosforilación a la proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB) [129]. En suma, la bajada en el AMPc disminuye la expresión génica regulada por CREB y afecta la plasticidad neuronal [130] y la respuesta inmune [131], entre otras funciones celulares relacionadas a la proliferación y diferenciación celular. También existen reportes de acoplamiento de CB1 con proteínas $G\alpha_s$, aunque con baja afinidad [111], sin embargo, la unión de algunos ligandos a CB1 logra ejercer una estimulación de la AC en células que expresan de manera heteróloga el receptor CB1 humano [132]. Además se ha reportado que la unión de CB1 con un cannabinoide sintético genera la activación de proteínas $G\alpha_q$ [133], llevando al aumento de Ca^{2+} intracelular por la activación de la fosfolipasa C (PLC) [134]. Por otro lado, La activación de CB1 y CB2 también provoca la liberación de la subunidad $\beta\gamma$ de la proteína G [135], que media la inhibición de canales de Ca^{2+} [136] y una modulación de p42/p44 MAPK a través de la activación de la quinasa que produce 3-4-5-fosfatidilinositoltrifosfato (PIP₃K) y consecuente activación de la proteína quinasa B (PKB) [137], además de la PLC [138]. Más recientemente, se ha descrito que la señalización y el tráfico celular de CB1 y CB2 se encuentran regulado por interacciones con β -arrestina 1/2 [139] y otras proteínas moduladoras, como la proteína adaptadora 3 (AP3) y la proteína de clasificación asociada a receptores de proteínas G 1 (GASP1) [140].

Otros receptores de cannabinoides

Actualmente se conocen otros GPRs que son modulados por cannabinoides, como GPR55 [141] y otros más recientemente identificados y menos estudiados como GPR18 [142] y GPR119 [143]. GPR55 es activado por endocannabinoides como AEA y 2-AG y el fitocannabinoide THC, mientras que el cannabidiol (CBD) actúa como antagonista [144]. Sin embargo, GPR55 parece interaccionar más eficientemente con lisofosfolípidos endógenos, productos de la hidrólisis de

fosfolípidos de membrana por las enzimas PLA1/2, como el lisofosfatidilinositol (LPI) [145] o la lisofosfatidilcolina (LPC) [146], por esto y por la baja homología con CB1/2 (<15%) [147], se considera que los lisofosfolípidos son los sustratos endógenos principales de este receptor. La activación de GPR55 lleva a un aumento en el Ca^{2+} intracelular, mediado por la acción de la PLC que libera diacilglicerol (DAG) e 3-4-5-inositoltrifosfato (IP_3) [148]. El DAG es capaz de unirse y activar a varias proteínas quinasas como la C y D (PKC y PKD) [149], mientras que el IP_3 liberado es reconocido por receptores específicos (IP_3R) ubicados en el retículo endoplásmico (RE), que al ser activados permiten el pasaje de Ca^{2+} del RE al citosol [150]. Por otro lado, GPR55 se encuentra principalmente acoplado a proteínas G con subunidades α_{12} y su activación está fuertemente relacionada a la remodelación del esqueleto de actina a través de la activación de quinasas como MAPK y JNK1/2 [151]. La activación de α_{12} cobra particular relevancia en la formación dinámica de proyecciones membranosas ricas en filamentos de actina (F-actina), con implicancias en procesos como en la adhesión, migración y proliferación celular [152].

Otro tipo de receptores que han mostrado interacciones con cannabinoides tanto endógenos como derivados del cannabis, son algunos miembros de la familia de receptores de potencial transitorio (TRP), que actúan como canales iónicos por un corto periodo de tiempo tras su activación frente a diversos estímulos en la membrana citoplasmática [153], también participan en la dinámica endosomal y lisosomal [154]. Dentro de los TRP, el primer receptor descrito de la subfamilia de receptores de unión a vainilloides es el de tipo 1 (TRPV1) y es sensible al pH, a altas temperatura (>42°C) y además, a determinados ligandos con estructuras químicas tipo vainillina, como la capsaicina presente en los ajíes picantes [155]. TRPV1 también es activado por fitocannabinoides como el CBD y su precursor, el ácido cannabidiólico (CBDA) [156] o endocannabinoides como la AEA [157] y el 2-AG [158]. Estas moléculas logran insertarse en la membrana plasmática y alteran la conformación de los dominios transmembrana del receptor, repercutiendo de esta manera, en la formación del canal iónico [159]. La activación de los TRP produce un cambio conformacional que genera un canal de cationes inespecífico, lo que produce una despolarización de la membrana y una consecuente activación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CaV), induciendo un aumento en el Ca^{2+} intracelular [160]. En el caso de los TRPV, se reporta una mayor permeabilidad por los iones Ca^{2+} frente a los de Na^+ : aproximadamente 6 veces más para TRPV4, 10 veces más para TRPV1 [161] e incluso una selectividad >100 veces por Ca^{2+} como sucede con TRPV5/6 [162]. Esto les sugiere a los TRPV un vínculo aún más estrecho con la transducciones de señales celulares tanto en tejidos del sistema nervioso [163] como en el sistema inmune [164]. Asimismo, se conoce de la interacción de distintos fitocannabinoides con otros receptores TRPV, como el TRPV2 que es activado por CBD y THC [165], así como TRPV3/4 que además son activados por otros fitocannabinoides menos abundantes [166]. Incluso se conoce de la interacción de fitocannabinoides con otros tipos de TRP [167], como el caso de TRPA1 que tienen 14 motivos ankyrina en su extremo N-terminal, censa bajas temperaturas (<17°C) [168] y es activado por el THC y por moléculas altamente reactivas como los isotiocianatos presentes en el rizoma del wasabi y los granos de mostaza, también el aldehído cinámico presente en la canela [169]. Otro ejemplo es el TRP relacionado a melastatina 8 (TRPM8) que también censa bajas temperaturas (<23°C) [170] y es activado por el THC y el principal monoterpeno volátil presente en la menta, el (-)-mentol [171].

Fitocannabinoides

En 1940 se describió un grupo de metabolitos secundarios terpenofenólicos presentes en *Cannabis sativa*, actualmente conocidos como fitocannabinoides [172]. Posteriormente, se logró aislar y elucidar la estructura del THC [173]. Actualmente se han encontrado más de 120 fitocannabinoides en ejemplares de *Cannabis sativa* [174], siendo el ácido Δ^9 -tetrahidrocannabinólico (THCA) y el ácido cannabidiólico (CBDA) los más abundantes en el material vegetal fresco. La principal ruta biosintética de fitocannabinoides parte de un isoprenoide, el geranyl pirofosfato (GPP) y del ácido olivetólico (Figura 8). El producto de la decarboxilación del THCA, el THC, posee efectos psicoactivos debido a su acción agonística al unirse a CB1 con alta afinidad (Tabla 2) [175]. Esta característica del THC ha limitado su uso medicinal. Sin embargo, se ha demostrado que el THC tiene potencial uso en la regulación del dolor [176], así como propiedades antiinflamatorias [177]. Por otro lado, el CBD, que se deriva del CBDA y se encuentra principalmente en variedades de cáñamo (históricamente utilizado para fines industriales), no es psicoactivo ya que actúa como antagonista de CB1. Por su parte el CBD, ha sido objeto de intensa investigación debido a sus propiedades antiinflamatorias, analgésicas, ansiolíticas y antitumorales [178,179]. Los ácidos de cannabinoides (e.g. CBDA y THCA) tampoco son psicoactivos y presentan gran potencial farmacológico [180,181]. Otros cannabinoides minoritarios como el cannabigerol (CBG), cannabicromeno (CBC), cannabidivarin (CBDV) y sus precursores ácidos no son psicoactivos y también presentan la capacidad de modular receptores de cannabinoides, TRPs y PPARs entre otros [182]. Incluso, la combinación de cannabinoides parece ser más efectiva que el uso individual para limitar la producción de citoquinas *in vivo*, según reporta una reciente revisión sistemática de estudios preclínicos [183].

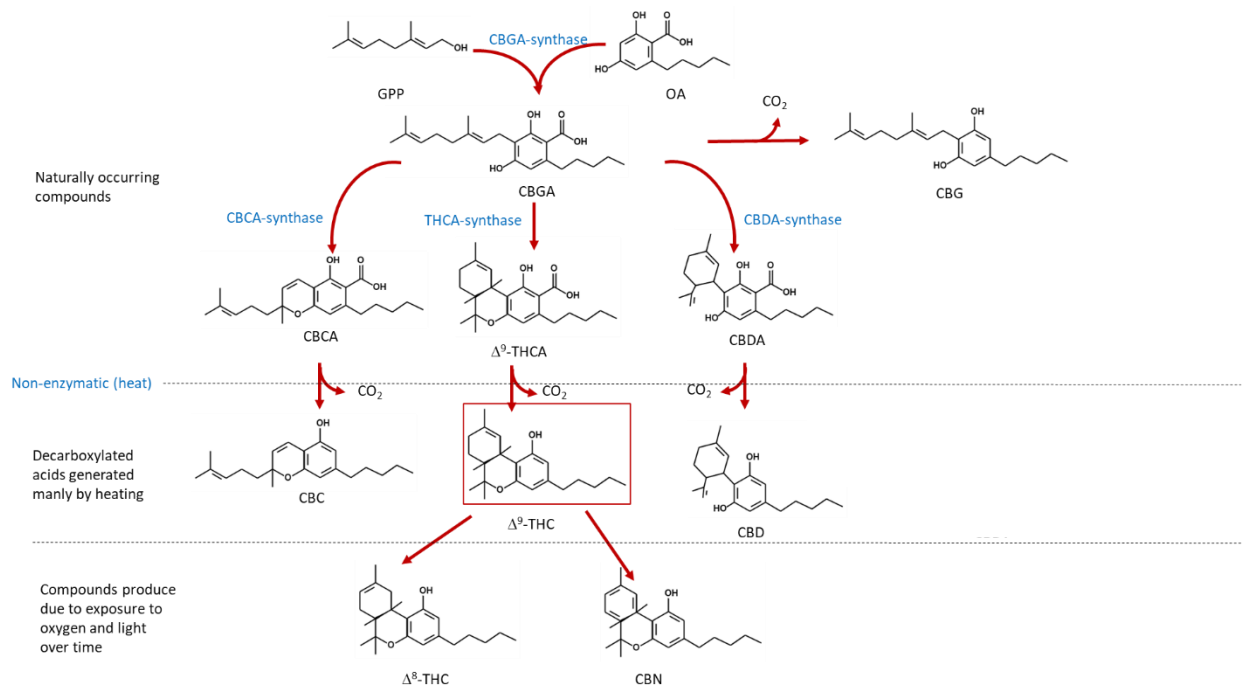


Figura 8. Biosíntesis de fitocannabinoides en *Cannabis sativa*.

Tabla 2. Afinidad de fitocannabinoides por CB1 y CB2

Ligando	Kd (nM)		Referencias
	CB1	CB2	
Δ^9 -THC	18-41	36-42	[115,184]
Δ^9 -THCA	1292	1650	[184]
Δ^8 -THC	78	12	[184]
CBN	75-308	73-96	[115,184]
CBDA	626	813	[185]
CBD	4350	2860	[115]
CBV	565	4780	[184]
CBDV	503	3970	[184]
CBG	3090	2919	[184]
CBGA	4526	>10000	[184]

Cannabinoides y aterosclerosis

Existen solidas evidencias de la vinculación del sistema endocannabinoide con la fisiología cardiovascular. Por ejemplo, la síntesis de CB1 se encontró aumentada en placas ateroscleróticas coronarias de pacientes con ECV. Además se observó un incremento en la concentración de los principales endocannabinoides (AEA y 2-AG) en muestras de arterioectomías coronarias y en plasma de pacientes con aterosclerosis [186].

Notablemente, existen varios reportes del efecto protector de agonistas de CB2 en modelos animales de daño generado por isquemia/reperfusión, observándose una disminución en la inflamación y el daño en los tejidos, debiéndose a una menor activación de las células endoteliales y una menor migración de células inflamatorias [187], así como una protección a la exposición a H₂O₂ *in vitro* [188]. El THC ha mostrado efectos ateroprotectores, como se reporta en [189], donde el tratamiento con este fitocannabinoide detuvo el desarrollo de la placa de ateroma y la quimiotaxis de macrófagos en ratones ApoE^{-/-}, efecto que fue abolido por el uso de un antagonista específico de CB2. Asimismo, se ha reportado que en células endoteliales tratadas con TNF α , la activación de CB2 disminuye la adhesión y quimiotaxis de los neutrófilos [126]. Además, la activación de CB2 detiene la proliferación y migración de VSMC humanas estimuladas con TNF α , según se reporta en [127].

El papel de CB1 en aterosclerosis es más controversial, ya que existen evidencias que sugieren efectos tanto pro como antiateroscleróticos de la activación de este receptor. El rimonabant, un agonista inverso de CB1, ha demostrado reducir las lesiones y disminuir la liberación de citoquinas en un modelo murino de aterosclerosis [190], mientras que la inhibición del CB1 disminuye la producción de citoquinas inflamatorias en macrófagos en cultivo [186,191]. La sobreactivación de CB1 en células endoteliales de arterias coronarias humanas indujo la

producción de especies reactivas de oxígeno, la activación de la vía de la MAPK y consecuentemente la muerte celular [192].

Por otro lado, los cannabinoides interactúan con varios TRPs, tomando particular importancia TRPV1, ya que está involucrado en la regulación de la señalización mediada por Ca^{2+} [193] y modula vías de señalización relacionadas con el desarrollo de la placa aterosclerótica. Se ha reportado que en un modelo murino de aterosclerosis, un agonista específico de TRPV1 disminuyó las lesiones aórticas y redujo la acumulación de lípidos en las VSMC *in vitro* [194]. Otro grupo reportó la inhibición de la formación de células espumosas en VSMC expuestas a LDLox, inducida por la activación de TRPV1 a través de la inducción de la autofagia [195].

Existe evidencia que respalda el uso de fitocannabinoides para contener la inflamación crónica [196], pudiendo ser de particular interés en aterosclerosis [197]. Sin embargo, se desconoce la totalidad de mecanismos moleculares subyacentes a las propiedades pro y antiaterogénicas de los cannabinoides que se observan en los distintos tipos celulares, así como la contribución de los distintos receptores de cannabinoides clásicos, no clásicos y otros receptores que interactúan con cannabinoides o componentes del SEC. De esta manera, basado en las propiedades inmunomoduladoras y antioxidantes, surge el interés de evaluar el potencial de fitocannabinoides como herramientas farmacológicas para limitar el avance de la aterosclerosis.

2. Hipótesis

Los cannabinoides y extractos enriquecidos en estos, tienen potencial uso para el tratamiento y/o prevención de la aterosclerosis.

3. Objetivos

Objetivo general

Evaluar el potencial antiaterogénico *in-vitro* de extractos de *Cannabis sativa*, analizando la influencia de distintos preparados y de fitocannabinoides predominantes en los extractos sobre los principales eventos que llevan al desarrollo de la placa de ateroma: 1. la modificación oxidativa de la LDL, 2. el reconocimiento e internalización de esta lipoproteína modificada por macrófagos, 3. la activación de los macrófagos que lleva a la instauración de un proceso inflamatorio, consistente con la activación de la vía NF-κB y la generación de citoquinas proinflamatorias.

Objetivos específicos

1. Determinar la capacidad de prevenir la oxidación de LDL mediada por Cu^{2+} de extractos de *Cannabis sativa*, preparados a partir de inflorescencias con diferente grado de maduración y composición relativa de cannabinoides.
2. Evaluar la capacidad de los cannabinoides de inhibir la generación de células espumosas por macrófagos expuestos a LDLox.
3. Explorar el efecto de los extractos sobre la polarización macrofágica inducida por LDLox y LPS/INF- γ .

Estrategia experimental

En primer lugar, partiendo de tres variedades de *Cannabis sativa*, se tomaron muestras frescas a tres tiempos distintos de maduración, además de una muestra seca, y se generaron cuatro extractos correspondientes para cada variedad. A estos extractos se le determinó el contenido de cannabinoides mediante $^1\text{H-RMN}$ y se les evaluó la capacidad de inhibir lipoperoxidación de LDL iniciada por Cu^{2+} .

En segunda instancia, se elaboraron extractos de tres muestras de *Cannabis sativa* con quimiotipos distintos, determinados por UPLC y se midió la capacidad de los preparados de inhibir la oxidación de LDL mediada por Cu^{2+} . A continuación, se evaluó la capacidad de estos extractos de inhibir la internalización de LDLox y consecuente transformación de macrófagos J774.1 en células espumosas, empleando microscopía confocal y espectroscopia de fluorescencia. Se exploró la participación de receptores del SEC en el efecto de los extractos, utilizando antagonistas y agonistas específicos de los receptores CB1, CB2, GPR55, TRPV1 y TRPV4. Además, se exploró por inmunodetección el efecto de los extractos sobre la acumulación de receptores *scavenger*, la activación de la vía NF-κB y, sobre la activación de la respuesta modulada por ARE a través de la vía Nrf2. Asimismo, se probó la acción de los extractos sobre la activación macrofágica inducida por LPS/INF- γ , analizando A) la acumulación relativa de la citoquina proIL-1 β por inmunodetección y B) la acumulación relativa de la enzima NOS2 por inmunodetección y cuantificación de NO_2^- generado como indicador de la producción de NO.

4. Materiales y métodos

Reactivos

Todos reactivos y materiales fueron comprados de Sigma-Aldrich™, a menos que se especifique lo contrario.

Fitocannabinoides y ligandos del SEC

Los estándares de referencia de cannabinoides ($\geq 97\%$ pureza) Δ^8 -tetrahidrocannabinol (Δ^8 -THC), cannabidivarin (CBDV), ácido cannabigerólico (CBGA), cannabigerol (CBG), cannabicromeno (CBC) y cannabinol (CBN) fueron comprados de Merck KGaA™. El Ácido Δ^9 -tetrahidrocannabinólico (THCA), ácido cannabidiólico (CBDA) ($\geq 92\%$ pureza), Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) y cannabidiol (CBD) ($\geq 98\%$ pureza) fueron comprados de Echo Pharmaceuticals™. Las partes florales de *Cannabis sativa* fueron proporcionadas por un club de cannabis nacional registrado (#42) con sede en Montevideo, a excepción de la muestra de cáñamo (E3) que fue proporcionada por *International Cannabis Corporation*™.

Se emplearon los siguientes ligandos de los receptores de cannabinoides: el antagonista de CB1 1-(2,4-Diclorofenil)-5-(4-iodofenil)-4-metil-N-1-piperidinil-1H-pirazol-3-carboxamida (AM251) y el antagonista de CB2 6-Iodo-2-metil-1-[2-(4-morfolin)etil]-1H-indol-3-il](4-metoxifenil)metanona (AM630) (Santa Cruz Biotechnology™), el antagonista del TRPV1 2E-N-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il)-3-[4-(1,1-dimetiletil)fenil]-2-Propenamida (AMG9810) (ABCAM), el agonista de TRPV1 8-metil-N-vanillil-6-nonenamida o capsaicina (ABCAM), el antagonista de GPR55 ácido 4-[4,6-dihidro-4-(3-hidroxifenil)-3-(4-metilfenil)-6-oxopirrol[3,4-c]pirazol-5(1H)-il]benzoico (CID16020046), el agonista de GPR55 3-[[4-(2,3-dimetilfenil)-1-piperazinil]carbonil]-N,N-dimetil-4-(1-pirrolidinil)benzenesulfonamida (ML184), el antagonista de TRPV4 2-metil-1-(3-morfolin-4-il-propil)-5-feil-N-[3-(trifluorometil)fenil]pyrrol-3-carboxamida (HC067047), el agonista de TRPV4 N-[(1S)-1-[[4-[(2S)-2-[[2,4-diclorofenil]sulfonil]amina]-3-hidroxi-1-oxopropil]-1-piperazinil]carbonil]-3-metilbutil]benzo[b]thiofeno-2-carboxamida (GSK1016790A), el endocannabinoide y agonista de CB1 y CB2 N-araquidonoiletanolamina o anandamida (AEA) (Santa Cruz Biotechnology™).

Obtención y caracterización de extractos de *Cannabis sativa*

Muestreo #1 y generación de extractos

Se colectaron muestras frescas de partes florales pistiladas, a diferentes tiempos durante el final del período de floración de tres variedades estables de *Cannabis sativa*, denominados SB, EC y Mag. La recolección de muestras se realizó en 3 ocasiones, con un período de 5 días entre la primera y la segunda recolección, y 10 días entre la segunda y la tercera recolección (cosecha final). También se obtuvo una cuarta muestra de partes florales secas (4), 30 días después de la cosecha. Se realizaron extractos de muestras duplicadas (1 g cada una) por maceración dinámica durante 20 minutos en CHCl_3 dos veces con cambio de solvente. El solvente se removió mediante un evaporador rotatorio y los extractos obtenidos se almacenaron a -80°C .

Los rendimientos de extracción se calcularon como el porcentaje de masa de lo extraído sobre la masa inicial de material vegetal, como se expresa en la Ec. 1

$$\text{Ec. 4: Rendimiento (\%)} = \frac{m_{\text{extracto}}}{m_{\text{mat.vegetal}}} \times 100$$

Análisis de cannabinoides por ¹H-RMN

Los extractos de la primera serie de muestras fueron analizados por resonancia magnética nuclear de protón (¹H-RMN), brevemente: 20 mg de los extractos SB, EC o Mag se disolvieron en cloroformo deuterado (CDCl₃), agregando tetrametilsilano (TMS) 250 mM como estándar interno para la cuantificación de los cannabinoides detectados. Los espectros se adquirieron con un equipo DPX 400 MHz (Bruker™), realizando 64 barridos, adquiriendo por 10 minutos y 26 segundos con los siguientes parámetros: 0.16 Hz/point, ancho de pulso (PW) = 30 ° (11.3 ms) y tiempo de relajación (RD) = 1.5 s [198]. Los espectros fueron analizados con el programa MestreNova (Versión 6.0.2-5475, Mestrelab™) donde se determinaron señales correspondientes a hidrógenos de los cannabinoides presentes, además la señal del estándar de concentración conocida.

Muestreo #2 y generación de extractos

Se obtuvieron muestras secas de tres variedades estables de *Cannabis sativa* que presentan quimiotipos con diferentes contenidos relativos de cannabinoides: E1 (THC dominante), E2 (intermedio) y E3 (CBD dominante). Se realizaron extractos por quintuplicado (1 g cada una) por maceración dinámica durante 20 minutos (2 veces) MeOH:CHCl₃ (9:1), según recomienda la *American Herbal Pharmacopeia* para caracterización y cuantificación de fitocannabinoides [199]. Los extractos obtenidos se llevaron a sequedad con el uso de un evaporador rotatorio y se almacenaron a -80°C. Los rendimientos de extracción se calcularon a partir de la Ec. 4.

Análisis de cannabinoides por UPLC-DAD

Los extractos de la segunda serie fueron analizados por cromatografía líquida de ultra performance (UPLC) de la siguiente manera: se disolvieron 100 mg de extracto (E1, E2 y E3) en acetonitrilo, luego fueron sometido a sonicación, se pasaron a través de filtro de 0.2 μm y se almacenaron en viales sellados. Para el análisis se utilizó un equipo Nexera (Shimadzu™) equipado con detector DAD (SPD-M30A), horno de columna (CTO-20A) y *sampler* automático (SIL-30A), los cromatogramas fueron adquiridos utilizando el *software* LabSolutions (versión 5.52 SP2, Shimadzu™). La absorbancia se monitorizó a 270 nm y las señales en el DAD se adquirieron en el rango de 190-800 nm. Las muestras (3 μL) se inyectaron en una columna de fase reversa C18 (1.6 μm, 2.1 mm x 100 mm, CORTECS UPLC, Waters™) con C18 Security-Guard Ultra (AJ0-8782, Phenomenex™), controlando la temperatura de la columna a 30 ± 0.2 °C. La elución se realizó a 0.3 mL/min, con una fase móvil que consiste en sol. A) 50 mM de formiato de amonio con 10% de acetonitrilo (v/v) pH 3.75 y sol. B) acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico (m/v). Para lograr la correcta separación de los diez estándares de fitocannabinoides, se estableció un gradiente en rampa con una caída abrupta cerca del final: comenzó con 55% de sol. B, aumentando al 90% de B en 8 minutos y volviendo a las condiciones iniciales a los 8.01 minutos para reequilibrarse durante 2 minutos más. La concentración de los diferentes

fitocannabinoides se calculó a partir de curvas de calibración realizadas en paralelo, utilizando concentraciones en el rango de 10 a 90 µg/mL de los estándares.

Ensayo de oxidación de LDL

Aislamiento de LDL humana

El plasma humano se obtuvo a partir de sangre donada voluntariamente en el Departamento de Hematología del Hospital de Clínicas, Universidad de la República, los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki y fueron aprobados por el Comité de Ética Institucional. Cada donante de sangre fue informado de su derecho a participar, la relevancia de la investigación y la protección de la información personal y firmó un consentimiento.

La LDL se aisló a partir de plasma humano utilizando un procedimiento ya publicado [200] y adaptado [201] que consta de una ultracentrifugación en vertical, con gradiente de densidad. Brevemente, las muestras de plasma humano se mezclaron con KBr (0.28 g/mL) para llevarlo a densidad ≈ 1.20 g/mL y se colocaron en tubos de ultracentrífuga, con rotor de ángulo fijo, hasta aproximadamente 30% de su volumen, el restante se completó con una solución de NaCl 0.15 M (1.01 g/mL), añadida lentamente para generar 2 fases bien definidas para luego poder formar el gradiente de densidad. Las muestras se centrifugaron a 300.000 g durante 90 minutos a 4°C, empleando una ultracentrífuga Sorvall WX-80 (Thermo Fisher™). Se recolectó la fracción enriquecida en LDL que se ve naranja por la presencia de carotenoides y aparece en el centro del gradiente (LDL 1.02-1.06 g/mL) [202]. La fracción colectada se dializó a 4°C contra amortiguador fosfato salino (PBS) pH 7.4 para eliminar el KBr. La concentración de proteína de la fracción de LDL se determinó a 280 nm utilizando el coeficiente de extinción (ϵ) de la ApoB100: $1 \text{ (mg/mL)}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, según se reporta en [203].

Lipoperoxidación de LDL *in vitro*

La LDL aislada previamente, se sometió a oxidación inducida por Cu^{2+} y la formación de dienos conjugados se siguió espectrofotométricamente a 234 nm, como se describe en [204], utilizando un espectrofotómetro Cary UV-Vis (Agilent Technologies™). La cinética de la oxidación de LDL por Cu^{2+} permite estudiar los cambios en la fase de iniciación (tiempo de latencia) y la fase de propagación que crece exponencialmente. De esta manera se realizaron incubaciones de LDL (0.1 mg/mL) con CuSO_4 (50 µM) a 37°C en una solución amortiguadora de fosfato 100 mM pH 7.4 en presencia de vehículo (DMSO 0.2 %) o concentraciones crecientes de extractos de cannabis de la serie muestral #1 (0.5-5 µg/mL) o extractos de la serie #2 (0.5-3.5 µg/mL), o los cannabinoides aislados THCA, THC, CBDA y CBD (0.065-1.25 µg/mL). Los datos obtenidos se ajustaron a la siguiente función sigmoidea:

$$\text{Ec. 5: } ABS_{234nm} = \frac{A_1 + (A_2 - A_1)}{1 + 10^{((\log DE_{50} - \log(\text{concentración}))S)}}$$

Donde A_1 y A_2 representan la absorción mínima y máxima, respectivamente; mientras que la dosis efectiva 50 (DE_{50}) se obtuvo a partir del punto de inflexión y S de la pendiente de la fase de propagación. La latencia (Lat) se midió como el tiempo desde la adición del oxidante hasta

que la absorción alcanzó el 10% de la amplitud total ($A_2 - A_1$). Por un lado, se calculó el cociente de latencias como la relación entre la duración de la fase de iniciación en presencia (Lat_e) y ausencia (Lat_0) de extractos o cannabinoides. Este cociente se graficó en función de los μg de compuesto agregado, la pendiente de esta recta se consideró como la capacidad antioxidante (CA) por μg de extracto:

$$\text{Ec. 6: } CA/\mu g_e = \frac{\partial \frac{Lat_e}{Lat_0}}{\partial \mu g_e}$$

Por otro lado, la capacidad para interrumpir las cadenas de reacción durante la fase de propagación, denominada aquí como Protección, se calculó a partir de la relación entre la pendiente de la fase de propagación obtenida en presencia de extracto (S_e) o cannabinoides y en ausencia de estos (S_0) expresado como porcentaje:

$$\text{Ec. 7: } \textit{Protección} (\%) = 100 - \frac{S_e}{S_0} \times 100$$

Posteriormente se determinó la CI_{50} de la propagación, para cada compuesto a partir del ajuste sigmoideo de la curva dosis-respuesta normalizada de la Protección vs. Logaritmo de la concentración (Ec. 5). La estimación precisa de las CI_{50} se vio afectada por la prolongación de la fase de latencia a altas concentraciones de tratamientos, lo que obligó a realizar los experimentos a 37°C hasta un máximo de 4 h para evitar evaporación y oxidación no controlada. Por este motivo se reportan las CI_{50} con sus intervalos de confianza de 95 %.

$$\text{Ec. 8: } \textit{Protección} (\%) = \frac{100}{1 + 10^{((\log CI_{50} - \log(\text{concentración})) \text{pend. Hill})}}$$

Oxidación y marcado fluorescente de LDL

La LDL aislada fue sometida a una oxidación suave iniciada por Cu^{2+} y posteriormente etiquetada con la sonda fluorescente lipofílica (2Z)-2-[(E)-3-(3.3-dimetil-1-octadecilindol-1-il-2-il)prop-2-enilideno]-3.3-dimetil-1-octadecilindol (Dil) (AnaSpec™). En resumen, la LDL (3 mg/mL) fue dializada en PBS pH 7.4 con CuSO_4 20 μM a 25°C durante 4 h, en agitación y oscuridad. La oxidación se detuvo cambiando la solución de diálisis a PBS con el quelante DTPA 1 mM durante 18 h con dos cambios de solución de diálisis adicionales. Obtenida la LDL con bajo grado de oxidación (LDLox), se le agregó BHT 0.02% (m/v) para prevenir su oxidación posterior.

El grado de oxidación de LDLox fue determinado por su contenido de MDA a través de la técnica TBARS y de manera cualitativa se analizó el aumento de absorbancia a 234 nm, indicativo de la aparición de dienos conjugados. Además, se analizó el cambio en la movilidad electroforética debido a la oxidación de la porción proteica de la LDL [205].

Para obtener la LDL o LDLox marcada con Dil, estas se incubaron con 50 μL de Dil (3 mg/mL en DMSO) por mg de proteína de LDL durante 18 h en oscuridad a 37°C sin presencia de oxígeno. El complejo LDLox-Dil se centrifugó a 22.000 g durante 1 h a 4°C para eliminar el exceso de sonda no unida y se dializó contra PBS con 0.1 mM de DTPA. La incorporación de la sonda fluorescente en la LDLox se corroboró mediante espectroscopia UV-Vis.

Las muestras de LDL, LDL-Dil, LDLox y LDLox-Dil fueron esterilizadas por filtración (0.2 μm) y almacenadas a 4°C en la oscuridad, durante un máximo de 3 semanas en viales sellados burbujeados con argón.

Análisis del grado de oxidación lipídica por TBARS

Se cuantificó el contenido del producto de oxidación lipídica MDA, presente en LDL y LDLox utilizando la técnica TBARS [206], donde el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) reacciona con el MDA presente y forma un compuesto fluorescente que permite su cuantificación utilizando una curva de calibración adecuada. En resumen, LDL u LDLox se hizo reaccionar con el doble de volumen de TBA 0.375% y HCl 0.25 M en baño de agua a ebullición por 15 min. Se registró la fluorescencia, con $\lambda_{\text{ex}} = 530$ y $\lambda_{\text{em}} = 550$ nm. Si bien la técnica TBARS presenta varias limitaciones, como ser baja especificidad y sensibilidad [207], y la detección fluorimétrica en fluidos biológicos no está recomendada, en este trabajo se utilizará con el fin de obtener una medida relativa del grado de lipoperoxidación asumiendo que lo único que reacciona con TBA, es el MDA presente en las muestras.

Análisis del grado de oxidación proteica por Electroforesis nativa

Para evidenciar la oxidación proteica de la LDL se realizó una separación electroforética, en condiciones nativas, en gel de agarosa 0.5% (m/v). Se sembraron 10 μg de LDL u LDLox y se sometieron a un campo eléctrico de 90 V por 150 min. Posteriormente se reveló con Coomassie-coloidal®.

Cultivo celular

Células J774.1

La línea de células tipo macrófagos de ratón, J774.1 (ATCC-TIB-67) se mantuvo, no más de 15 pasajes luego de descongeladas, en estufa a 37°C con CO₂ 5%, en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con alto contenido de glucosa (4.5 g/L), glutamina (4 mM) y piruvato de sodio (110 mg/L) (Gibco™). El DMEM se suplementó con penicilina (100 U/mL), estreptomina (100 mg/L) y suero fetal bovino (SFB, Gibco™) inactivado por calor (10%). Los ensayos se realizaron siempre con las células en semi-confluencia, sembradas 24 h antes a menos de que se indique lo contrario.

Células THP-1

La línea de celular de monocitos humanos, THP-1 (ATCC-TIB-202) se mantuvo, no más de 8 pasajes luego de descongeladas, en estufa a 37°C con CO₂ 5% en medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) con alto contenido de glucosa (4.5 g/L), glutamina (4 mM) y piruvato de sodio (110 mg/L) (Gibco™). El RPMI se suplementó con penicilina (100 U/mL), estreptomina (100 mg/L) y SFB inactivado por calor (10%). Los ensayos se realizaron siempre con las células en semi-confluencia, diferenciadas a células tipo macrófago con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, 100 nM) por 72 h, con 24 hs posteriores de recuperación en medio completo.

Análisis por microscopía de fluorescencia de la formación de células espumosas

Células J774.1 (5×10^3 cél/ml) se sembraron y cultivaron en portaobjetos impresos con teflón (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG™) durante 48 horas hasta alcanzar semiconfluencia. Luego, las células se incubaron en ausencia y presencia de concentraciones crecientes (5-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de los extractos, después de una hora de incubación, se agregó LDLox-Dil (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubó durante 4 horas a 37°C , 5% de CO_2 . Finalmente, las células se lavaron dos veces con PBS-BSA 5% y una vez más con PBS, luego se fijaron con paraformaldehído 2.5% en solución amortiguadora compuesta de PIPES 60 mM, HEPES 25 mM, EGTA 10 mM y MgCl_2 2 mM, pH 7.2 (PHEM), a 4°C durante 10 minutos, seguido de un paso de permeabilización con PHEM que contiene TX100 0.1% durante 10 minutos. A continuación, los núcleos se tiñeron con DAPI y las células se lavaron con PHEM dos veces más. Se utilizó un microscopio confocal láser de barrido LSM ZEISS 800 (Zeiss Microscopy™). Se usaron 2 canales con filtros a 700 nm y 535 nm, y el análisis de la señal se realizó con el software ZEN Blue 2.3 (Zeiss Microscopy™). Las imágenes se generaron a partir del apilamiento de diez planos focales ($0.25 \mu\text{m c/u}$). Se evaluaron 100 células de ocho campos diferentes en cada condición y la intensidad de fluorescencia se normalizó con el área citoplasmática (I/A). Los resultados se expresaron como el porcentaje de I/A obtenido con los tratamientos en comparación con el control incubado con vehículo (0.2% DMSO).

Análisis por espectroscopia de fluorescencia de la Internalización de LDLox

Se desarrolló un método cuantitativo para evaluar la captura intracelular de LDLox-Dil mediante modificaciones de una técnica ya publicada [208]. Las células J774.1 (2.5×10^5 cél/mL) se incubaron en placas de 6 pocillos con los distintos tratamientos: extractos E1, E2 y E3 (0.1-15 $\mu\text{g}/\text{mL}$); fitocannabinoides THCA, THC, CBDA y CBD (0.1-5 $\mu\text{g}/\text{mL}$); endocannabinoide AEA (0.001-125 μM) y LDLox-Dil (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 24 horas a 37°C , CO_2 5%. Inmediatamente después, las células se lavaron con PBS, luego con PBS pH 3 y nuevamente con PBS para eliminar el complejo LDLox-Dil no internalizado. Las células se rasparon y recolectaron en PBS-TX100 1%, se centrifugaron dos veces a 22.000 g durante 30 min a 4°C . La concentración de proteína se determinó con el kit colorimétrico BCA (Merck & Co™), utilizando el lector de placas Varioskan Flash (Thermo Fisher™) a 562 nm. La fluorescencia se midió en un espectrofluorímetro FP-8200 (JASCO™). Luego de realizar barridos de excitación y emisión, se seleccionaron $\lambda_{\text{exc}} = 540 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 564 \text{ nm}$ ya que la señal obtenida no presenta interferencias y muestra una buena correlación con la concentración de LDLox-Dil. La señal fluorescente obtenida de las células expuestas a LDLox en presencia de los tratamientos se corrigió por el contenido de proteína, como análogo a la cantidad de células y se normalizó a la condición con solo vehículo (0.2% de DMSO). Se determinaron las DE_{50} para los extractos y fitocannabinoides aislados graficando el logaritmo de la concentración vs. respuesta normalizada, utilizando la siguiente ecuación (Ec. 9):

$$\text{Ec. 9: LDLox - Dil int. (\%)} = \frac{100}{1 + 10^{(\log \text{DE}_{50} - \log(\text{concentración})) \text{pend. Hill}}}$$

Efecto de antagonistas y agonistas del SEC sobre la internalización de LDLox

Las células J774.1 fueron tratadas por 6 y 24 hs con LDLox-Dil (10 µg/mL) y extractos a dosis ~DE₇₀, E1 (2 µg/mL), E2 y E3 (5 µg/mL), además de antagonistas de los receptores CB1 y CB2 y antagonistas y agonistas de los receptores GPR55, TRPV1 y TRPV4: antagonista de CB1 AM251 3.5 µM, antagonista de CB2 AM630 3.5 µM, antagonista de GPR55 CID16020046 8 µM, antagonista de TRPV1 AMG9810 5 µM, antagonistas de TRPV4 HC067047 10 µM, agonista de GPR55 ML184 10 µM, agonista de TRPV1 capsaicina 50 µM, agonista de TRPV4 GSK1016792A 10 µM. Las muestras fueron procesadas como se detalla en el punto anterior y se obtuvo un valor de señal fluorescente corregida por el contenido de proteína, que se normalizó a la condición con vehículo, 0.2% DMSO en todos los casos, salvo para CID16020046A y ML184 donde se requirió utilizar 0.4% DMSO.

Efecto de quelantes de Ca²⁺ intra y extracelulares sobre la internalización de LDLox

Para reducir el Ca²⁺ intracelular, se incubaron las células J774.1 en semi-confluencia por 30 minutos con BAPTA-AM 5-20 µM a 37°C. Luego las células se incubaron por 30 minutos más a temperatura ambiente y posteriormente fueron lavadas tres veces con PBS. Una vez cargadas las células con el quelante de Ca²⁺, se incubaron por 6 h con LDLox (10 µg/mL). Para eliminar el Ca²⁺ extracelular, se agregó EGTA 4 mM al medio de cultivo y se procedió a incubar las células J774.1 por 6 h con LDLox, como se describió previamente.

Ensayo de citotoxicidad

La viabilidad celular se determinó mediante la reducción de MTT (Merck & Co™) a formazán. Las células en semiconfluencia se incubaron en DMEM con concentraciones en aumento de extractos (1-40 µg/mL), fitocannabinoides (1-10 µg/mL), el endocannabinoide AEA (0.001-125 µM) o vehículo (0.2% de DMSO) durante al menos 24 horas a 37°C. Los compuestos AM251, AM630, AMG, Cap, ML, CID, HC y GSK se testearon al menos a la concentración máxima utilizada en los demás ensayos para descartar citotoxicidad. El medio se reemplazó con DMEM + MTT (0.1 mg/mL) y las células se incubaron a 37°C durante 4 horas. Después de retirar el medio, los cristales de formazán se disolvieron en DMSO y se midió la absorbancia utilizando el lector de placas Varioskan a 560 nm. Los resultados se normalizaron con respecto a la condición con solo vehículo y se realizaron ajustes a la respuesta normalizada de la dosis expresada en logaritmo, como se describió antes, para determinar la dosis letal al 50% (DL₅₀).

$$\text{Ec. 10: Viabilidad (\%)} = \frac{100}{1 + 10^{((\log DL_{50} - \log(\text{concentración})) \text{ pend. Hill})}}$$

El Índice terapéutico (IT) [209], calculado como el cociente entre DL₅₀ y DE₅₀, da cuenta de que tan efectivo es un tratamiento, dentro de cierto modelo experimental, considerando su toxicidad en el mismo. De esta manera, se calcularon los IT de los extractos E1, E2, E3 y los fitocannabinoides THCA, THC, CBDA y CBD, utilizando los valores de DE₅₀ de internalización de LDLox-Dil obtenidas.

Activación macrofágica

Las células J774.1 se cultivaron en placas de 6 pocillos hasta semiconfluencia. Para activar el fenotipo inflamatorio, las células se incubaron en medio completo en ausencia y en presencia de LDLox (10 µg/mL) o LPS (5 µg/mL) e INF-γ (400 U/mL) por 24 horas, a 37° C y 5% CO₂. La combinación LPS/INF-γ se empleó para activar la acumulación de IL-1β y de NOS2, ya que este efecto no se logró con la incubación en presencia de LDLox.

Preparación de lisados celulares

Las placas con células se colocaron en hielo y se lavaron 3 veces con PBS frío. A continuación, se levantaron en PBS con rastrillos para células, se centrifugaron a 200 g y se re suspendieron en una solución amortiguadora de lisis, compuesta de la siguiente manera: Tris-HCl (pH = 7.2) 50 mM; NaCl 100 mM; EGTA 1 mM; TX-100 1%; Na₃VO₄ 0.5 mM y Na₄P₂O₇ 2.5 Mm, además se agregó el coctel de inhibidores de proteasas SIGMAFAST® previamente a lisar las células. El contenido de proteínas de los lisados celulares se determinó utilizando el kit BCA como ya ha sido mencionado.

Análisis de proteínas por SDS-PAGE y Western Blot

SDS-PAGE

Se realizaron separaciones electroforéticas en geles de poliacrilamida (PAGE), con el detergente aniónico SDS 0.1%, basado en el método descrito previamente [210]. De cada muestra, se cargó 25 µg de proteínas en una solución amortiguadora compuesta de: Tris-HCl (pH 6.8) 50 mM; glicerol 10%; SDS 2%; β-mercaptoetanol 1%, azul de bromo fenol 0.02%, en geles de poliacrilamida al 12-15%. Las muestras se corrieron a 25 mA en una solución amortiguadora compuesta de: Tris (pH 8.3) 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%. Se adicionó el marcador de peso molecular Novex® (Thermo Fisher™)

Western Blot

Se realizó la inmunodetección de proteínas, ajustando el método descrito por [211] y [212]. Las proteínas se inmovilizaron en membranas de PVDF (Thermo Fisher™) utilizando una solución de transferencia compuesta de Tris (pH = 8.3) 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20%, aplicando 100 V durante 1 h. Las membranas se incubaron en solución de bloqueo, compuesta de Tris-HCl (pH 7.5) 0.01 M, NaCl 0.075 mM, Tween20 0.1% (TBS-T) y leche descremada 5%, por 1 h a TA. Luego se agregaron los anticuerpos primarios, en solución de bloqueo diluidos 1/500-1/1000, por 1 h a TA o hasta el otro día a 4°C. Se realizaron 3 lavados de 5 min en TBS-T y se agregaron los anticuerpos secundarios fluorescentes diluidos 1/10000 en solución de bloqueo, por 1h a TA. La señal fluorescente fue registrada en un equipo G-Box (Syngene™), con tiempos de exposición entre 30 seg y 5 min. Se realizaron análisis densitométrico de las señales obtenidas utilizando el software ImageJ (U.S. NIH).

Anticuerpos primarios: CD36 de ratón y OLR1 de conejo (Antibodies™), SR-A1 de conejo, IL-1β de conejo y GAPDH de ratón (ABCAM™), NOS2 de conejo (Novus Biologicals™), p(Ser536)-p65

de conejo (cat#3033), p65 de conejo, p-IkB α de conejo e IkB α de conejo (Cell Signaling™), HO-1 de ratón (Enzo Lifescience™), β -actina de conejo y Nrf2 de conejo (Sigma-Aldrich™).

Anticuerpos secundarios fluorescentes: IRDye® 680LT anti IgG de ratón, IRDye® 800LT anti IgG de ratón, IRDye® 680LT anti IgG de conejo, IRDye® 800LT anti IgG de conejo (Licor Biosciences™).

Cuantificación de NO₂⁻

Se determinó la concentración de NO₂⁻ acumulado en los medios de cultivo, como indicativo de la activación de la NOS2 y consecuente producción de NO \cdot , luego de incubar células J774.1 con LPS e INF- γ . Para la cuantificación, se realizaron curvas de calibración de NaNO₂ realizando diluciones seriadas con material volumétrico

Se adaptó una técnica ya publicada [213] que se basa en la reacción de diazotización descrita por Peter Griess en 1858 [214]. Células J774.1 (2.5x10⁵ cél/mL), en medio de cultivo sin rojo fenol, se trataron con extractos de cannabis y se incubaron por 24 hs con LPS (5 μ g/mL) e INF- γ (400 U/mL). Luego de la incubación, los medios de cultivo fueron recogidos y se centrifugaron a 14.000 g por 10 min para descartar desechos celulares. Los sobrenadantes obtenidos se hicieron reaccionar 1:1 con el reactivo de Griess, compuesto en partes iguales de A) N-(1-naftil) etilendiamina diclorhidrato (NEDD) 0.1% en H₂O m/v y B) sulfanilamida 2% m/v en 5% HCl (v/v). La técnica se basa en la reacción del NO₂⁻ presente en la muestra con la sulfanilamida y consecuentemente con NEDD, para la generación de un compuesto con máximo de absorbancia a 543 nm.

Análisis estadísticos

Los datos fueron analizados utilizando GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software™). Las correlaciones fueron analizadas mediante regresión lineal, reportándose los coeficientes de determinación (R²). Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía o de dos vías, según corresponda. Se realizaron comparaciones múltiples aplicando la corrección de Dunnett para comparar las condiciones tratadas contra una condición control sin tratamiento, o la corrección de Tukey para comparar entre distintas condiciones de tratamiento. Las diferencias con p < 0.05 se consideraron estadísticamente significativas.

5. Resultados

Caracterización química de los extractos de *Cannabis sativa*

Obtención y caracterización de extractos serie #1

Con el fin de comparar la evolución temporal del contenido de cannabinoides en el tramo final del periodo de floración, se colectaron las muestras de flores de SB, EC y Mag, a diferentes tiempos hasta completar el ciclo de cultivo. La recolección de muestras se realizó en 3 ocasiones, con un período de 5 días entre la primera (e.g SB1) y la segunda (e.g SB2) recolección, y 10 días entre la segunda y la tercera recolección (e.g SB3) corresponde con la cosecha final. También se incluyó una cuarta muestra de partes florales secas (e.g SB4) en el muestreo con 30 días de secado posterior a la cosecha. En la Tabla 3 se detallan los rendimientos de extracción, donde se puede apreciar una tendencia al aumento junto con la maduración. Las muestras secas rindieron una mayor extracción al partir de material vegetal deshidratado, como era de esperar.

Tabla 3. Efecto de la maduración y secado de flores sobre el rendimiento de la extracción con CHCl_3 de metabolitos presentes en flores de cannabis, de la serie muestral #1

		Rendimiento (%) ^a		
Muestra		SB	EC	Mag
1	día -15	11.2 ± 1.1	8.0 ± 1.2	10.4 ± 0.6
2	día -10	13.3 ± 1.9	13.1 ± 1.3	15.5 ± 1.4
3	cosecha	16.1 ± 2.4	14.8 ± 2.2	15.0 ± 2.0
2	secado	26.2 ± 1.4	26.4 ± 3.2	16.0 ± 0.8

^aRendimientos de extracción en porcentaje, calculado como la masa obtenida respecto a la masa total de cada muestra, con su desvío estándar, n=2.

Los extractos se analizaron por ^1H -RMN y la cuantificación de fitocannabinoides se realizó a partir de señales específicas en los espectros obtenidos, que en CDCl_3 aparecieron entre 5.5 y 6.8 ppm (Figura 9). Se integraron las áreas de los picos con un desplazamiento químico de 6.39 ppm para THCA y 6.14 ppm para THC, los únicos cannabinoides encontrados, ya que a 5.5 y 5.6 ppm (CBD y CBDA respectivamente [215]) no se registraron señales (Figura 9).

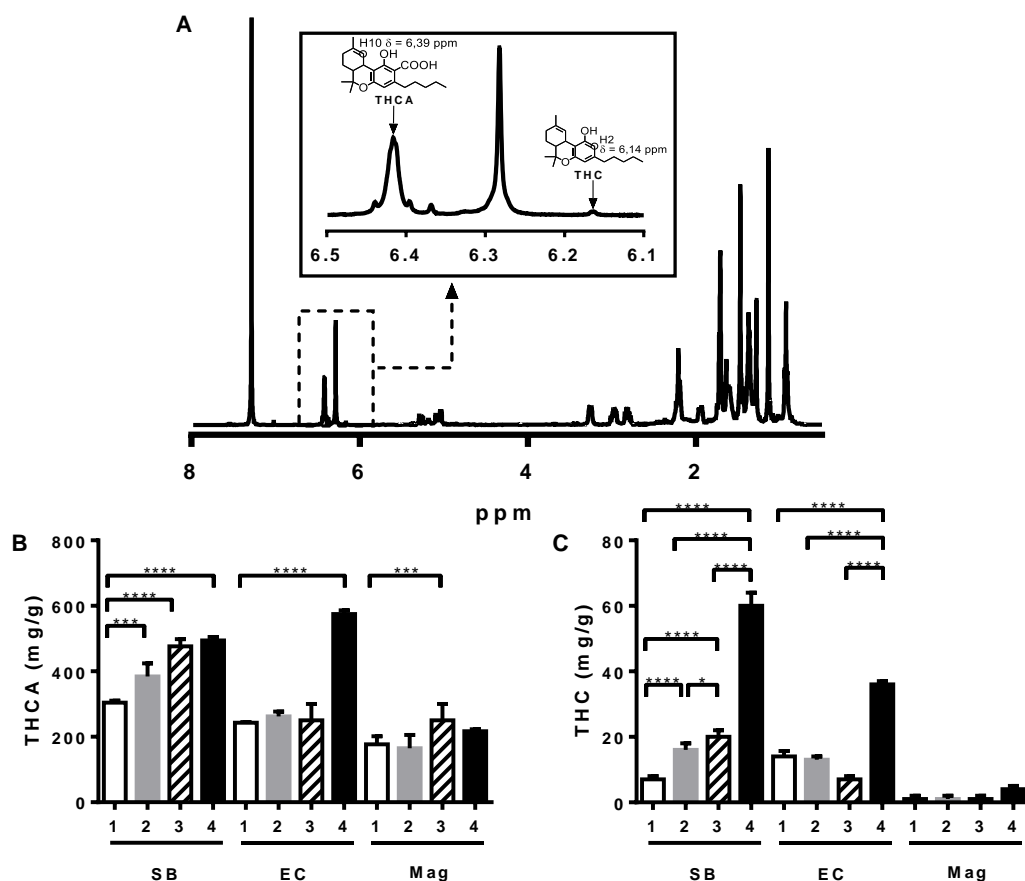


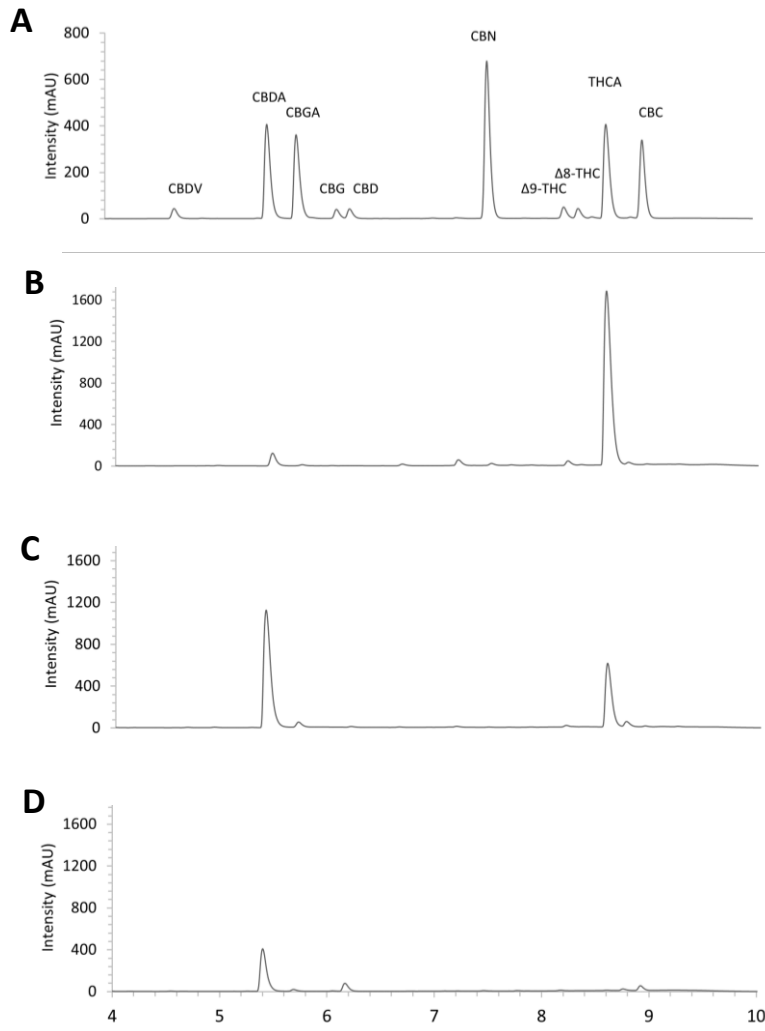
Figura 9. Espectro de ^1H -RMN y cuantificación de THCA y THC de extractos de la serie muestral #1. A. Se muestra como ejemplo el espectro con detalles del extracto SB3. La señal de H10 (6.39 ppm) para THCA y la de H2 (6.14 ppm) para THC se utilizaron para la cuantificación. B. Los mg de THCA y C. THC por gramo de extracto determinadas en las muestras 1 (barras blancas), 2 (barras grises), 3 (barras punteadas), y la muestra seca, 4 (barras negras). Los resultados se muestran como promedios \pm SD, $n = 3$. ANOVA de 2 vías con Dunnett *post hoc* (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

El cannabinoide predominante encontrado en los extractos fue el THCA ($\geq 95\%$) y en una proporción muy baja su producto de descarboxilación, el THC, en concordancia con informes anteriores [216]. Según el análisis de varianza de dos vías, se observa una acumulación de cannabinoides a través del tiempo, y es distinto para las tres variedades. En particular se observó un aumento progresivo de THCA durante la maduración en las variedades SB y Mag, mientras que el aumento de THC solo fue significativo para SB. El aumento en el nivel de cannabinoides fue concordante con reportes anteriores, donde se encontró un aumento significativo en la acumulación de cannabinoides en las dos últimas semanas antes de la cosecha [198,217]. Las muestras secas (punto 4 de recolección) de SB y EC mostraron un aumento de THC. Sin embargo, el contenido de THC de la muestra 4 en Mag se mantuvo constante y muy bajo (Figura 9C).

Obtención y caracterización de extractos serie #2

Los perfiles químicos de estos extractos se analizaron mediante UPLC-DAD (Figura 10). Los rendimientos de extracción de los tres extractos se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Rendimiento de la extracción con MeOH:CHCl₃ (9:1) de metabolitos presentes en flores de cannabis de la serie muestral #2



Muestra	Rendimiento (%) ^a
E1	31.4 ± 1.2
E2	31.1 ± 2.1
E3	5.9 ± 0.9

^aRendimientos de extracción en porcentaje calculado como la masa obtenida respecto a la masa total de cada muestra. Los resultados se muestran como promedios ± SD, n = 5.

Figura 10. identificación de cannabinoides presentes en extractos de la serie muestral #2 por UPLC-DAD. A. Elución representativa de los diez cannabinoides estándar (50 µg/mL cada uno) utilizados para determinar el contenido de cannabinoides presentes en los extractos. **B, C y D.** Perfiles de elución (270 nm) de los tres extractos analizados, E1, E2 y E3 respectivamente. Escala temporal en minutos.

Tabla 5. Contenido de cannabinoides de los extractos de la serie muestral #2 determinados por UPLC-DAD.

Cannabinoide	RT (min)	E1		E2		E3	
		($\mu\text{g}/\text{mg}$)	(%) ^a	($\mu\text{g}/\text{mg}$)	(%)	($\mu\text{g}/\text{mg}$)	(%)
CBDV	4.65	3.43 \pm 0.01	0.6	ND	0.0	3.0 \pm 0.1	1
CBDA	5.52	25 \pm 5	4.3	301 \pm 9	60.1	99.6 \pm 0.7	32.4
CBGA	5.79	3.0 \pm 0.1	0.5	12.6 \pm 0.1	2.5	3.7 \pm 0.1	1.2
CBG	6.05	4.8 \pm 0.2	0.8	2.5 \pm 0.5	0.5	5.9 \pm 0.2	1.9
CBD	6.16	6.2 \pm 0.1	1.1	16.7 \pm 0.8	3.3	175 \pm 1	57.1
CBN	7.56	2.51 \pm 0.05	0.4	0.35 \pm 0.02	0.1	0.56 \pm 0.01	0.2
Δ^9THC	8.27	73 \pm 5	12.8	30 \pm 1	5.9	11.8 \pm 0.1	3.9
Δ^8THC	8.40	29 \pm 3	5.1	3.0 \pm 0.9	0.6	ND	0.1
Δ^9THCA	8.67	422 \pm 6	74.0	133 \pm 5	26.6	0.39 \pm 0.01	0.1
CBC	8.99	1.20 \pm 0.04	0.2	1.7 \pm 0.6	0.3	6.9 \pm 0.2	2.3
Cannabinoides totales		570	100	500	100	307	100
Cociente THC(A):CBD(A)^b		16		0.5		0.03	
Quimiotipo		THC(A) dominante		Intermedio		CBD(A) dominante	

^aPorcentaje de cannabinoides relativo al total de cannabinoides detectados.

^bCociente entre la suma de THCA+THC y CBDA+CBD.

^cNo detectado.

Los resultados se muestran como promedios \pm SD, n = 3.

Los perfiles químicos de los extractos mostraron las siguientes relaciones THC(A)/CBD(A): E1 = 16 (THC(A) dominante), E2 = 0.5 (intermedio) y E3 = 0.03 (CBD(A) dominante (Tabla 5). Los cannabinoides predominantes en el extracto E1 fueron el THCA y THC, que contribuyen en conjunto a más del 85% del contenido total de cannabinoides en esta variedad, confirmando así su propiedad psicoactiva. El contenido de los compuestos con potencial psicoactivo en el extracto E2 fue inferior al 50% del total de cannabinoides, con un aumento significativo de CBDA y una relación THC(A)/CBD(A) inferior pero cercana a 1, lo cual es consistente con un quimiotipo intermedio. El extracto derivado de cáñamo (E3) mostró un perfil químico rico en CBDA y CBD y muy bajo contenido en peso de compuestos con potencial psicoactivo (THC(A) \leq 1 % m/m).

Extractos de cannabis sativa disminuyen la oxidación de LDL *in vitro*

Efecto de los extractos de la Serie #1 sobre la oxidación de LDL mediada por Cu^{2+}

La generación de dienos conjugados a partir de LDL tratada con Cu^{2+} se evaluó por absorbancia a 234 nm. La fase de iniciación, debida a los antioxidantes endógenos presentes en la LDL, duró alrededor de 30 min en ausencia de cannabinoides. Como se puede ver en la Figura 11A, la duración de esta fase inicial aumentó linealmente con la cantidad de extracto SB3 (Figura 11B). En este sentido, la fase de latencia aumentó más del doble por cada μg de SB ($\text{CA}/\mu\text{g} = 2.4\text{-}3.5$) y EC ($\text{CA}/\mu\text{g} = 3.2\text{-}3.4$).

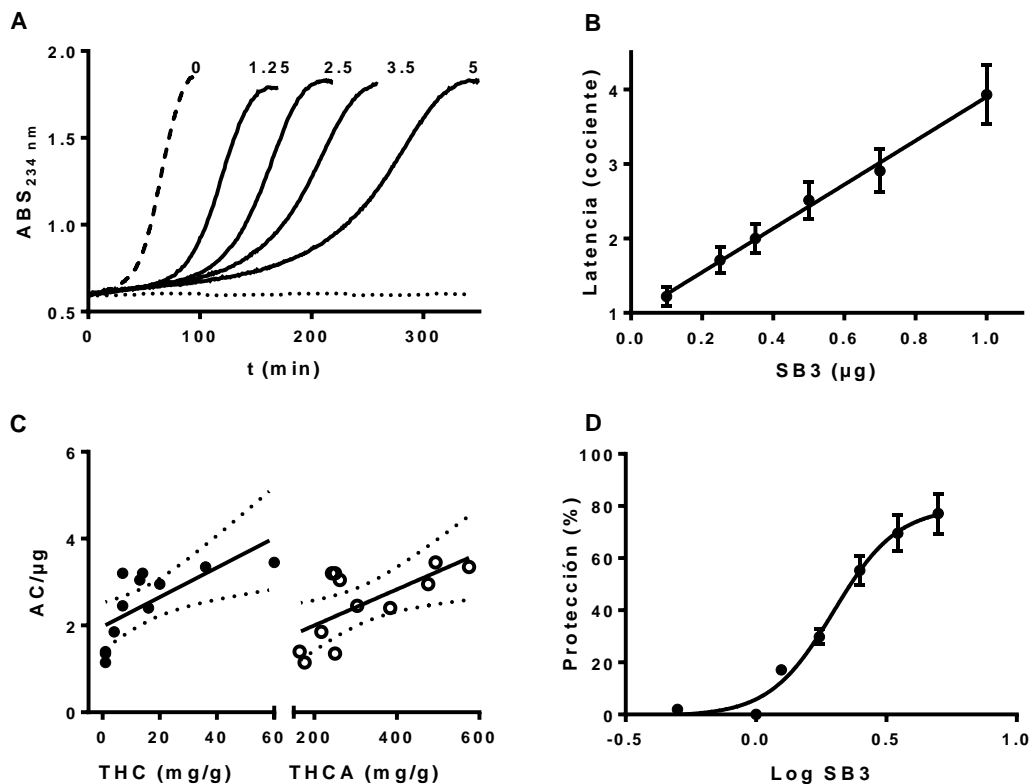


Figura 11. Efecto de extracto de la serie #1 sobre la oxidación de LDL mediada por Cu^{2+} . A. Se registró la formación de dienos conjugados a 234 nm con LDL (0.1 mg/mL) tratada con CuSO_4 (50 μM), en ausencia (línea discontinua) o en presencia de extracto de cannabis (líneas continuas). Se muestran curvas representativas obtenidas con el extracto SB3 (1.25-5 $\mu\text{g/mL}$) y un control sin CuSO_4 (línea punteada). B. Ajuste lineal entre el cociente de Latencias (latencia/latencia control) vs. μg de extracto SB3. Los resultados se muestran como promedios \pm SD, $n = 3$. C. Correlación entre la AC/ μg y la concentración de THC y THCA de todos los extractos de la serie muestral #1. D. Gráfico dosis-respuesta del extracto SB3 y la protección a la propagación de la lipoperoxidación, expresado en porcentaje respecto al control sin extracto. Los resultados se muestran como promedios \pm SD, $n = 3$.

Tabla 6. Efecto de la maduración y secado de flores de cannabis de la serie muestral #1, sobre el potencial antioxidante de los extractos de CHCl₃ obtenidos de estas muestras

	CA/ μg^a			Cl ₅₀ ^b ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
	SB	EC	Mag	SB	EC	Mag
1	2.5 \pm 0.2	3.2 \pm 0.2	1.2 \pm 0.2	2.6 (2.1-3.1)	4.6 (3.4-6.0)	2.1 (1.9-2.3)
2	2.4 \pm 0.1	3.1 \pm 0.1	1.4 \pm 0.1	3.1 (2.8-3.4)	3.8 (2.7-5.3)	2.2 (1.8-2.6)
3	3.0 \pm 0.1	3.2 \pm 0.2	1.4 \pm 0.3	2.5 (2.2-2.8)	2.6 (2.3-2.9)	2.2 (2.0-2.3)
4	3.5 \pm 0.3	3.4 \pm 0.1	1.9 \pm 0.3	1.7 (1.4-2.2)	2.3 (1.9-2.8)	2.2 (2.0-2.4)

^aLa capacidad antioxidante (CA) de los extractos se obtuvo a partir de la pendiente de los gráficos de relaciones de latencia frente al extracto en μg y se presenta como el promedio \pm SD, n = 3.

^bCl₅₀ para el efecto inhibitorio sobre la fase de propagación de la oxidación de LDL. Las estimaciones de los Cl₅₀ se obtuvieron realizando ajustes no lineales y se presentan con los intervalos de confianza del 95%, n = 3.

Mientras tanto, el extracto Mag, con el contenido más bajo de cannabinoides, mostró un efecto menor (CA/ μg = 1.2-1.9) (0 6). Se observó una correlación débil pero significativa entre la CA/ μg y la concentración de THC y THCA en los extractos, con valores de R² de 0.43 y 0.49, respectivamente (Figura 11C). La fase de propagación también se vio afectada por la presencia de los extractos, con una disminución significativa en la velocidad de formación de dienos conjugados (Figura 11D). Se obtuvieron valores de Cl₅₀ de 1.7-4.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabla 6) a la propagación de la lipoperoxidación. Las muestras de las colectas más tardías lograron una mayor CA/ μg y Cl₅₀ más bajas, sin embargo, este último parámetro mostró una correlación muy baja con la concentración de THCA y THC (resultado no mostrado).

Efecto de los extractos de la serie #2 sobre la oxidación de LDL mediada por Cu²⁺

Se ensayó la capacidad de los extractos con diferentes composiciones relativas de fitocannabinoides de inhibir la oxidación de LDL. Los tres extractos (E1, E2 y E3) actuaron como antioxidantes efectivos, prolongando la fase de latencia de la oxidación de LDL y también como atrapadores de radicales, reduciendo la velocidad de la fase de propagación (Figura 12). Los valores de AC/ μg fueron similares entre los tres quimiotipos con valores del rango de 3.7-4.9. Por otro lado, aunque las tres variedades fueron capaces de disminuir la pendiente de la fase de propagación, el extracto E1 con concentración más alta de THC, fue el que mostró una mayor

protección frente a la propagación de la lipoperoxidación ($CI_{50} = 2.2 \mu\text{g/mL}$, intervalo de confianza 95%: 1.9-2.4) (Tabla 7).

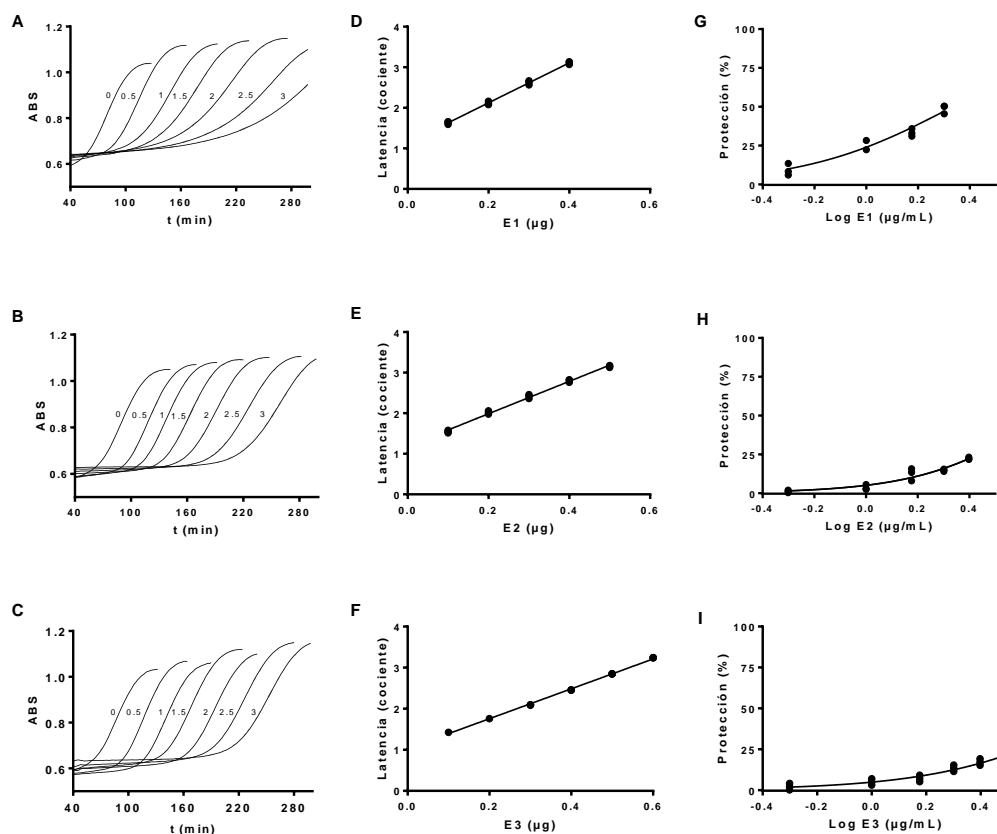


Figura 12. Inhibición de la oxidación de LDL mediada por Cu^{2+} por extractos de cannabis de la Serie muestral #2. A, B y C. La oxidación de LDL (0.1 mg/mL) fue iniciada por el agregado de CuSO_4 (50 μM) y monitoreada a 234 nm. Los ensayos se realizaron en ausencia o presencia de concentraciones crecientes del extracto E1, E2 y E3 (0.5-3 $\mu\text{g/mL}$), respectivamente. D, E y F. Ajuste lineal entre el cociente de latencias (latencia/latencia control) y los μg de extracto E1, E2 y E3 respectivamente. Los resultados se muestran como promedios \pm SD, $n = 3$. G, H e I. Gráfico dosis-respuesta de protección a la propagación de la lipoperoxidación, expresado en porcentaje respecto al control sin extracto.

Para comparar las propiedades antioxidantes de los extractos con la de fitocannabinoides aislados, se analizó la oxidación de LDL en presencia de THC, THCA, CBD y CBDA. El THC, CBDA y CBD se comportaron como antioxidantes efectivos con índices de $CA/\mu\text{g}$ de 21 ± 2 , 9.4 ± 0.8 y 4.8 ± 0.1 , respectivamente (Tabla 7). Por el contrario, THCA mostró un efecto bajo en la fase de latencia de la oxidación de LDL con un $AC/\mu\text{g}$ de 1.6 ± 0.5 . La fase de propagación del proceso de lipoperoxidación no cambió sustancialmente en presencia de THCA, CBD y CBDA. La pendiente de formación de dienos conjugados solo se vio disminuida por THC con un CI_{50} de 0.33 $\mu\text{g/mL}$ (intervalo de confianza 95%: 0.32-0.37).

Tabla 7. Efecto de extractos y fitocannabinoides sobre la oxidación de LDL

Muestra	CA/μg	CI₅₀ (μg/mL)
E1	4.9 \pm 0.1	2.2 (1.9-2.4)
E2	4.0 \pm 0.1	4.9 (4.2-6.9)
E3	3.7 \pm 0.1	8.0 (5.6-10.2)
THCA	1.6 \pm 0.5	NE ^a
THC	21 \pm 2	0.33 (0.32-0.37)
CBDA	9.4 \pm 0.8	NE
CBD	4.8 \pm 0.1	NE

^aNE, no efectivo en las condiciones ensayadas
Los resultados se muestran como promedios \pm SD, n = 3.

Inhibición de la formación de células espumosas

Oxidación y marcado fluorescente de LDL.

Para caracterizar la LDLox obtenida por exposición a CuSO_4 , el grado de oxidación lipídica de LDL se determinó por el contenido de MDA presente (Figura 13A) (6.1 ± 0.1 nmol/mg LDL). Además, se corroboró el grado de oxidación de la ApoB100 mediante la evaluación del cambio relativo en la movilidad electroforética de LDL tratada con Cu^{2+} , en comparación a la LDL sin tratar (Figura 13B) (REM = 1.1). Los valores obtenidos son comparables a los de la LDL mínimamente oxidada según reportes previos [205,218], sin embargo, la oxidación con Cu^{2+} genera productos de lipoperoxidación secundarios, por lo que en este trabajo se considerará como LDL oxidada (LDLox) a la mezcla heterogénea de partículas de LDL con modificaciones oxidativas *ex vivo* inducidas por Cu^{2+} , sin llegar a ser extensamente oxidada. También se confirmó la presencia de dienos conjugados, por un aumento de absorbancia a 234 nm (Figura 13C), indicando la lipoperoxidación de los ácidos grasos insaturados.

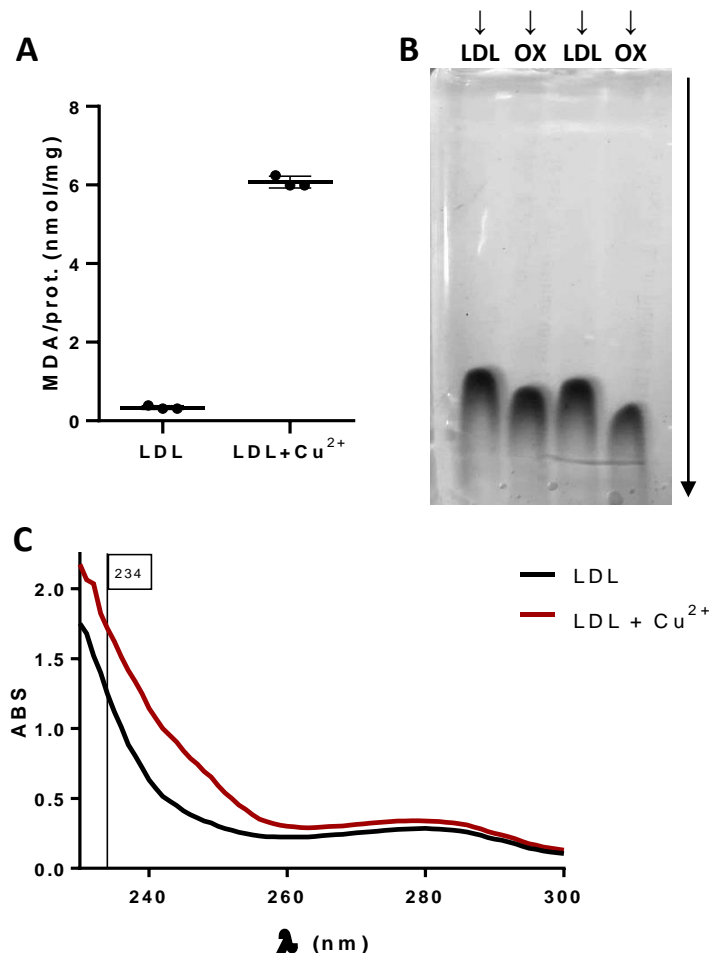


Figura 13. Caracterización del grado oxidación de la LDLox producida al incubar LDL purificada y Cu^{2+} . **A.** Determinación del contenido de MDA por TBARS, normalizado por la concentración de ApoB100 presente en LDL, $n = 3$. **B.** Electroforesis nativa en agarosa 0.5% de LDL o LDL oxidada (10 μg) a 90 V por 150 min. **C.** Espectro UV (230-300 nm) de absorción de LDL (negro) LDL oxidada con Cu^{2+} 20 μM (rojo).

Para el estudio de la internalización de LDL y LDLox por macrófagos, se procedió a etiquetar la lipoproteína con la sonda fluorescente Dil. En la Figura 14A se muestra la incorporación de la sonda evidenciada por la aparición de picos de absorbancia entre 520 y 560 nm, correspondientes a los máximos reportados para Dil [219]. En la Figura 14B se muestra el espectro de emisión de fluorescencia al excitar la LDLox-Dil (8.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con $\lambda_{\text{ex}} = 540 \text{ nm}$, donde se observa un máximo definido de emisión a 564 nm. Para observar el comportamiento de la respuesta fluorescente a distintas concentraciones de LDLox-Dil, se construyó una curva de calibración (1.5-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), como se muestra en la Figura 14C, realizada a partir de tres lotes de LDLox-Dil producidos. A partir del ajuste lineal ($R^2 = 0.94$) se obtuvo una pendiente de $122 \pm 4 \text{ URF}/(\mu\text{g}/\text{mL})$.

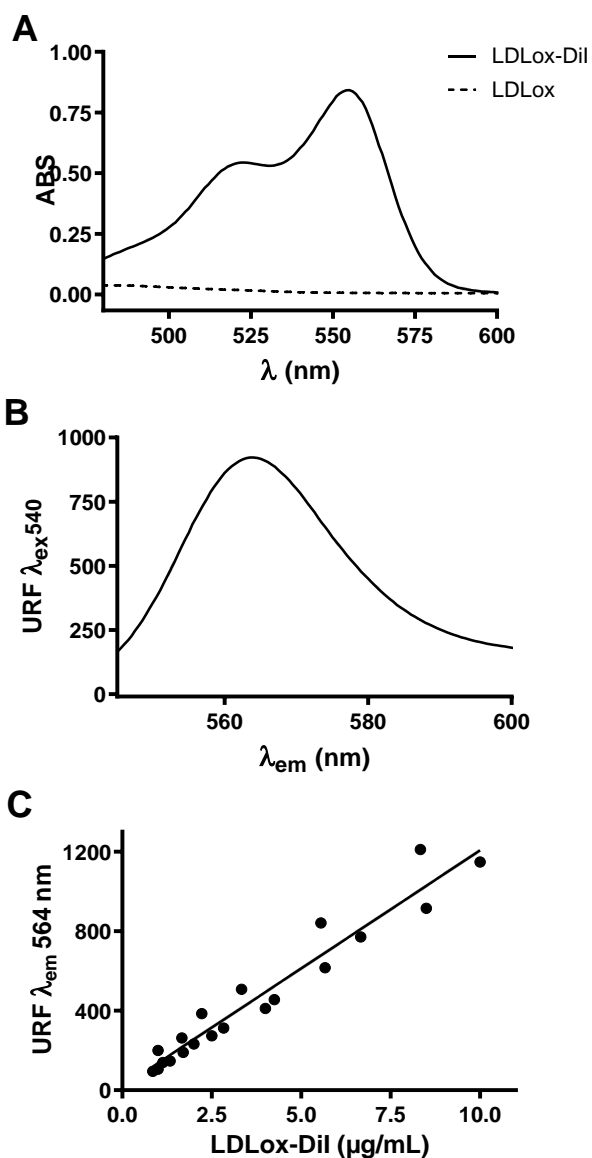


Figura 14. Análisis espectroscópico de LDLox-Dil. **A.** Espectros de absorbancia de LDLox-Dil a 0.2 mg/mL (línea continua) y LDLox sin la etiqueta fluorescente (línea discontinua). **B.** Espectro de emisión de fluorescencia de LDLox-Dil (8.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con longitud de onda de excitación a 540 nm. **C.** Ajuste lineal ($122 \pm 4 \text{ URF}/(\mu\text{g}/\text{mL})$, $R^2 = 0.94$) entre la intensidad de fluorescencia ($\lambda_{\text{ex}} = 540 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 564 \text{ nm}$) a concentraciones crecientes de LDLox-Dil (1-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Cada punto representa el promedio de tres preparaciones independientes.

Análisis por microscopía de fluorescencia de la formación de células espumosas

Dado que, junto a la modificación oxidativa de la LDL, la internalización de esta forma modificada por macrófagos subendoteliales constituye otro de los pasos claves en la formación de la placa de ateroma, nuestro siguiente objetivo fue analizar el efecto de los fitocannabinoides sobre la formación de células espumosas por macrófagos expuestos a LDLox. Los macrófagos murinos (J774.1) fueron capaces de internalizar el complejo LDLox-Dil, como se muestra mediante microscopía confocal (Figura 15). La acumulación de LDLox mostró un patrón vesicular en el área citosólica de las células (Figura 15A). Para evaluar la capacidad de los extractos de inhibir la formación de células espumosas se incubaron las células J774.1 en ausencia y presencia de concentraciones crecientes (5-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de los tres extractos (E1, E2 y E3) durante 1 h antes de exponerlas a LDLox-Dil (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 4 h (Figura 15B). La señal fluorescente correspondiente a

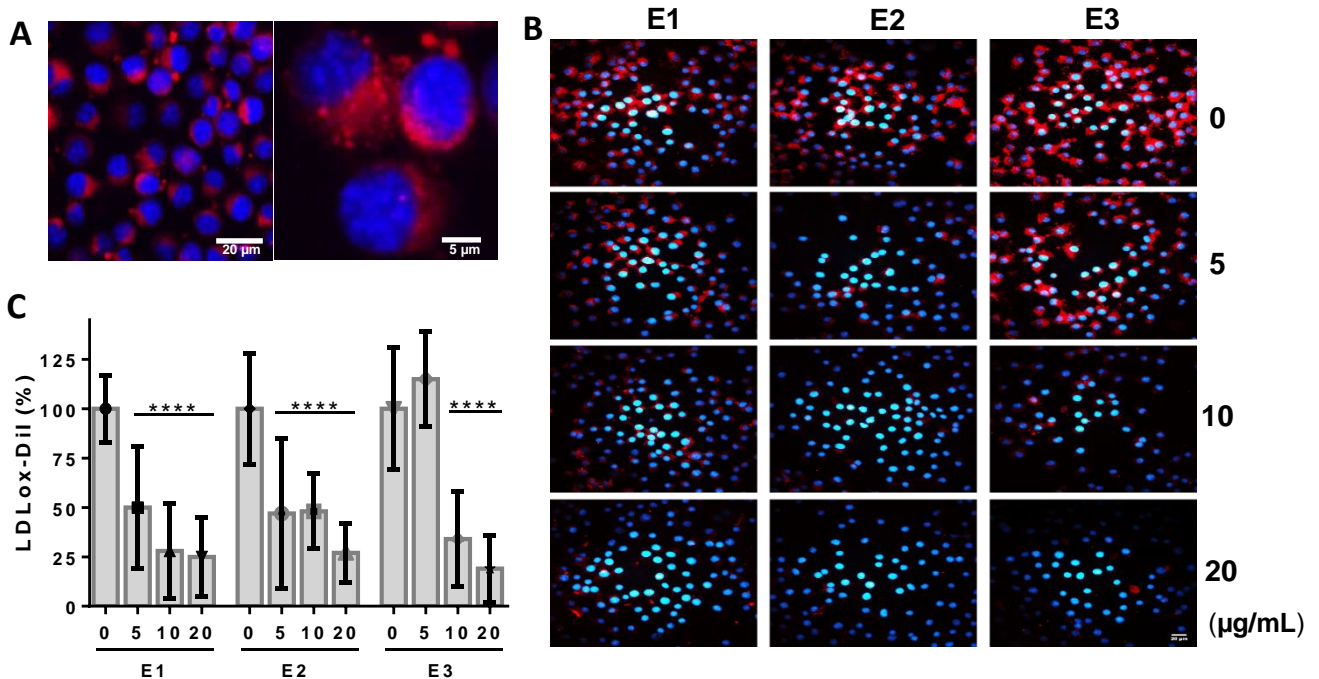


Figura 15. Análisis por microscopía de fluorescencia de la inhibición de la internalización de LDLox-Dil en macrófagos J774.1. **A.** Las células J774.1 se incubaron con LDLox-Dil (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 4 horas a 37°C. Los núcleos fueron teñidos con DAPI y las células fueron visualizadas mediante microscopía confocal. Se muestra un zoom de 3.5x a la derecha para visualizar la distribución de la lipoproteína fluorescente. **B.** Las células J774.1 fueron tratadas con vehículo (0.2% de DMSO) o con concentraciones crecientes (5-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de los tres extractos de cannabis (E1, E2 y E3) durante 1 hora antes de ser expuestas a LDLox-Dil (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 4 horas. **C.** Las imágenes de tres experimentos independientes fueron evaluadas utilizando ImageJ. Los resultados se expresaron como porcentaje de la señal fluorescente obtenida en comparación con la condición con LDLox sin extracto y se expresa el promedio \pm SD. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en comparación con la condición control sin extracto mediante ANOVA de dos vías y Dunnett *post hoc* (**** = $p < 0.0001$) con excepción de E3 a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

la acumulación intracelular del complejo oxLDL-Dil disminuyó a medida que aumentó la cantidad de extractos enriquecidos en cannabinoides (Figura 15C), observándose diferencias estadísticamente significativas en comparación con la condición control sin extracto, mediante ANOVA de dos vías.

Análisis por espectroscopia de fluorescencia de la endocitosis de LDLox-Dil

Para determinar cuantitativamente la actividad inhibitoria de los extractos de cannabis en la internalización de LDLox, se puso a punto una técnica espectrofluorimétrica para medir la acumulación de LDLox-Dil en la fracción celular. De esta manera, se evaluó la captación de LDL-Dil y LDLox-Dil por los macrófagos y el efecto de los extractos (Figura 16). La incubación de las células con LDLox-Dil por 24 h indujo un aumento marcado de la señal fluorescente, debido a la internalización de la lipoproteína marcada. Por su parte, la incubación de las células con la LDL asociada a la sonda fluorescente, pero no oxidada (LDL-Dil), no generó un aumento significativo de la fluorescencia.

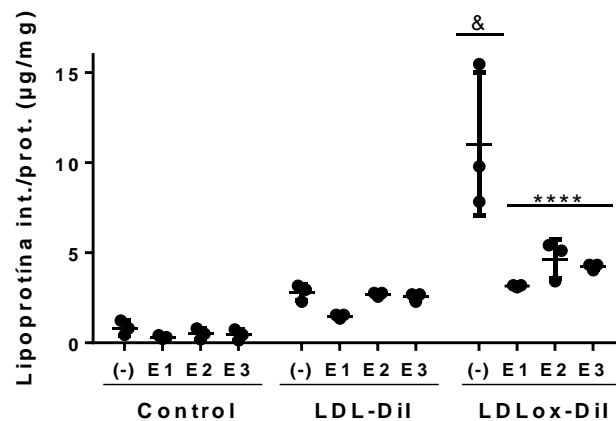


Figura 16. Determinación por espectrofluorimetría de la Internalización de LDL-Dil y LDLox-Dil en macrófagos J774.1. Las células se incubaron con LDL-Dil y LDLox-Dil (10 µg/mL), en ausencia (-) y en presencia de extractos E1, E2 y E3 (15 µg/mL) por 24 h a 37°C. Según se determinó por ANOVA de dos vías con Dunnett *post hoc*, el tratamiento con LDLox-Dil provocó una acumulación de la lipoproteína marcada fluorescentemente (λ_{ex} 540 nm, λ_{em} 564 nm), diferente a la condición control y a las células incubadas con LDL sin oxidar (& = $p < 0.0001$). Además, la coincubación con los extractos disminuyó significativamente la acumulación de LDLox-Dil (**** = $p < 0.0001$). Los resultados se muestran como promedios \pm SD, $n = 3$.

Para comparar la efectividad de los extractos, se determinaron las DE_{50} como se puede observar en la figura 17. El extracto con dominancia de THC(A) (E1) fue el más efectivo en la disminución de la internalización de LDLox, con un DE_{50} de 5 µg/mL. El extracto de la variedad intermedia (E2) y el extracto derivado del cáñamo (E3) mostraron una menor efectividad, con DE_{50} de 12 y 10 µg/mL, respectivamente (Figura 17B, C y Tabla 8). Los fitocannabinoides aislados THCA, THC, CBDA y CBD también inhibieron la endocitosis de LDLox en el modelo ensayado (Figura 17E-H), con valores estimados de ED_{50} en el rango de 3.5-7.9 µg/mL (Tabla 8). Por otro lado, la

anandamida (AEA), un agonista endógeno con preferencia por el receptor CB1, no logró reducir la captación de LDLox por las células J774.1 (figura 17D).

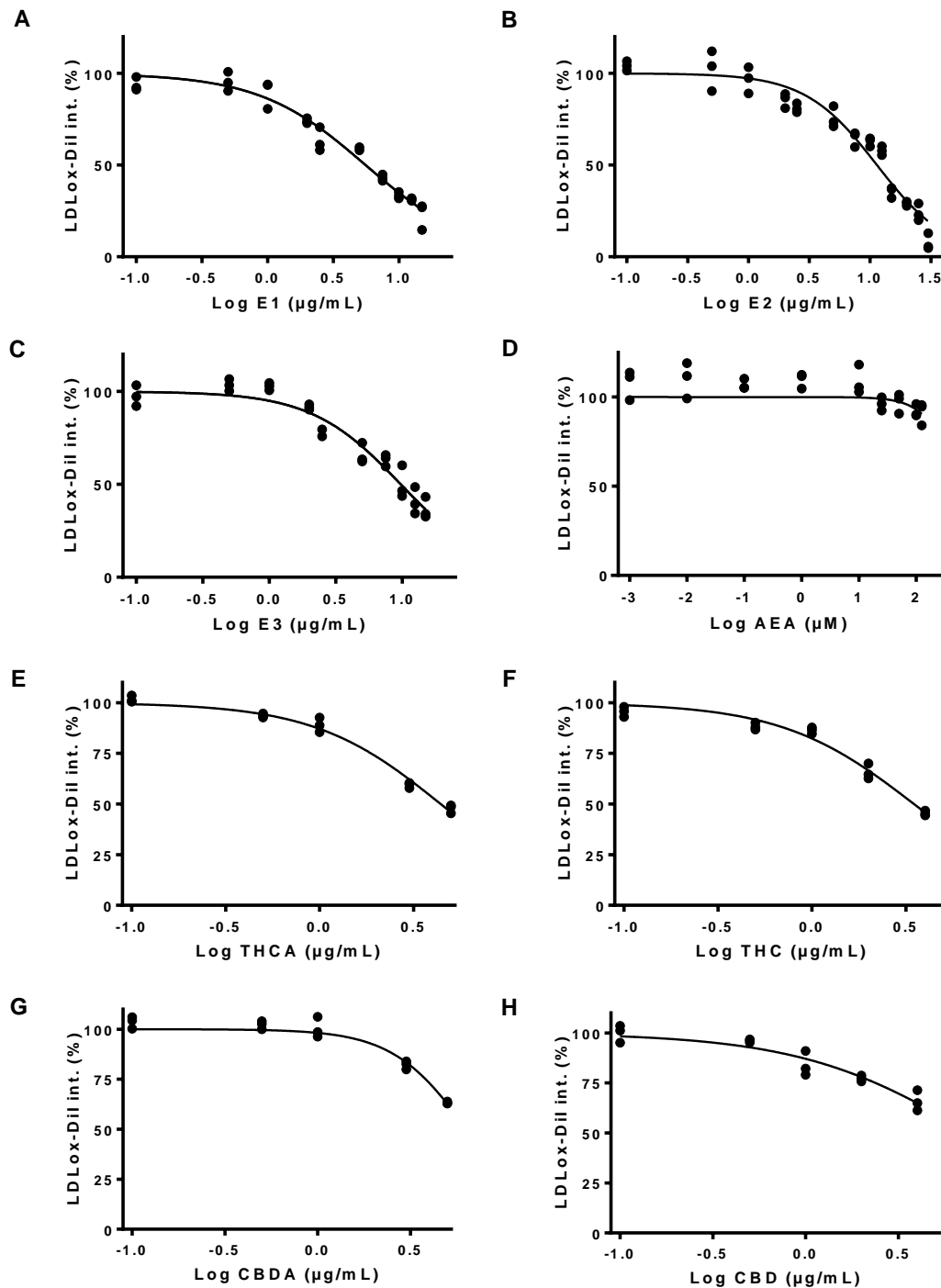


Figura 17. Efecto dosis-respuesta de fitocannaibinoides sobre la internalización de LDLox-Dil en células J774.1. Efecto dosis-respuesta del tratamiento con E1, E2 y E3 (0.1 - 15 $\mu\text{g/mL}$) A, B y C respectivamente. D. AEA (0.001-125 μM). E y G: THCA y CBDA (0.1-5 $\mu\text{g/mL}$). F y H: THC y CBD (0.1-4 $\mu\text{g/mL}$). La fluorescencia de LDLox-Dil internalizada en cada condición se evaluó a $\lambda_{\text{exc}} = 540 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 564 \text{ nm}$. Los resultados se expresan como porcentaje de una condición control tratada con vehículo (0.2% de DMSO). Se realizaron tres experimentos independientes y se ajustaron curvas de dosis-respuesta para determinar la DE_{50} . $n = 3$.

Adicionalmente, se confirmó el efecto inhibitorio de los extractos de cannabis sobre la internalización de LDLox en macrófago diferenciados por PMA de la línea celular de monocitos THP-1. Como se puede ver en la Figura 18, el efecto de los extractos en las células humanas parece ser análogo al observado en las células de ratón J774.1, obteniéndose una inhibición casi total a altas concentraciones.

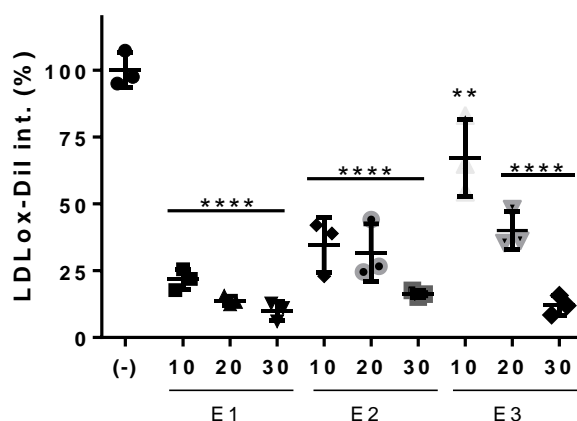


Figura 18. Efecto dosis-respuesta de fitocannabinoideos sobre la internalización de LDLox-Dil en células THP-1 diferenciadas con PMA. Efecto del tratamiento con E1, E2 y E3 (10-30 µg/mL) sobre la acumulación de oxLDL por células THP-1 expuestas a LDLmox-Dil (10 µg/mL) por 24 hs a 37°C. La fluorescencia de LDLox-Dil internalizada se evaluó a $\lambda_{ex} = 540 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 564 \text{ nm}$. Los resultados se expresan como porcentaje de una condición control, solo con el vehículo (0.2% de DMSO). Se muestran los promedios de tres experimentos independientes con sus desvíos estándar. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en comparación con la muestra control mediante ANOVA de una vía con Dunnett *post hoc* (** = $p < 0.01$, **** = $p < 0.0001$).

Ensayo de citotoxicidad

Para descartar el potencial efecto de los tratamientos con extractos, fitocannabinoideos, agonistas y antagonistas del SEC sobre el estado metabólico y la supervivencia celular, repercutiendo en los efectos observados de inhibición de la endocitosis de LDLox, se analizó la capacidad de las células J774.1 para reducir la sonda metabólica MTT, sustrato de la succinato deshidrogenasa mitocondrial [220]. Los ensayos de MTT realizados en las mismas condiciones que los experimentos de internalización de LDLox mostraron valores de DL_{50} para los extractos de cannabis varias veces más altos que los valores de ED_{50} para la endocitosis de LDLox (Figura 19). En particular, para el extracto E1 la DL_{50} fue más de seis veces mayor que la DE_{50} obtenida para la endocitosis de LDLox (Figura A), mientras que con el extracto E2, las células se mantuvieron metabólicamente activas incluso a la concentración más alta de extracto (Figura B). El extracto obtenido de cáñamo mostró mayor toxicidad y tuvo el índice terapéutico más bajo (Figura 19C). El endocannabinoide AEA mostró toxicidad a muy altas concentraciones, con un valor de LD_{50} de 105 µM (Figura 19D). Los fitocannabinoideos individuales tuvieron diferentes niveles de toxicidad dependiendo de la presencia del ácido carboxílico (Figura 19E-H). De hecho,

las formas ácidas THCA y CBDA, no causaron ningún efecto en la viabilidad celular en el rango explorado de concentraciones (1-10 μM). Por el contrario, los valores de DL_{50} determinados para los fitocannabinoides descarboxilados (THC y CBD) fueron cercanos a los valores de DE_{50} para la endocitosis de LDLox, con valores de IT muy próximos a 1 (Tabla 8).

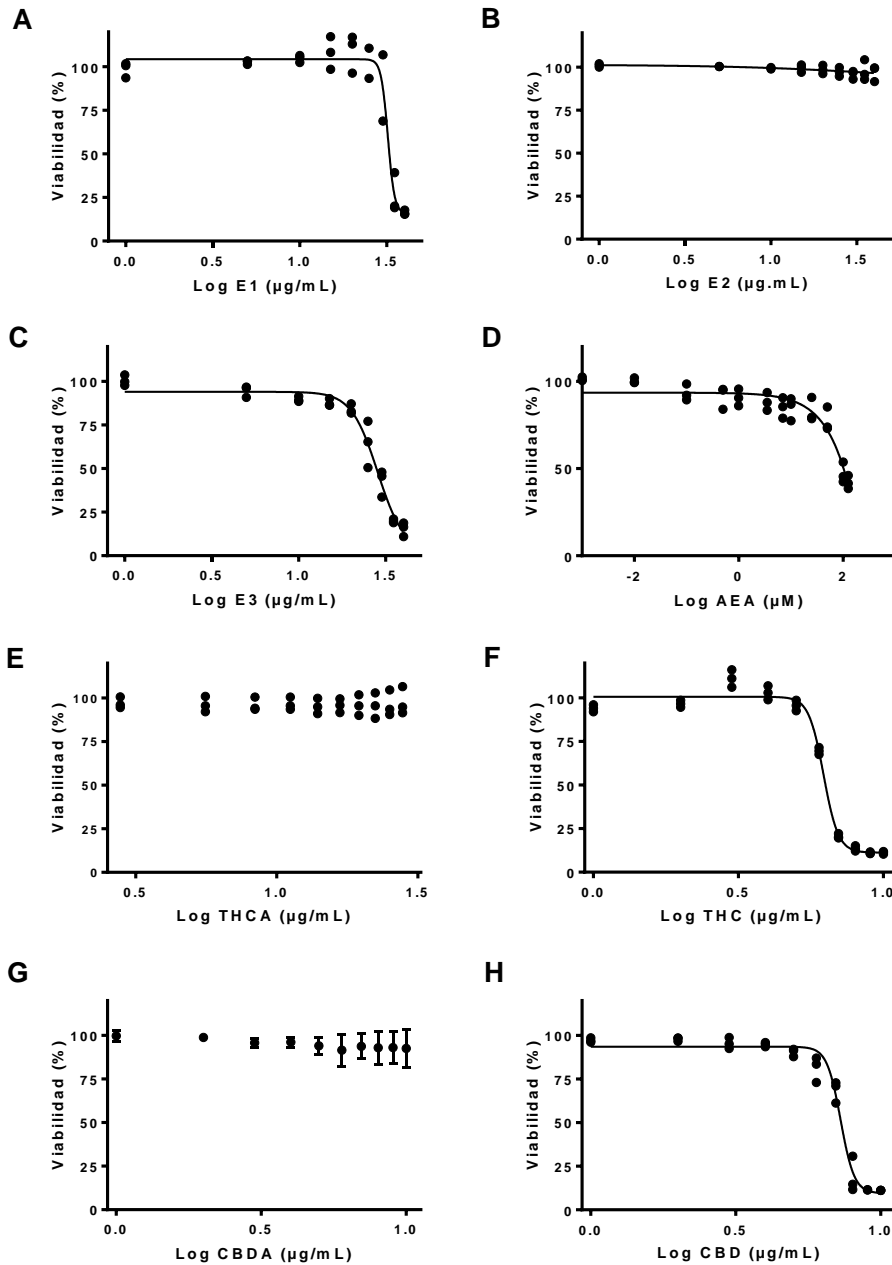


Figura 19. Efecto dosis-respuesta de extractos de cannabis, AEA y fitocannabinoides sobre la viabilidad de macrófagos J774.1. La actividad mitocondrial, representada como acumulación de formazán (absorbancia a 562 nm), se evaluó en las células J774.1 incubadas durante 24 horas con concentraciones crecientes de E1 (A), E2 (B), E3 (C) (1-40 $\mu\text{g/mL}$), AEA (D) (0.001-125 μM), THCA (E), THC (F), CBDA (G), CBD (H) (1-10 $\mu\text{g/mL}$). Los resultados de tres experimentos independientes se expresan como porcentaje de la condición control solo vehículo. Se realizaron ajustes dosis-respuesta para determinar DL_{50} .

Tabla 8. Efecto de los extractos y fitocannabinoides sobre internalización de LDLox

	DE ₅₀	DL ₅₀	IT ^a
	(µg/mL)		
E1	5 ± 1	33 ± 2	6.6
E2	12 ± 1	> 40	NT ^b
E3	10 ± 1	28 ± 3	2.8
THCA	4.3 ± 0.4	> 11	NT
THC	3.5 ± 0.3	6.3 ± 0.3	1.8
CBDA	6.5 ± 1.1	> 11	NT
CBD	7.9 ± 1.6	7.2 ± 0.3	0.9

^aÍndices terapéuticos (DL₅₀/DE₅₀).

^bNo tóxico a las dosis exploradas.

Los resultados se muestran como promedios ± SD, n = 3.

La viabilidad celular en células J774.1 también fue ensayada en presencia de los agonistas y antagonistas de receptores del SEC, al menos a la concentración más elevada que se utilizó en los demás ensayos. Como se puede observar en la Figura 20, ninguna de los tratamientos ensayados afectó la actividad celular de manera considerable, lo que excluye el compromiso de la viabilidad celular en las condiciones ensayadas.

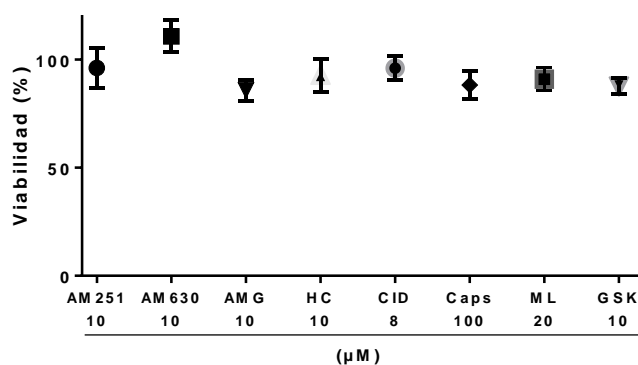


Figura 20. Efecto de agonistas y antagonistas del SEC sobre la viabilidad de macrófagos J774.1. Células J774.1 incubadas durante 24 horas con la concentración máxima utilizada de cada compuesto. Los resultados se muestran como promedios ± SD de tres experimentos independientes se expresan como porcentaje de la condición control solo vehículo para cada tratamiento.

Además, se corroboró el efecto de los extractos E1, E2 y E3 sobre la viabilidad en los macrófagos THP-1 diferenciados con PMA. Notablemente, los tres extractos presentaron toxicidad nula, incluso a la mayor concentración ensayada (40 µg/mL) (Figura 21), a diferencia de lo ocurrido con E1 y E3 en los macrófagos murinos J774.1.

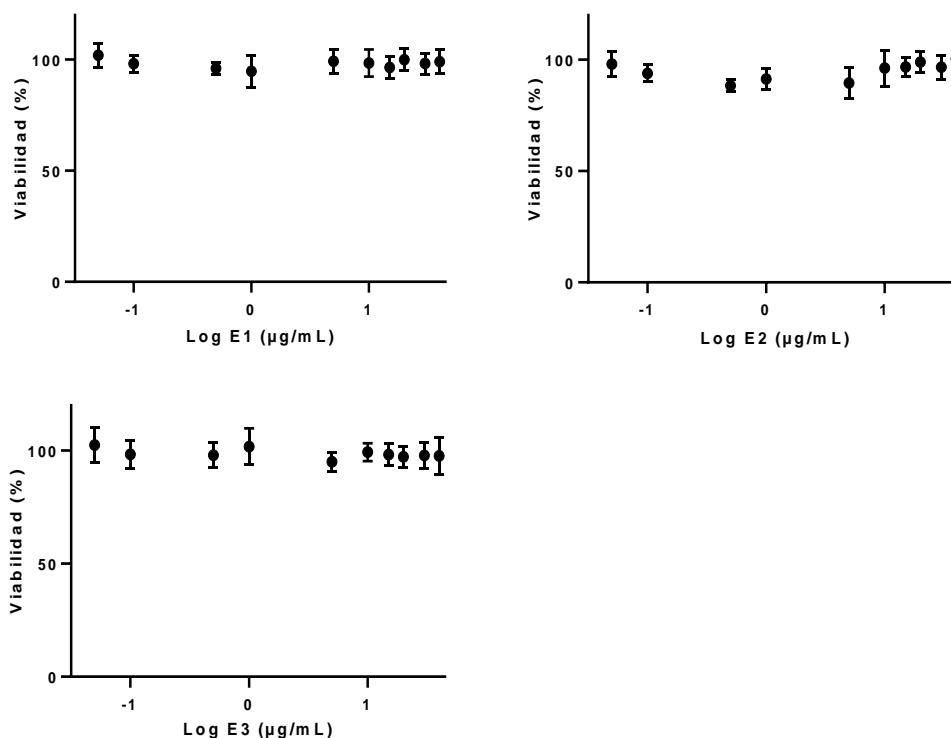


Figura 21. Efecto dosis-respuesta de extractos de cannabis sobre la viabilidad de macrófagos THP-1. Células THP-1, previamente diferenciadas con PMA, se incubaron durante 24 horas con concentraciones crecientes (0.05-30 µg/mL) de los extractos E1, E2 y E3. Los resultados se muestran como promedios ± SD de tres experimentos independientes se expresan como porcentaje de la condición control solo vehículo.

Participación de los receptores de CB1 y CB2 en la inhibición de la formación de células espumosas.

Con el fin de indagar en la participación de receptores canónicos del SEC en el efecto inhibitorio de los extractos sobre la internalización de LDLox, se repitió el mismo modelo experimental realizando incubaciones con LDLox-Dil, utilizando concentraciones de extractos (E1 a 2 µg/mL, E2 y E3, ambos a 5 µg/mL) de manera de generar una inhibición de la internalización de aproximadamente 30%, dado que a concentraciones mayores de los extractos no se vio ningún efecto de los antagonistas. Además, se adicionaron concentraciones de antagonistas de los receptores CB1 (AM251) y CB2 (AM630) varias veces por encima de los Kd respectivos. En la Figura 22 se muestra el efecto de los antagonistas sobre las células J774.1 expuestas por 24 hs a LDLox-Dil y tratadas con los extractos E1, E2 y E3. Solo el antagonista de los receptores CB1 (AM251) revirtió parcialmente el efecto del extracto E1, sin afectar el efecto de los otros extractos, mostrando solo una escasa o nula participación de los receptores canónicos de cannabinoides en el efecto observado. Basados en estos resultados pasamos a explorar otros receptores que son reconocidos como blancos potenciales de fitocannabinoides.

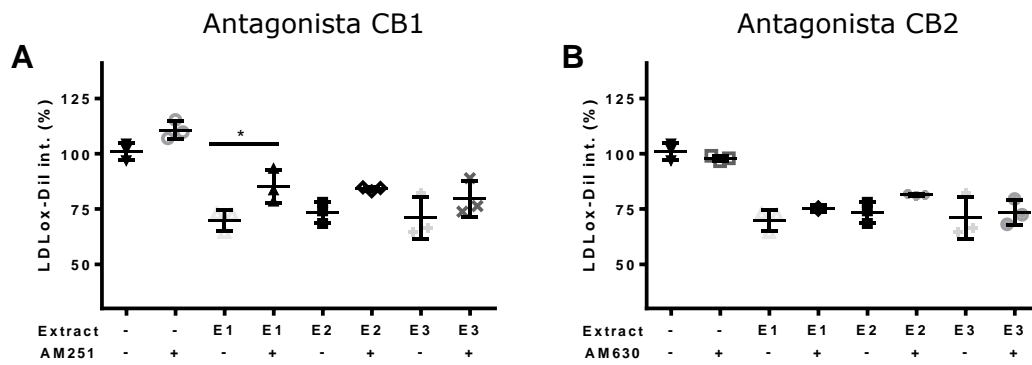


Figura 22. Efecto de antagonistas de los receptores CB1 y CB2 sobre la Internalización de LDLox en macrófagos J774.1. Las células se incubaron por 24 h con LDLox-Dil (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), además de extractos E1 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), E2 y E3 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y los antagonistas de los receptores CB1 (AM251) (**A**) y CB2 (AM630) (**B**) (3.5 μM). La fluorescencia de LDLox-Dil internalizada se evaluó a $\lambda_{\text{ex}} = 540 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 564 \text{ nm}$. Los resultados se expresan como porcentaje de una condición control con vehículo. Se muestran los promedios de tres experimentos independientes y sus desvíos estándar. Diferencias significativas se encontraron entre la condición con extracto E1 solo (-) y la condición con extracto más el antagonista AM251 (+) empleando ANOVA de dos vías con Dunett *post hoc* (*, $p < 0.05$).

Participación de receptores no clásicos del SEC en la formación de células espumosas

Los fitocannabinoides, además de actuar sobre los receptores canónicos, son también ligandos del GPR55 y de varios TRPs. El GPR55, es un receptor acoplado a proteína G que al ser activado induce el ingreso de calcio al citoplasma [221]. Por su parte, TRPV1 y TRPV4, son receptores tipo vainilloide, cuya activación induce el ingreso inespecífico de cationes a la célula [222]. Cuando se incubaron las células con los antagonistas de GPR55 (CID16020046) y TRPV4 (HC067047) no modificaron la cantidad de LDLox internalizada por sí solos, ni alteraron el efecto inhibitorio de los extractos (Figura 23). Por otro lado, el antagonista del receptor TRPV1 (AMG9810) disminuyó la internalización de LDLox en un 20%, en ausencia de extractos (Figura 23B). En presencia de extractos y el antagonista de TRPV1, el efecto final fue igual a la suma de los efectos de ambos tratamientos por separado. Si bien no podemos descartar una acción independiente de estos moduladores se podría estar produciendo una sumatoria de acciones antagónicas sobre los receptores TRPV1.

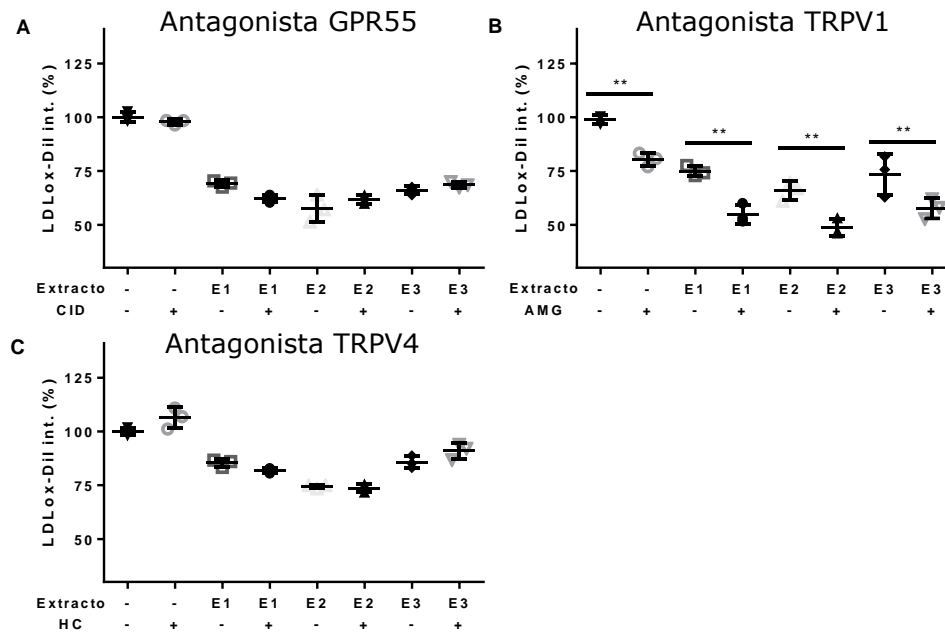


Figura 23. Efecto de antagonistas de GPR55, TRPV1 y TRPV4 sobre la Internalización de LDLox en macrófagos J774.1. Las células se incubaron por 24 h con LDLox-Dil (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), además de extractos E1 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), E2 y E3 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y CID16020046 (CID, 8 μM) (A), AMG9810 (AMG, 5 μM) (B) y HC067047 (HC, 10 μM) (C). La fluorescencia de LDLox-Dil internalizada se evaluó a $\lambda_{\text{exc}} = 540 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 564 \text{ nm}$. Los resultados se expresan como porcentaje de una condición control con vehículo. Se muestran los promedios de tres experimentos independientes y sus desvíos estándar. Diferencias significativas se encontraron entre la condición sin (-) y con AMG9810 (+) empleando ANOVA de dos vías (**, $p < 0.01$).

De manera análoga, se realizaron incubaciones con LDLox, extractos E1, E2 y E3 y agonistas específicos de los receptores GPR55 (ML184), TRPV1 (capsaicina) y TRPV4 (GSK1016790A). A las 24 h el efecto de los agonistas fue muy escaso (no mostrado), por lo que se repitió realizando incubaciones de 6 h (Figura 24). En este caso, los tres agonistas mostraron un claro efecto de aumento (15-30%) sobre la internalización de LDLox cuando se incubaron con las células en presencia de la lipoproteína oxidada y en ausencia de extractos. Cuando se adicionaron los extractos de cannabis junto con los agonistas de los receptores TRPV1 y GPR55, se observó un

nivel de internalización de LDLox-Dil idéntica a la condición sin antagonista. El agonista de TRPV4 indujo un aumento mayor al 30% de la internalización de LDLox, en ausencia de extractos. En presencia de los extractos de cannabis, este agonista revirtió solo parcialmente la inhibición de la internalización de LDLox. Estos resultados infieren la participación de los receptores no canónicos y en particular del TRPV1 en la formación de células espumosas y en el efecto inhibitorio de los cannabinoides.

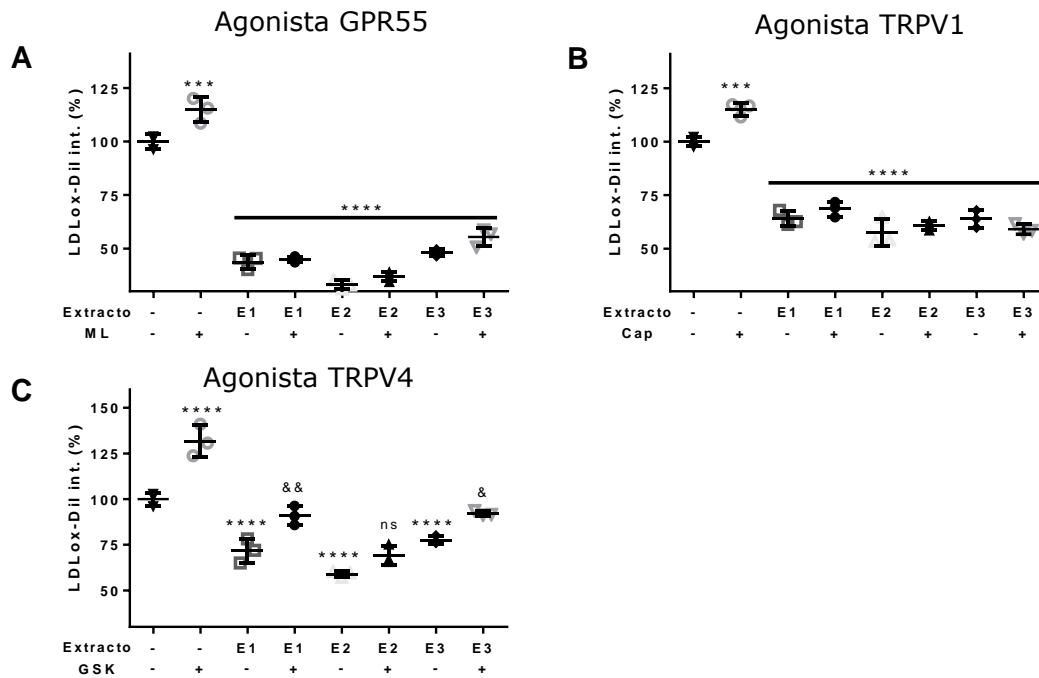


Figura 24. Efecto de agonistas de GPR55, TRPV1 y TRPV4 sobre la Internalización de LDLox en macrófagos J774.1. Las células se incubaron por 6 h con LDLox-Dil (10 µg/mL), además de extractos E1 (2 µg/mL), E2 y E3 (5 µg/mL) y agonistas de los receptores GPR55, TRPV1 y TRPV4: ML184 (ML, 10 µM) (A), Capsaicina (Cap, 50 µM) (B) y GSK1016790A (GSK, 10 µM) (C). Los resultados se expresan como porcentaje de la condición control, con vehículo (0.2% DMSO). Se muestran los promedios de tres experimentos independientes y sus desvíos estándar. Empleando ANOVA de dos vías se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes condiciones y el control sin extractos ni agonistas (***, $p < 0.001$, ****, $p < 0.0001$) y diferencias significativas entre la condición con extracto solo y extracto más el agonista de canales TRPV4 (GSK1016790A) (&, $p < 0.05$, &&, $p < 0.001$). ns, no significativo.

En base a la participación de los receptores vainilloides, que son canales catiónicos, decidimos explorar la dependencia de la internalización de LDLox en la presencia del Ca^{2+} citosólico. En la Figura 25 se puede ver cómo la presencia del quelante a nivel intracelular (BAPTA-2AM) que lleva a una disminución del Ca^{2+} intracelular repercute muy considerablemente sobre la cantidad de LDLox internalizada por las células J774.1 a las 6 h de incubación. Por su parte, al secuestrar el Ca^{2+} extracelular por el agregado de EGTA 4 mM, la internalización de LDLox se hace despreciable, mostrando la relevancia de este catión en el proceso de endocitosis de la lipoproteína modificada.

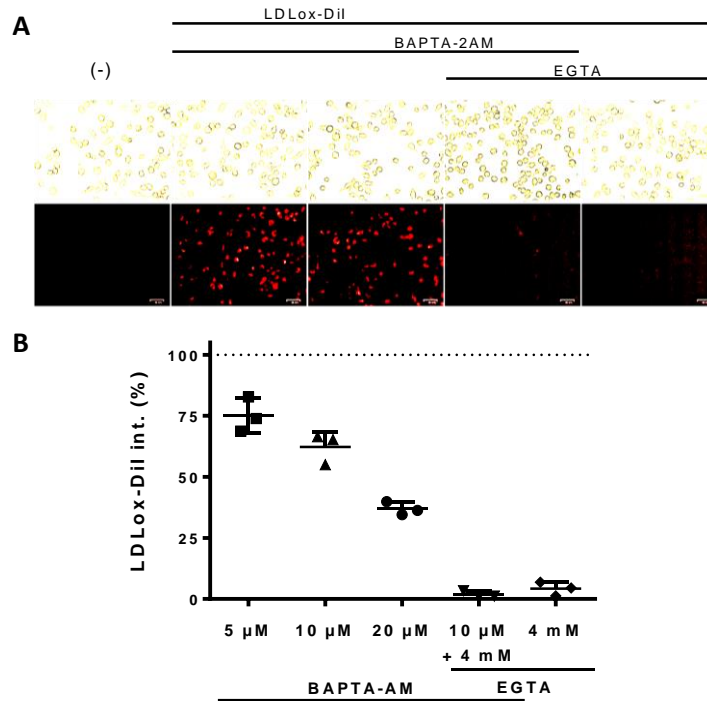


Figura 25. Efecto de quelantes intra/extracelulares de Ca^{2+} sobre la Internalización de LDLox en macrófagos J774.1. **A.** Se incubaron células J774 semiconfluentes durante 6 h en ausencia o presencia de oxLDL-Dil ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$) más BAPTA-AM ($5 \mu\text{M}$) y/o EGTA (4mM). Las células vivas se observaron mediante campo claro (imágenes superiores) y fluorescencia utilizando el canal rojo del ZOE *Fluorescent Cell Imager*. **B.** Células incubadas con LDLox-Dil y tratadas con BAPTA-AM ($5\text{-}20 \mu\text{M}$), EGTA (4mM) o una combinación de ambos quelantes. La fluorescencia de LDLox-Dil internalizada se evaluó a $\lambda_{\text{ex}}=540$ y $\lambda_{\text{em}}=564$ nm. Los resultados de tres experimentos independientes se normalizaron por la concentración de proteína y se expresan como porcentaje de una condición control sin quelantes.

Efecto de los extractos de cannabis sobre la acumulación de los receptores *scavenger*

Con el fin de dilucidar el mecanismo involucrado en la inhibición de la internalización de LDLox, se exploró el efecto de los extractos de cannabis sobre la acumulación de receptores *scavenger* que median la internalización de LDL con modificaciones oxidativas en células J774.1. Se determinó mediante *Western Blot* el contenido relativo de las proteínas SR-A1, CD36 y OLR1, tras exponer las células 24 h a los extractos E1, E2 y E3 (15 µg/mL) en presencia y ausencia de LDLox (10 µg/mL). Como se puede observar en la Figura 26A, la cantidad relativa del receptor SR-A1, que permaneció inalterada en presencia de LDLox, disminuyó moderadamente con E2 y E3. En el caso del receptor CD36, la síntesis basal en estas células resultó ser indetectable. La incubación de las células con LDLox por 24 h indujo a la aparición de 2 bandas que corresponden al receptor (65 KDa) y el receptor altamente modificado postraduccionalmente (100 KDa) [223] (Figura 26B), y la presencia de los extractos de cannabis disminuyó la señales obtenidas para CD36. Por otro lado, el receptor OLR1 aumentó su síntesis en los macrófagos tratados con LDLox ($p < 0.05$), y se observó que disminuye en presencia de los extractos de cannabis tanto en las células estimuladas como no estimuladas por la presencia de LDLox. (Figura 26C). Estos resultados apuntan a que la acumulación de los receptores *scavenger* es un importante punto de acción de los fitocannabinoides, siendo responsables, al menos en parte, de la inhibición de la formación de células espumosas encontrada.

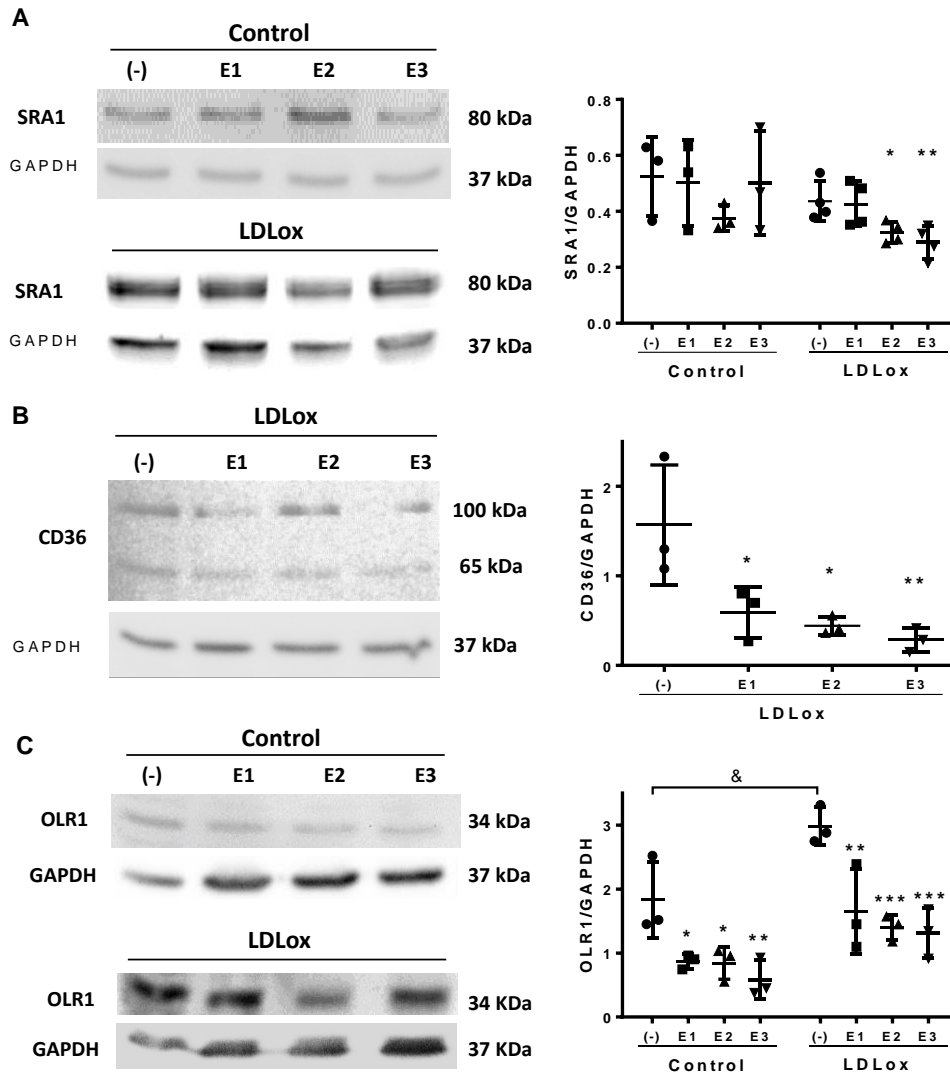


Figura 26. Efecto de extractos de cannabis sobre la acumulación de los receptores *scavenger*. Células J774.1 se incubaron por 24 hs con 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los extractos o vehículo (-) (0.2% DMSO), en ausencia y presencia de LDLox (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se muestran imágenes representativas de las señales correspondientes a las proteínas SR-A1 (A), CD36 (B), OLR1 (C) obtenidas por inmunodetección. Se realizó el análisis densitométrico de las señales obtenidas y se utilizó la señal de GAPDH para normalizar. Se muestran los promedios \pm SD de al menos tres experimentos independientes (& = $p < 0.05$, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$). Para CD36 se utilizó la señal a 100 KDa.

Efecto de los extractos de cannabis sobre la respuesta inmune celular

Efecto de los cannabinoides sobre la polarización M1 de macrófagos

Generación de citoquinas por macrófagos activados con LPS/INF γ

Dado que la formación de la placa de ateroma, como describimos, involucra la invasión del espacio subendotelial por células del sistema inmune y, dada la variabilidad encontrada respecto al efecto de los cannabinoides en la generación de citoquinas [224], decidimos evaluar el efecto de los extractos de cannabis sobre la acumulación de una de las principales citoquinas proinflamatorias, la IL-1 β en los macrófagos J774.1. En la Figura 27 se observa el efecto inductor de LPS e INF- γ sobre la síntesis de proIL-1 β (31 KDa) y además el efecto inhibitorio de los extractos de cannabis sobre dicha inducción.

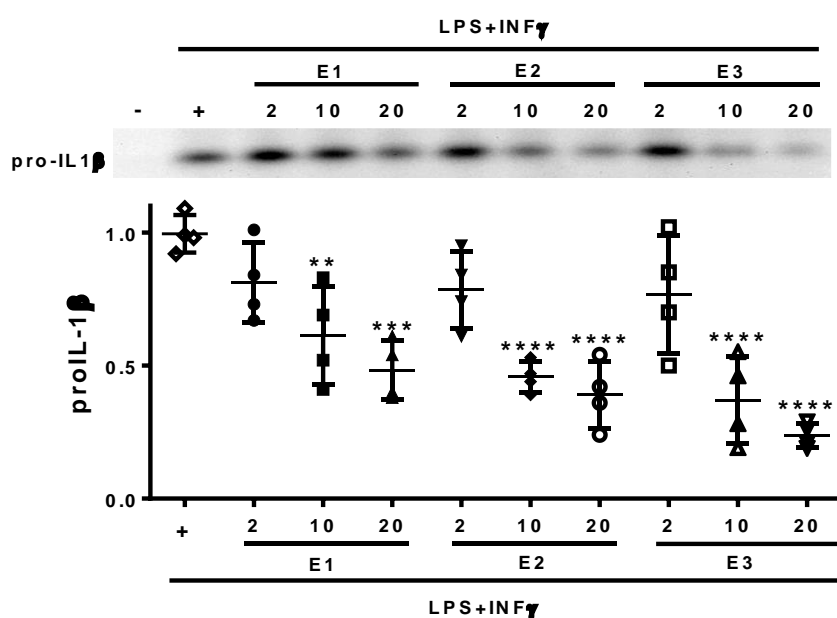


Figura 27. Efecto de extractos de cannabis sobre la acumulación de pro-IL-1 β . Células J774.1 se trataron por 4 h con LPS e INF- γ , además de extractos E1, E2 y E3 (2-20 μ g/mL). Se muestran imágenes representativas de las señales correspondientes a la proteína proIL-1 β obtenida por inmunodetección. Análisis densitométrico de las señales obtenidas, se expresan los valores normalizados al control sin extracto, correspondientes a los promedios \pm SD de cuatro experimentos independientes (* = p < 0.05, *** = p < 0.001, **** = p < 0.0001).

Por otro lado, no fue posible detectar la forma activa IL-1 β (17 KDa) en los sobrenadantes, ni siquiera agregando ATP 5 mM a los últimos 30 min de incubación de las células con LPS e INF- γ para estimular el ensamblaje del inflamasoma [225], suponiendo a que nuestras condiciones de estimulación solo llegaran al *priming*, sin inducir la activación del inflamasoma y el procesamiento y secreción de la citoquina. Asimismo, en nuestras condiciones experimentales no observamos la inducción de la citoquina (*priming*) por LDLox ni en 24 h de incubación a 100 μ g/mL.

Activación y síntesis de NOS2

Para continuar evaluando la acción antiinflamatoria de los extractos de cannabis, se procedió a cuantificar el NO_2^- acumulado en los medios de cultivo, luego de exponer las células J774.1 a un estímulo proinflamatorio (LPS e $\text{INF-}\gamma$). La activación de la vía $\text{NF-}\kappa\text{B}$ por LPS e $\text{INF-}\gamma$ lleva a la activación de la NOS2 [226] y consecuente producción de NO , que se verá reflejada en la acumulación de NO_2^- disuelto en el medio de cultivo. En la Figura 28 se muestra el efecto inhibitorio de los extractos E1, E2 y E3, donde se puede apreciar un efecto significativo según se determinó por ANOVA. El extracto E3, con dominancia de CBD(A), fue el que mostró un mayor efecto a altas concentraciones, contrariamente a lo observado en el efecto inhibitorio de la internalización de LDLox de los extractos.

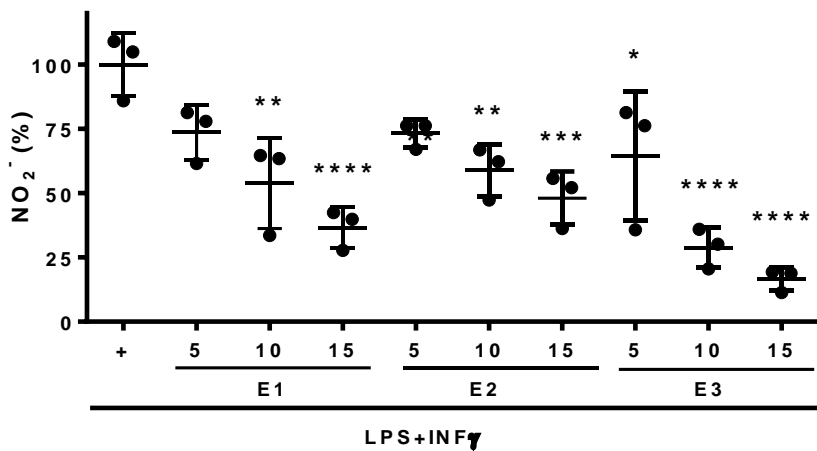


Figura 28. Efecto de extractos de cannabis sobre la activación de NOS2 en macrófagos J774.1. Se incubaron las células por 24 hs con LPS (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e $\text{INF-}\gamma$ (400 U/mL) en ausencia (control) o presencia de los extractos E1, E2 o E3 (5-15 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los resultados se expresan como el porcentaje de NO_2^- acumulado en el medio de cultivo respecto al control sin extracto, determinado por la técnica de Griess. Se realizaron tres experimentos independientes y se encontraron diferencias estadísticamente significativas en comparación con la muestra control mediante ANOVA de una vía (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

De manera complementaria, se analizó la acumulación relativa de la NOS2 por Western Blot, con el fin de elucidar si la disminución en la acumulación de NO_2^- se debe a una disminución en la síntesis de la enzima inducible. Como se puede observar en la figura 29, los extractos de cannabis disminuyen la cantidad relativa de la proteína NOS2 determinada por inmunodetección tanto a las 4, 6 o 24 h de incubación.

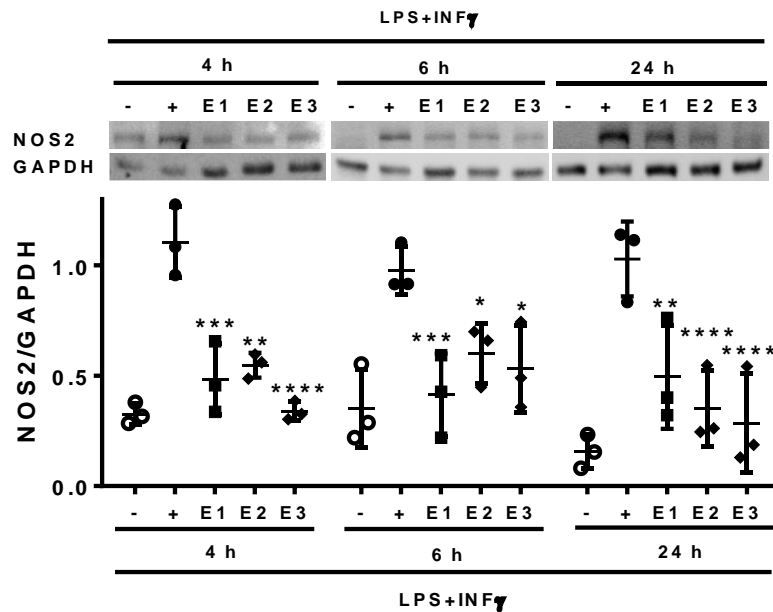


Figura 29. Efecto de extractos de cannabis sobre la acumulación de la enzima NOS2. Células J774.1 se incubaron por 4, 6 y 24 hs con 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los extractos E1, E2, E3 o vehículo (0.2% DMSO), en presencia de LPS (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e $\text{INF-}\gamma$ (400 U/mL). Se muestran imágenes representativas de las señales correspondientes a las proteínas NOS2 a 140 kDa y GAPDH a 37 kDa obtenidas por inmunodetección. Se realizó el análisis densitométrico de las señales obtenidas y se utilizó la señal de GAPDH para normalizar. Se muestran los promedios \pm SD de tres experimentos independientes (& = $p < 0.05$, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$).

Activación de la vía NF- κB

La síntesis de $\text{proIL-1}\beta$ y NOS2 está regulada por la traslocación nuclear del factor NF- κB , por lo que se procedió a explorar la vía de activación canónica que involucra la fosforilación del inhibidor $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ por $\text{I}\kappa\text{K}\gamma$. Además se exploró la fosforilación de la serina 356 de la subunidad p65 de NF- κB , que indica inespecíficamente la actividad de quinasas como la $\text{I}\kappa\text{K}\alpha/\beta/\epsilon$, la quinasa de la proteína ribosomal S6 A1 (RPD6KA1) o la quinasa de unión a TANK (TKB1) [227]. La fosforilación de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ fue evidente incluso en células no estimuladas, siendo más elevada en las células tratadas con LDLox. Los tres extractos fueron capaces de disminuir significativamente el cociente de fosforilación de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ en ausencia de LDLox, pero solo E3 fue capaz de disminuir dicha relación en presencia de LDLox (Figura 30A). Por otro lado, solo en las células tratadas con LDLox fue posible detectar a la proteína p65 fosforiliada (p-p65), observándose una disminución en la relación p-p65/p65 total al tratar con los extractos, aunque solo se observan diferencias estadísticamente significativas con E1 y E2 (Figura 30B). En ambos casos, se observa mayor intensidad en las bandas correspondientes a las proteínas totales.

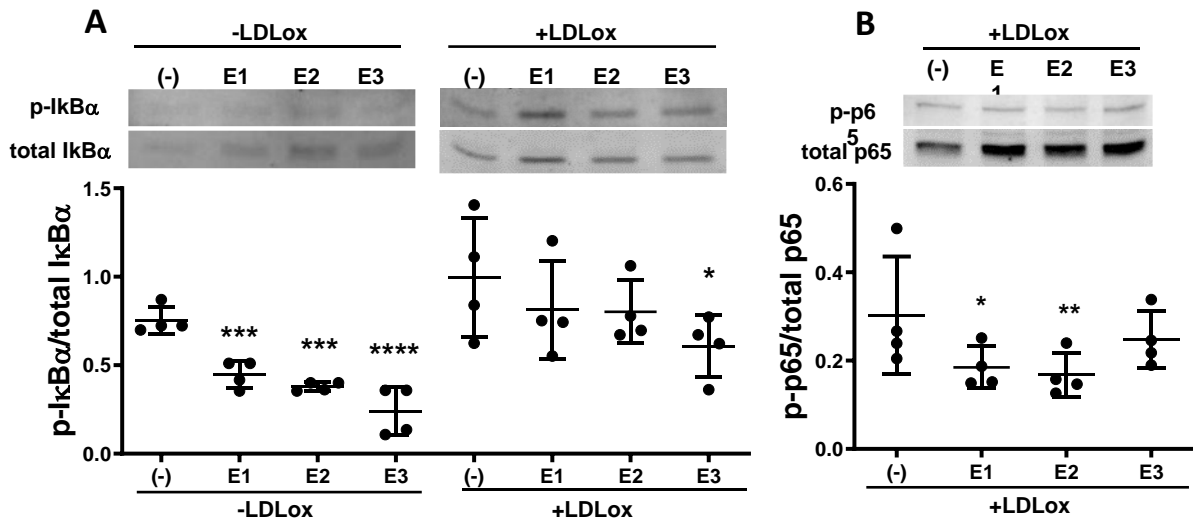


Figura 30. Efecto de extractos de cannabis sobre la activación de la vía Nf-κB. **A.** Células J774.1 se incubaron por 4 hs con 15 μg/mL de los extractos o vehículo (-) (0.2% DMSO), en ausencia y presencia de LDLox (10 μg/mL). Se muestran imágenes representativas de las señales correspondientes a la proteína IκBα total a 38 kDa y la fracción fosforilada (p-IκBα) obtenidas por inmunodetección. **B.** Células J774.1 se incubaron por 4 hs con 15 μg/mL de los extractos o vehículo (-) (0.2% DMSO) en presencia de LDLox (10 μg/mL). Se muestran imágenes representativas de las señales correspondientes a la proteína p65 total a 65 kDa y la fracción fosforilada (p-p65) obtenidas por inmunodetección. Se realizó el análisis densitométrico de las señales obtenidas y se obtuvieron los cocientes p-IκBα/IκBα total y p-p65/p65 total correspondientes. Se muestran los promedios ± SD de cuatro experimentos independientes (* = p < 0.05, ** = p < 0.01, *** = p < 0.010, **** = p < 0.0001).

Efecto de los cannabinoides sobre la polarización M2 de macrófagos

La activación de la batería de defensas antioxidantes reguladas por el ARE tiene un efecto favorable en la evolución de la lesión aterosclerótica, evitando el daño causado por la generación de moléculas oxidantes. De esta manera, nos propusimos determinar si los extractos de cannabis logran activar el ARE a través de la vía Nrf2, midiendo la producción relativa de HO-1, como efector directo del ARE, además de la acumulación relativa de la proteína Nrf2. Como se puede ver en la figura 31A, los tres extractos con quimiotipos distintos logran aumentar la acumulación de HO-1 respecto a la producción basal, pero lo hacen de distintas formas según se registró a 4, 6 y 24 hs de incubación. Por un lado, el extracto E1 tiene un efecto marcado a las 24 hs. Por el contrario, el extracto E3 produce un rápido efecto que se observa a las 4 y 6 h, atenuándose a las 24 h. En el caso del extracto intermedio E2, el efecto parece ser bajo y sostenido durante el tiempo de incubación. Por su parte la cantidad relativa de Nrf2 (figura 31C) parece aumentar a las 4 h en presencia de E3, aunque no significativamente según ANOVA de 2 vías, lo que sería coherente con la rápida inducción de HO-1 observada al tratar las células con E3. En el caso de los macrófagos tratados con LDLox, los extractos de cannabis generaron un patrón de inducción de la HO-1 similar al observado cuando LDLox no estaba presente, aunque

el tratamiento con E2 no fue estadísticamente significativo según ANOVA de dos vías (figura 31B).

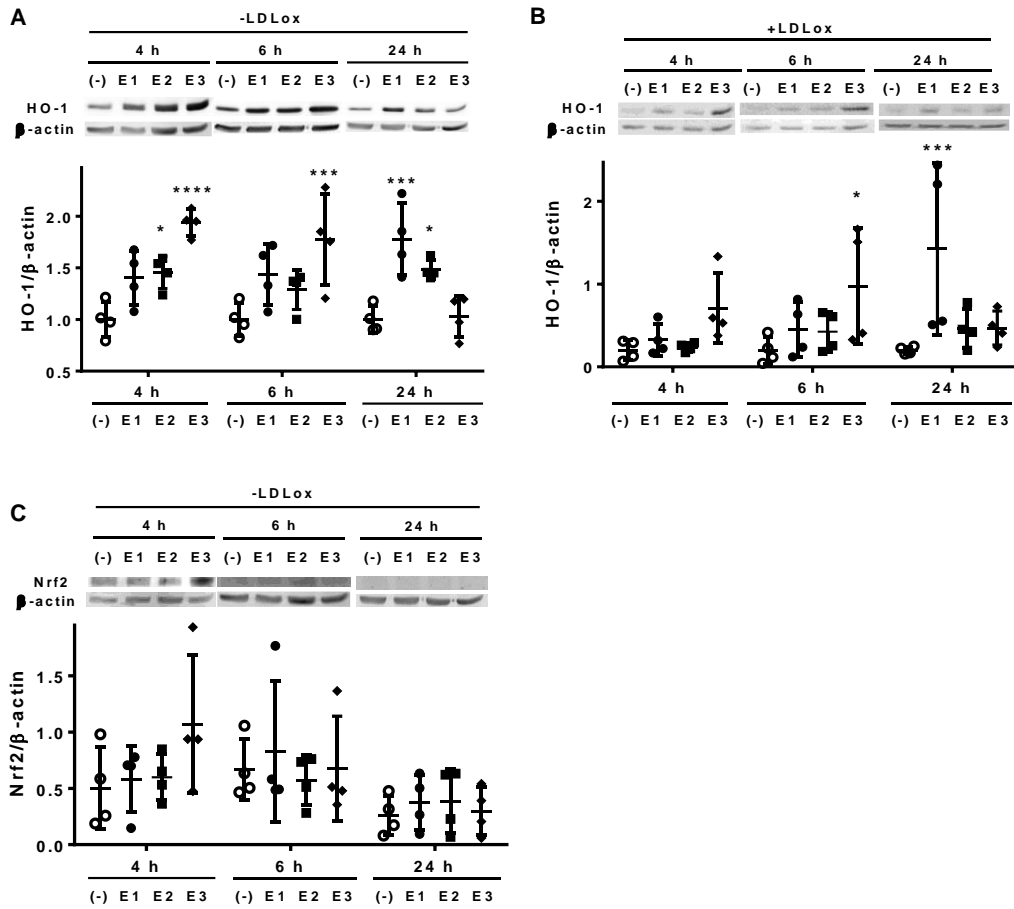


Figura 31. Efecto de extractos de cannabis sobre la activación del ARE. Células J774.1 se incubaron por 4, 6 y 24 hs con 15 µg/mL de los extractos E1, E2, E3 o vehículo (0.2% DMSO), en ausencia (A y C) o presencia (B) de LDLox (10µg/mL). Se muestran imágenes representativas de las señales correspondientes a las proteínas HO-1 a 32 KDa, Nrf2 a 100 KDa y β-actina a 42 KDa obtenidas por inmunodetección. Se realizó el análisis densitométrico de las señales obtenidas y se utilizó la señal de β-actina para normalizar. Se muestran los promedios ± SD de cuatro experimentos independientes (& = p < 0.05, * = p < 0.05, ** = p < 0.01, *** = p < 0.001, **** = p < 0.0001).

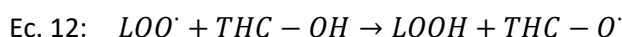
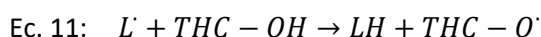
El conjunto de estos resultados, que involucran una disminución de la síntesis de proIL-1β y NOS2, aparentemente a través de una inhibición de la vía NF-κB, junto al aumento en la acumulación de HO1, indican que los extractos ricos en cannabinoides podrían estar induciendo un comportamiento tipo M2 o proresolutivo en los macrófagos J774.1.

6. Discusión

Efecto antioxidante *in vitro* de extractos de *Cannabis sativa*

La modificación oxidativa de la LDL, mediada directamente por oxidantes derivados del oxígeno y nitrógeno, enzimas (e.g. lipooxigenasa, mieloperoxidasa) o iones metálicos, es uno de los primeros pasos en la formación de la placa ateromatosa [228]. En este trabajo, se evaluó la capacidad de extractos de *Cannabis sativa* de inhibir la oxidación de LDL mediada por Cu^{2+} , variando el tiempo de cosecha y la composición relativa de cannabinoides. Todos los extractos ensayados fueron capaces de retardar el inicio del proceso de lipoperoxidación ($\text{AC}/\mu\text{g} > 1$), observándose una tendencia al aumento con la maduración de las partes florales. El grado de maduración de las partes florales, la cantidad y el tipo de cannabinoide tuvieron impacto en las propiedades antioxidantes de sus extractos derivados. Solo los extractos con presencia de THC fueron altamente efectivos en disminuir la propagación de reacciones de radicales en los lípidos de la LDL. Esto es concordante con los resultados obtenidos para los fitocannabinoides aislados, donde el THC se destaca por su alta $\text{CA}/\mu\text{g}$ y sobre todo una baja Cl_{50} , reflejando un enlenteciendo de la fase de propagación de la lipoperoxidación, muy por debajo los demás cannabinoides ensayados (Tabla 7).

La actividad antioxidante de los fitocannabinoides presentes en los extractos y del THC puro se relaciona con la capacidad del hidroxilo fenólico de reaccionar con oxidantes. Se reportó que el THC es capaz de reaccionar con especies radicalares, como las generadas durante la oxidación de LDL (L^{\bullet} y LOO^{\bullet}), convirtiéndose el cannabinoide en un radical estable y menos reactivo [229,230]. Empleando la metodología de teoría del funcional de la densidad (DFT) [231] se reportó que el THC tendría una capacidad antioxidante mayor que el CBD [232]. En el THC, la densidad de espín calculada mostró una contribución alta del hidroxilo fenólico como dador de hidrógeno (reductor) (Ec. 11 y 12):



Explicándose la capacidad antioxidante por la estabilidad del producto ($\text{THC}-\text{O}^{\bullet}$) debido a la resonancia del electrón desapareado en los restos éter y alquilo, así como en el anillo benceno [232].

Extractos de *Cannabis sativa* y fitocannabinoides inhiben la endocitosis de LDLox

El siguiente paso en el desarrollo de la placa aterosclerótica es el reconocimiento y endocitosis de LDL modificada a cargo de receptores *scavenger*, ubicados en la superficie de macrófagos subendoteliales [233]. Los extractos de diferentes quimiotipos de *Cannabis sativa* fueron capaces de inhibir la internalización de LDLox por células J774.1 (Figura 17A-C) y THP-1 (Figura 18). Los fitocannabinoides aislados también lograron inhibir la internalización de LDLox por los macrófagos (Figura 17E-H). Los fitocannabinoides que tienen el grupo carboxílico (THCA y CBDA) no mostraron toxicidad a las concentraciones ensayadas, mientras que el THC y CBD (neutros)

presentaron índices terapéuticos muy cercanos a 1, indicando un compromiso del estado vital de las células a las DE₅₀ determinadas (Tabla 8).

Con el fin de identificar a los receptores del SEC sobre los que actúan los fitocannabinoides, empleamos antagonistas y agonistas específicos de varios de ellos. Los receptores clásicos, CB1 y CB2, no están involucrados en la señalización ya que los antagonistas específicos de estos receptores no tuvieron efecto (Figura 22). Tampoco fueron efectivos los antagonistas de los receptores GPR55 y TRPV4. Por su parte, el antagonista del TRPV1 disminuyó la internalización de LDLox en ausencia de los extractos, señalando el involucramiento de estos receptores en la formación de las células espumosas. La exposición simultánea de las células a los extractos de cannabis y al antagonista de TRPV1 produjo un efecto inhibitorio sobre la internalización de LDLox casi idéntico a la suma de los efectos observados por separado (Figura 23). En este sentido, ha sido reportado que en células HEK-293 que sobreexpresan de forma estable TRPV1 recombinante humana, algunos fitocannabinoides son capaces de estimular los receptores TRPV1 induciendo un aumento de Ca²⁺ citosólico, aunque la mayoría de los compuestos fueron poco (CBD y CBDA) o nada efectivos (THC y THCA). Adicionalmente, varios compuestos, incluidos CBD, CBDA y THCA, desensibilizaron las células del efecto estimulador de capsaicina sobre TRPV1 y consecuentemente sobre el ingreso de Ca²⁺ [234]. Esta disminución en el ingreso de Ca²⁺ podría explicar la inhibición de la internalización de la LDLox provocada por los extractos, al desensibilizar a las células del efecto estimulador de la LDLox.

En el caso de los agonistas selectivos de los receptores GPR55, TRPV1 y TRPV4, los tres indujeron un rápido aumento de la acumulación de LDLox a 6 h de incubación y en ausencia de extractos (Figura 24), posiblemente involucrando un aumento en el ingreso de Ca²⁺ necesario para impulsar el proceso endocítico [235]. El efecto de los agonistas de GPR55 y TRPV1 desapareció en presencia de los extractos de cannabis, indicando que los fitocannabinoides podrían estar compitiendo por la asociación de estas moléculas a sus respectivos receptores, o interfiriendo en procesos de señalización posteriores. Distinto es el caso del agonista de TRPV4, donde la presencia de los extractos compitió parcialmente con el efecto del agonista, indicando una posible interacción, aunque de menor magnitud entre el receptor TRPV4 y los fitocannabinoides presentes en los extractos. La relevancia de los receptores TRPV4 en la formación de células espumosas por macrófagos expuestos a LDLox, ha cobrado visibilidad al reportarse una disminución en la formación de células espumosas al emplear inhibidores específicos o ratones *knockout* para este receptor [236]. Por su parte, los cannabinoides derivados de plantas, incluidos CBD, CBDA y THCA, son capaces de desencadenar el aumento de Ca²⁺ intracelular, aunque este incremento fue bajo o muy bajo comparado por el inducido por el agonista típico de TRPV4, el 4- α -forbol-12,13-didecanoato (4 α -PDD) [237]. Sin embargo, los fitocannabinoides se mostraron efectivos en desensibilizar este canal tras la activación por 4 α -PDD [237]. En este trabajo, la activación de los canales que median procesos de señalización que involucran al Ca²⁺ mostró un efecto significativo y opuesto al de los extractos de cannabis, aumentando la internalización de LDLox. Estos resultados apuntan al involucramiento del Ca²⁺ y de receptores no canónicos, incluidos los receptores vainilloides (TRPV1 y TRPV4) y GPR55, en la acción de los fitocannabinoides sobre la formación de células espumosas [234,236,237].

Existe una clara dependencia de la internalización de LDLox y la movilización de Ca²⁺ [238–241] (Figura 25). La asociación de LDL oxidada a los receptores scavenger estimula el aumento de Ca²⁺

intracelular [241], lo que conduce a la reorganización localizada y dinámica de F-actina, necesaria para la formación del fagosoma y su posterior maduración [242,243]. Además, la inducción de los receptores scavenger, responsables de la internalización de LDL modificada, también depende de procesos de señalización que involucran al Ca^{2+} [244]. El tratamiento con los extractos E1, E2 y E3 provocó una disminución en la cantidad relativa de receptores OLR1 y CD36 y SR-A1 en células J774.1 estimuladas con LDLox (Figura 26). La síntesis de estos receptores es inducida por ligandos de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) como la LDL modificada [245], a través de vías de señalización que involucran a NF- κ B, PKC y cationes, incluidos K^+ y Ca^{2+} [244,246,247], apoyando la idea del efecto antagónico de los fitocannabinoides sobre los mecanismos de señalización mediados por Ca^{2+} .

Efecto anti-inflamatorio de extractos de *Cannabis sativa* en macrófagos J774.1.

La infiltración del espacio subendotelial por leucocitos emigrados de la sangre es uno de los eventos característicos del proceso inflamatorio y forma parte del desarrollo de la placa de ateroma [248,249]. Disminuir la respuesta inflamatoria han sido uno de los objetivos fundamentales de los desarrollos terapéuticos recientes [250,251]. En este sentido, se investigó el potencial de fitocannabinoides sobre este componente impulsor de la aterosclerosis. Los extractos de los tres quimiotipos mostraron ser efectivos en disminuir la acumulación del precursor proinflamatorio proIL-1 β (Figura 27) y de la enzima inducible NOS2 (Figura 29) en células J774.1 expuestas a LPS e interferón γ (INF- γ). Estas vías efectoras de la respuesta inmune innata están bajo la regulación del factor de transcripción NF- κ B. En la figura 30 se puede ver como los extractos interfieren en la activación de la vía NF- κ B inducida por LDLox, destacándose el efecto de E3 (CBD/A dominante) a nivel de la vía clásica, que involucra la fosforilación del inhibidor de NF- κ B (I κ B α) por su respectiva quinasa (I κ K γ). Por su lado, los extractos E1 y E2 generaron una leve, aunque estadísticamente significativa, disminución de la fracción fosforilada NF- κ B (p-p65). La disminución en la activación de la vía NF- κ B por cannabinoides ya ha sido reportada, aunque el mecanismo por el cual se ejerce la inhibición no es del todo claro. En este sentido se han reportado efectos sobre la vía NF- κ B dependientes de los receptores CB1 [252] y CB2 [253], así como independientes de los receptores canónicos [254], mostrando diferentes respuestas en distintos tipos celulares. Estos efectos antiinflamatorios de los extractos de cannabis podrían estar relacionados con la modulación de los receptores vainilloides y por tanto de las señales de Ca^{2+} . En este sentido, la activación del receptor TRPV1 ha sido asociada con efectos proinflamatorios en estudios donde los receptores TRPV1 estaban alterados genéticamente en ratones *knockout* para TRPV1 [255], mediante interferencia de ARN [256] o después del tratamiento con antagonistas selectivos [257]. Se conoce que los fitocannabinoides y en particular el CBD, disminuyen el dolor y la inflamación actuando principalmente sobre estos receptores [234,258].

Adicionalmente, los extractos de cannabis indujeron la acumulación de la HO-1 (Figura 31), uno de los efectores de la vía Nrf2. Se conoce de la interacción entre las vías de señalización de Nrf2 y NF- κ B, ambos están regulados por factores sensibles redox y el bloqueo de la vía Nrf2 se asocia con un aumento del estrés oxidativo y nitrosativo, lo que conduce a una amplificación de la producción de citoquinas regulada por NF- κ B [259]. Existen varios estudios sobre fitoquímicos con cualidades eletrofilicas activadores de Nrf2, como el sulforafano (SFP) que abunda en

vegetales crucíferos [260]. Asimismo, existen reportes del CBD como activador de la vía Nrf2, pero el CBD también interactúa con el factor de transcripción de la familia *Cap n' collar* con dominio de unión a proteína *Broad-Complex* homólogo 1 (Bach-1), por lo que también podría inducir la síntesis de HO-1 por esa vía [261]. La estimulación previa de Nrf2 en macrófagos peritoneales primarios amortigua la producción de COX-2, TNF α , NOS2 e IL-1 β en respuesta al LPS. Este efecto se ha atribuido a la activación de Nrf2, ya que los macrófagos Nrf2^{-/-} no exhiben esta capacidad antiinflamatoria [262]. La activación de Nrf2 y los genes regulados por este factor de transcripción se encuentran vinculados a la polarización tipo M2 de macrófagos [263]. La síntesis de HO-1 está regulada por Nrf2 y es de fundamental importancia en la inhibición de NF- κ B mediada por Nrf2. Esta enzima participa en la metabolización del hemo, cataliza la escisión del anillo porfirina de los grupos hemo en Fe²⁺, CO y biliverdina, que se convierte en bilirrubina. Los aumentos en la actividad de HO-1 en las células endoteliales conducen a la inhibición de la transcripción mediada por NF- κ B de moléculas de adhesión como la E-Selectina y VCAM-1, a través de la acción de la bilirrubina y posiblemente por la disminución en el reservorio de iones hierro intracelulares libres [264].

En suma, los extractos enriquecidos en cannabinoides inhiben la activación de la respuesta inflamatoria en macrófagos J774.1, posiblemente a través de la inhibición de la vía NF- κ B. Además, impulsan un comportamiento proresolutivo al inducir la acumulación de HO-1.

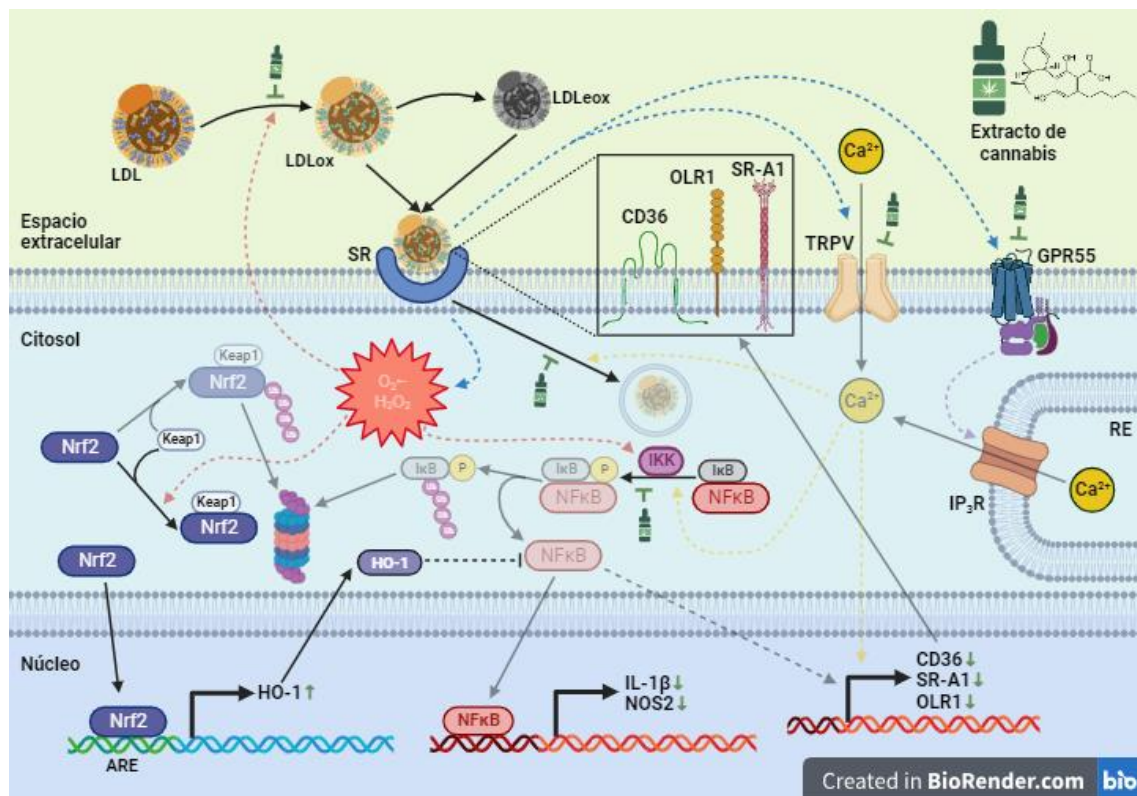


Figura 32. Esquema globalizador de las vías de señalización activadas por y puntos de acción de los extractos enriquecidos en cannabinoides. Los extractos de cannabis fueron efectivos al inhibir la oxidación de LDL y el ingreso de Ca²⁺ a través de receptores TRPV y el GPR55. De esta manera, los extractos de cannabis inducen una disminución en la internalización de LDLox y en la activación de NF- κ B, consecuentemente impactando en la acumulación de mediadores proinflamatorios y SR. Los extractos

también inducen un aumento en la acumulación de HO-1, la cual podría estar mediada por la activación la vía Nrf2.

7. Conclusiones

Los extractos de inflorescencias de *Cannabis Sativa* fueron capaces de interrumpir y/o enlentecer los eventos iniciales en la formación de la placa de ateroma, incluidos:

- La modificación oxidativa de LDL
 - Prolongaron la fase de latencia de la lipoperoxidación
 - Enlentecieron las reacciones en cadena de la fase de propagación de la lipoperoxidación.
- La formación de células espumosas por macrófagos J774.1 expuestos a LDL oxidada
 - Redujeron la internalización de LDLox y la consecuente formación de células espumosas. Efecto que fue mediado, al menos en parte, por receptores de cannabinoides no clásicos, en particular por TRPV1.
 - Disminuyeron la acumulación relativa de los receptores *scavenger* (OLR1, CD36 y SR-A1) inducida por LDLox.
- La respuesta inmune de macrófagos J774.1 expuestos a un estímulo inflamatorio (INF- γ y LPS) y aterogénico (LDLox)
 - Disminuyeron la inducción de la síntesis de proIL-1 β y de la NOS2 al estimular con LPS e INF- γ
 - Redujeron la activación de la vía NF- κ B tras la estimulación con LDLox
 - Promovieron la acumulación de HO-1 en células tratadas y sin tratar con LDLox, destacándose en el último caso el extracto derivado del quimiotipo CBD/A dominante

En suma: los extractos ricos en fitocannabinoides mostraron efectos favorables *in vitro* sobre procesos de relevancia en las etapas tempranas del desarrollo de la placa de ateroma, apoyando el uso de cannabinoides y moduladores del SEC como insumo para el desarrollo de tratamientos que prevengan o detengan el avance de la aterosclerosis.

8. Publicaciones

Musetti B, Kun A, Menchaca D, Rodriguez-Harambides A, Varela J, Moreira-Bahnson E and Thomson L. Cannabis sativa extracts inhibit LDL oxidation, the formation of foam cells and inflammation acting as multi-step effectors in atherosclerosis development in vitro. Enviado a: PLOS Biology 2023.

Musetti B, Moreira-Bahnson E and Thomson L. Cannabinoids in inflammation and atherosclerosis. Chapter 14. In: Victor R. Preedy, Vinood B. Patel and Colin R. Martin (eds.) Medicinal Usage of Cannabis and Cannabinoids. Burlington: Academic Press, 2023. pp. 159-169. Elsevier Inc. ISBN: 978-0-323-90036-2

Musetti B, González H, Gonzalez, M, Bahnson ESM, Varela, J, Thomson, L. Cannabis sativa extracts protected LDL from Cu²⁺-mediated oxidation. Journal of Cannabis Research, v.: 2 37, p.:1 - 11, 2020. DOI: 10.1186/s42238-020-00042-0

Peters EB, Tsihlis ND, Karver MR, Chin SM, **Musetti B**, Ledford BT, Bahnson EM, Stupp SI, Kibbe MR. Atheroma Niche-Responsive Nanocarriers for Immunotherapeutic Delivery. Adv Healthc Mater. 2019 Feb;8(3):e1801545. doi: 10.1002/adhm.201801545.

Cataldo, N, **Musetti, B***, Celano, L, Carabio, C, Cassina, A, Cerecetto, H., Gonzalez, M., Thomson, L. Inhibition of LDL oxidation and inflammasome assembly by nitroaliphatic derivatives. Potential use as anti-inflammatory and anti-atherogenic agents. European Journal of Medicinal Chemistry, 159:178-186, 2018. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.09.062. *Primer autor compartido.

9. Referencias

- [1] WORLD HEALTH ORGANIZATION. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases> (Accessed Sep 1, **2023**).
- [2] Lusis, A.J. Atherosclerosis. *Nature*, **2000**, *407*, 233–241.
- [3] Thim, T.; Hagensen, M.K.; Bentzon, J.F.; Falk, E. From Vulnerable Plaque to Atherothrombosis. *J. Intern. Med.*, **2008**, *263*, 506–516.
- [4] Libby, P.; Hansson, G.K. Taming Immune and Inflammatory Responses to Treat Atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **2018**, *71*, 173–176.
- [5] Welsh, P.; Grassia, G.; Botha, S.; Sattar, N.; Maffia, P. Targeting Inflammation to Reduce Cardiovascular Disease Risk: A Realistic Clinical Prospect?: Targeting Inflammation in CVD. *Br. J. Pharmacol.*, **2017**, *174*, 3898–3913.
- [6] Ridker, P.M.; Everett, B.M.; Thuren, T.; MacFadyen, J.G.; Chang, W.H.; Ballantyne, C.; Fonseca, F.; Nicolau, J.; Koenig, W.; Anker, S.D.; Kastelein, J.J.P.; Cornel, J.H.; Pais, P.; Pella, D.; Genest, J.; Cifkova, R.; Lorenzatti, A.; Forster, T.; Kobalava, Z.; Vida-Simiti, L.; Flather, M.; Shimokawa, H.; Ogawa, H.; Dellborg, M.; Rossi, P.R.F.; Troquay, R.P.T.; Libby, P.; Glynn, R.J. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N. Engl. J. Med.*, **2017**, *377*, 1119–1131.
- [7] Geovanini, G.R.; Libby, P. Atherosclerosis and Inflammation: Overview and Updates. *Clin. Sci.*, **2018**, *132*, 1243–1252.
- [8] Libby, P. Inflammation in Atherosclerosis—No Longer a Theory. *Clin. Chem.*, **2021**, *67*, 131–142.
- [9] Pearson, J.D. Normal Endothelial Cell Function. *Lupus*, **2000**, *9*, 183–188.
- [10] Forstermann, U.; Sessa, W.C. Nitric Oxide Synthases: Regulation and Function. *Eur. Heart J.*, **2012**, *33*, 829–837.
- [11] González-Ramos, S.; Paz-García, M.; Rius, C.; Monte-Monge, A.; Rodríguez, C.; Fernández-García, V.; Andrés, V.; Martínez-González, J.; Lasunción, M.A.; Martín-Sanz, P.; Soehnlein, O.; Bosca, L. Endothelial NOD1 Directs Myeloid Cell Recruitment in Atherosclerosis through VCAM-1. *FASEB J.*, **2019**, *33*, 3912–3921.
- [12] Gimbrone, M.A.; García-Cardena, G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ. Res.*, **2016**, *118*, 620–636.
- [13] Jin, Y.; Fu, J. Novel Insights Into the NLRP3 Inflammasome in Atherosclerosis. *J. Am. Heart Assoc.*, **2019**, *8*, e012219.
- [14] Martinon, F.; Burns, K.; Tschopp, J. The Inflammasome. *Mol. Cell*, **2002**, *10*, 417–426.
- [15] Peng, Y.-J.; Nanduri, J.; Yuan, G.; Wang, N.; Deneris, E.; Pendyala, S.; Natarajan, V.; Kumar, G.K.; Prabhakar, N.R. NADPH Oxidase Is Required for the Sensory Plasticity of the Carotid Body by Chronic Intermittent Hypoxia. *J. Neurosci.*, **2009**, *29*, 4903–4910.
- [16] McCord, J.M.; Fridovich, I. Superoxide Dismutase. An Enzymic Function for Erythrocyte (Hemocytin). *J. Biol. Chem.*, **1969**, *244*, 6049–6055.
- [17] Holmström, K.M.; Finkel, T. Cellular Mechanisms and Physiological Consequences of Redox-Dependent Signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2014**, *15*, 411–421.
- [18] Musetti, B.; Bahnson, E.M.; Thomson, L. Chapter 14 - Cannabinoids in Inflammation and Atherosclerosis. In: *Medicinal Usage of Cannabis and Cannabinoids*; Preedy, V.R.; Patel, V.B.; Martin, C.R., Eds.; Academic Press, **2023**; pp. 159–169.
- [19] Tonelli, C.; Chio, I.I.C.; Tuveson, D.A. Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxid. Redox Signal.*, **2018**, *29*, 1727–1745.
- [20] Nakajima, S.; Kitamura, M. Bidirectional Regulation of NF- κ B by Reactive Oxygen Species: A Role of Unfolded Protein Response. *Free Radic. Biol. Med.*, **2013**, *65*, 162–174.
- [21] Paul, A.; Wilson, S.; Belham, C.M.; Robinson, C.J.M.; Scott, P.H.; Gould, G.W.; Plevin, R. Stress-Activated Protein Kinases: Activation, Regulation and Function. *Cell. Signal.*, **1997**, *9*, 403–410.

- [22] Ono, K.; Han, J. The P38 Signal Transduction Pathway Activation and Function. *Cell. Signal.*, **2000**, *12*, 1–13.
- [23] Alayash, A.I.; Wilson, M.T. Hemoglobin Can Act as a (Pseudo)-Peroxidase in Vivo. What Is the Evidence? *Front. Mol. Biosci.*, **2022**, *9*, 910795.
- [24] Alouffi, S.; Faisal, M.; Alatar, A.A.; Ahmad, S. Oxidative Modification of LDL by Various Physicochemical Techniques: Its Probable Role in Diabetes Coupled with CVDs. *BioMed Res. Int.*, **2018**, *2018*, 1–7.
- [25] Parastatidis, I.; Thomson, L.; Burke, A.; Chernysh, I.; Nagaswami, C.; Visser, J.; Stamer, S.; Liebler, D.C.; Koliakos, G.; Heijnen, H.F.G.; FitzGerald, G.A.; Weisel, J.W.; Ischiropoulos, H. Fibrinogen β -Chain Tyrosine Nitration Is a Prothrombotic Risk Factor. *J. Biol. Chem.*, **2008**, *283*, 33846–33853.
- [26] Thomson, L. 3-Nitrotyrosine Modified Proteins in Atherosclerosis. *Dis. Markers*, **2015**, *2015*, 1–8.
- [27] Thomson, L.; Tenopoulou, M.; Lightfoot, R.; Tsika, E.; Parastatidis, I.; Martinez, M.; Greco, T.M.; Doulias, P.-T.; Wu, Y.; Tang, W.H.W.; Hazen, S.L.; Ischiropoulos, H. Immunoglobulins Against Tyrosine-Nitrated Epitopes in Coronary Artery Disease. *Circulation*, **2012**, *126*, 2392–2401.
- [28] Parthasarathy, S.; Raghavamenon, A.; Garelnabi, M.O.; Santanam, N. Oxidized Low-Density Lipoprotein. In: *Free Radicals and Antioxidant Protocols*; Uppu, R.M.; Murthy, S.N.; Pryor, W.A.; Parinandi, N.L., Eds.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, **2010**; Vol. 610, pp. 403–417.
- [29] Trostchansky, A.; Batthyány, C.; Botti, H.; Radi, R.; Denicola, A.; Rubbo, H. Formation of Lipid-Protein Adducts in Low-Density Lipoprotein by Fluxes of Peroxynitrite and Its Inhibition by Nitric Oxide. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2001**, *395*, 225–232.
- [30] Leeuwenburgh, C.; Rasmussen, J.E.; Hsu, F.F.; Mueller, D.M.; Pennathur, S.; Heinecke, J.W. Mass Spectrometric Quantification of Markers for Protein Oxidation by Tyrosyl Radical, Copper, and Hydroxyl Radical in Low Density Lipoprotein Isolated from Human Atherosclerotic Plaques. *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*, 3520–3526.
- [31] Zani, I.; Stephen, S.; Mughal, N.; Russell, D.; Homer-Vanniasinkam, S.; Wheatcroft, S.; Ponnambalam, S. Scavenger Receptor Structure and Function in Health and Disease. *Cells*, **2015**, *4*, 178–201.
- [32] PrabhuDas, M.R.; Baldwin, C.L.; Bollyky, P.L.; Bowdish, D.M.E.; Drickamer, K.; Febbraio, M.; Herz, J.; Kobzik, L.; Krieger, M.; Loike, J.; McVicker, B.; Means, T.K.; Moestrup, S.K.; Post, S.R.; Sawamura, T.; Silverstein, S.; Speth, R.C.; Telfer, J.C.; Thiele, G.M.; Wang, X.-Y.; Wright, S.D.; El Khoury, J. A Consensus Definitive Classification of Scavenger Receptors and Their Roles in Health and Disease. *J. Immunol.*, **2017**, *198*, 3775–3789.
- [33] Basatemur, G.L.; Jørgensen, H.F.; Clarke, M.C.H.; Bennett, M.R.; Mallat, Z. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Nat. Rev. Cardiol.*, **2019**, *16*, 727–744.
- [34] Buglak, N.E.; Jiang, W.; Bahnson, E.S.M. Cinnamic Aldehyde Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Neointimal Hyperplasia in Zucker Diabetic Fatty Rats. *Redox Biol.*, **2018**, *19*, 166–178.
- [35] Bennett, M.R.; Sinha, S.; Owens, G.K. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ. Res.*, **2016**, *118*, 692–702.
- [36] Musetti, B.; González-Ramos, H.; González, M.; Bahnson, E.M.; Varela, J.; Thomson, L. Cannabis Sativa Extracts Protect LDL from Cu²⁺-Mediated Oxidation. *J. Cannabis Res.*, **2020**, *2*, 37.
- [37] Corongiu, F.P.; Banni, S. [30] Detection of Conjugated Dienes by Second Derivative Ultraviolet Spectrophotometry. In: *Methods in Enzymology*; Elsevier, **1994**; Vol. 233, pp. 303–310.
- [38] Yin, H.; Xu, L.; Porter, N.A. Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. *Chem. Rev.*, **2011**, *111*, 5944–5972.

- [39] Schuster, B.; Prassl, R.; Nigon, F.; Chapman, M.J.; Laggner, P. Core Lipid Structure Is a Major Determinant of the Oxidative Resistance of Low Density Lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1995**, *92*, 2509–2513.
- [40] Mather, B.D.; Viswanathan, K.; Miller, K.M.; Long, T.E. Michael Addition Reactions in Macromolecular Design for Emerging Technologies. *Prog. Polym. Sci.*, **2006**, *31*, 487–531.
- [41] Negre-Salvayre, A.; Coatrieux, C.; Ingueneau, C.; Salvayre, R. Advanced Lipid Peroxidation End Products in Oxidative Damage to Proteins. Potential Role in Diseases and Therapeutic Prospects for the Inhibitors: Therapeutic Interest of ALE Carbonyl Scavengers. *Br. J. Pharmacol.*, **2008**, *153*, 6–20.
- [42] Halliwell, B. Oxidation of Low-Density Lipoproteins: Questions of Initiation, Propagation, and the Effect of Antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr.*, **1995**, *61*, 670S-677S.
- [43] Itabe, H. Oxidative Modification of LDL: Its Pathological Role in Atherosclerosis. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, **2009**, *37*, 4–11.
- [44] Wang, K.; Li, Y.; Luo, C.; Chen, Y. Dynamic AFM Detection of the Oxidation-Induced Changes in Size, Stiffness, and Stickiness of Low-Density Lipoprotein. *J. Nanobiotechnology*, **2020**, *18*, 167.
- [45] Heinecke, J.W. Mechanisms of Oxidative Damage of Low Density Lipoprotein in Human Atherosclerosis: *Curr. Opin. Lipidol.*, **1997**, *8*, 268–274.
- [46] Levitan, I.; Volkov, S.; Subbaiah, P.V. Oxidized LDL: Diversity, Patterns of Recognition, and Pathophysiology. *Antioxid. Redox Signal.*, **2010**, *13*, 39–75.
- [47] Lowhalidanon, K.; Khunkaewla, P. Discrimination between Minimally Modified LDL and Fully Oxidized LDL Using Monoclonal Antibodies. *Anal. Biochem.*, **2021**, *619*, 114103.
- [48] Siess, W. Platelet Interaction with Bioactive Lipids Formed by Mild Oxidation of Low-Density Lipoprotein. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.*, **2006**, *35*, 292–304.
- [49] Tertov, V.V.; Sobenin, I.A.; Gabbasov, Z.A.; Popov, E.G.; Orekhov, A.N. Lipoprotein Aggregation as an Essential Condition of Intracellular Lipid Accumulation Caused by Modified Low Density Lipoproteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1989**, *163*, 489–494.
- [50] Lopes-Virella, M.F.; Binzafar, N.; Rackley, S.; Akira Takei; La Via, M.; Virella, G. The Uptake of LDL-IC by Human Macrophages: Predominant Involvement of the FcγRI Receptor. *Atherosclerosis*, **1997**, *135*, 161–170.
- [51] Poznyak, A.V.; Wu, W.-K.; Melnichenko, A.A.; Wetzker, R.; Sukhorukov, V.; Markin, A.M.; Khotina, V.A.; Orekhov, A.N. Signaling Pathways and Key Genes Involved in Regulation of Foam Cell Formation in Atherosclerosis. *Cells*, **2020**, *9*, 584.
- [52] Xu, Z.; Dong, A.; Feng, Z.; Li, J. Interleukin-32 Promotes Lipid Accumulation through Inhibition of Cholesterol Efflux. *Exp. Ther. Med.*, **2017**, *14*, 947–952.
- [53] Liu, Q.; Fan, J.; Bai, J.; Peng, L.; Zhang, T.; Deng, L.; Wang, G.; Zhao, Y.; Nong, J.; Zhang, M.; Wang, Y. IL-34 Promotes Foam Cell Formation by Enhancing CD36 Expression through P38 MAPK Pathway. *Sci. Rep.*, **2018**, *8*, 17347.
- [54] Cortés, V.; Vásquez, T.; Arteaga, A.; Nervi, F.; Rigotti, A. Rememorando La Contribución de Goldstein y Brown al Estudio Del Metabolismo Del Colesterol: A Un Cuarto de Siglo Del Premio Nobel de Medicina. *Rev. Médica Chile*, **2012**, *140*, 1053–1059.
- [55] Goldstein, J.L.; Ho, Y.K.; Basu, S.K.; Brown, M.S. Binding Site on Macrophages That Mediates Uptake and Degradation of Acetylated Low Density Lipoprotein, Producing Massive Cholesterol Deposition. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1979**, *76*, 333–337.
- [56] Rohrer, L.; Freeman, M.; Kodama, T.; Penman, M.; Krieger, M. Coiled-Coil Fibrous Domains Mediate Ligand Binding by Macrophage Scavenger Receptor Type II. *Nature*, **1990**, *343*, 570–572.
- [57] Freeman, M.; Ashkenas, J.; Rees, D.J.; Kingsley, D.M.; Copeland, N.G.; Jenkins, N.A.; Krieger, M. An Ancient, Highly Conserved Family of Cysteine-Rich Protein Domains Revealed by Cloning Type I and Type II Murine Macrophage Scavenger Receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1990**, *87*, 8810–8814.

- [58] Krieger, M.; Krieger, J. STRUCTURES AND FUNCTIONS OF MULTILIGAND LIPOPROTEIN RECEPTORS: Macrophage Scavenger Receptors and LDL Receptor-Related Protein (LRP). *Annu. Rev. Biochem.*, **1994**, *63*, 601–637.
- [59] Kodama, T.; Reddy, P.; Kishimoto, C.; Krieger, M. Purification and Characterization of a Bovine Acetyl Low Density Lipoprotein Receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1988**, *85*, 9238–9242.
- [60] Naito, M.; Suzuki, H.; Mori, T.; Matsumoto, A.; Kodama, T.; Takahashi, K. Coexpression of Type I and Type II Human Macrophage Scavenger Receptors in Macrophages of Various Organs and Foam Cells in Atherosclerotic Lesions. *Am. J. Pathol.*, **1992**, *141*, 591–599.
- [61] Gough, P.J.; Greaves, D.R.; Suzuki, H.; Hakkinen, T.; Hiltunen, M.O.; Turunen, M.; Herttuala, S.Y.; Kodama, T.; Gordon, S. Analysis of Macrophage Scavenger Receptor (SR-A) Expression in Human Aortic Atherosclerotic Lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **1999**, *19*, 461–471.
- [62] Hiltunen, T.P.; Luoma, J.S.; Nikkari, T.; Ylä-Herttuala, S. Expression of LDL Receptor, VLDL Receptor, LDL Receptor-Related Protein, and Scavenger Receptor in Rabbit Atherosclerotic Lesions: Marked Induction of Scavenger Receptor and VLDL Receptor Expression During Lesion Development. *Circulation*, **1998**, *97*, 1079–1086.
- [63] Dejager, S.; Mietus-Synder, M.; Pitas, R.E. Oxidized Low Density Lipoproteins Bind to the Scavenger Receptor Expressed by Rabbit Smooth Muscle Cells and Macrophages. *Arterioscler. Thromb. J. Vasc. Biol.*, **1993**, *13*, 371–378.
- [64] Zhang, H.; Yang, Y.; Steinbrecher, U.P. Structural Requirements for the Binding of Modified Proteins to the Scavenger Receptor of Macrophages. *J. Biol. Chem.*, **1993**, *268*, 5535–5542.
- [65] Parthasarathy, S.; Fong, L.G.; Otero, D.; Steinberg, D. Recognition of Solubilized Apoproteins from Delipidated, Oxidized Low Density Lipoprotein (LDL) by the Acetyl-LDL Receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1987**, *84*, 537–540.
- [66] Moore, K.J.; Freeman, M.W. Scavenger Receptors in Atherosclerosis: Beyond Lipid Uptake. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **2006**, *26*, 1702–1711.
- [67] Plüddemann, A.; Neyen, C.; Gordon, S. Macrophage Scavenger Receptors and Host-Derived Ligands. *Methods*, **2007**, *43*, 207–217.
- [68] Ricci, R.; Sumara, G.; Sumara, I.; Rozenberg, I.; Kurrer, M.; Akhmedov, A.; Hersberger, M.; Eriksson, U.; Eberli, F.R.; Becher, B.; Borén, J.; Chen, M.; Cybulsky, M.I.; Moore, K.J.; Freeman, M.W.; Wagner, E.F.; Matter, C.M.; Lüscher, T.F. Requirement of JNK2 for Scavenger Receptor A-Mediated Foam Cell Formation in Atherogenesis. *Science*, **2004**, *306*, 1558–1561.
- [69] Ohnishi, K.; Komohara, Y.; Fujiwara, Y.; Takemura, K.; Lei, X.; Nakagawa, T.; Sakashita, N.; Takeya, M. Suppression of TLR4-Mediated Inflammatory Response by Macrophage Class A Scavenger Receptor (CD204). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2011**, *411*, 516–522.
- [70] Endemann, G.; Stanton, L.W.; Madden, K.S.; Bryant, C.M.; White, R.T.; Protter, A.A. CD36 Is a Receptor for Oxidized Low Density Lipoprotein. *J. Biol. Chem.*, **1993**, *268*, 11811–11816.
- [71] Byun, J.; Mueller, D.M.; Fabjan, J.S.; Heinecke, J.W. Nitrogen Dioxide Radical Generated by the Myeloperoxidase-Hydrogen Peroxide-Nitrite System Promotes Lipid Peroxidation of Low Density Lipoprotein. *FEBS Lett.*, **1999**, *455*, 243–246.
- [72] Silverstein, R.L.; Febbraio, M. CD36, a Scavenger Receptor Involved in Immunity, Metabolism, Angiogenesis, and Behavior. *Sci. Signal.*, **2009**, *2*.
- [73] Nozaki, S.; Kashiwagi, H.; Yamashita, S.; Nakagawa, T.; Kostner, B.; Tomiyama, Y.; Nakata, A.; Ishigami, M.; Miyagawa, J.; Kameda-Takemura, K. Reduced Uptake of Oxidized Low Density Lipoproteins in Monocyte-Derived Macrophages from CD36-Deficient Subjects. *J. Clin. Invest.*, **1995**, *96*, 1859–1865.

- [74] Ackers, I.; Szymanski, C.; Duckett, K.J.; Consitt, L.A.; Silver, M.J.; Malgor, R. Blocking Wnt5a Signaling Decreases CD36 Expression and Foam Cell Formation in Atherosclerosis. *Cardiovasc. Pathol.*, **2018**, *34*, 1–8.
- [75] Reustle, A.; Torzewski, M. Role of P38 MAPK in Atherosclerosis and Aortic Valve Sclerosis. *Int. J. Mol. Sci.*, **2018**, *19*, 3761.
- [76] Stewart, C.R.; Stuart, L.M.; Wilkinson, K.; Van Gils, J.M.; Deng, J.; Halle, A.; Rayner, K.J.; Boyer, L.; Zhong, R.; Frazier, W.A.; Lacy-Hulbert, A.; Khoury, J.E.; Golenbock, D.T.; Moore, K.J. CD36 Ligands Promote Sterile Inflammation through Assembly of a Toll-like Receptor 4 and 6 Heterodimer. *Nat. Immunol.*, **2010**, *11*, 155–161.
- [77] Yoshimoto, R.; Fujita, Y.; Kakino, A.; Iwamoto, S.; Takaya, T.; Sawamura, T. The Discovery of LOX-1, Its Ligands and Clinical Significance. *Cardiovasc. Drugs Ther.*, **2011**, *25*, 379–391.
- [78] Kataoka, H.; Kume, N.; Miyamoto, S.; Minami, M.; Moriwaki, H.; Murase, T.; Sawamura, T.; Masaki, T.; Hashimoto, N.; Kita, T. Expression of Lectinlike Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1 in Human Atherosclerotic Lesions. *Circulation*, **1999**, *99*, 3110–3117.
- [79] Wilkinson, K.; El Khoury, J. Microglial Scavenger Receptors and Their Roles in the Pathogenesis of Alzheimer’s Disease. *Int. J. Alzheimers Dis.*, **2012**, *2012*, 1–10.
- [80] Wu, Z.; Sawamura, T.; Kurdowska, A.K.; Ji, H.-L.; Idell, S.; Fu, J. LOX-1 Deletion Improves Neutrophil Responses, Enhances Bacterial Clearance, and Reduces Lung Injury in a Murine Polymicrobial Sepsis Model. *Infect. Immun.*, **2011**, *79*, 2865–2870.
- [81] Kakutani, M.; Ueda, M.; Naruko, T.; Masaki, T.; Sawamura, T. Accumulation of LOX-1 Ligand in Plasma and Atherosclerotic Lesions of Watanabe Heritable Hyperlipidemic Rabbits: Identification by a Novel Enzyme Immunoassay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2001**, *282*, 180–185.
- [82] Murphy, J.E.; Tacon, D.; Tedbury, P.R.; Hadden, J.M.; Knowling, S.; Sawamura, T.; Peckham, M.; Phillips, S.E.V.; Walker, J.H.; Ponnambalam, S. LOX-1 Scavenger Receptor Mediates Calcium-Dependent Recognition of Phosphatidylserine and Apoptotic Cells. *Biochem. J.*, **2006**, *393*, 107–115.
- [83] Reiss, A.; Anwar, K.; Wirkowski, P. Lectin-Like Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor 1 (LOX-1) in Atherogenesis: A Brief Review. *Curr. Med. Chem.*, **2009**, *16*, 2641–2652.
- [84] Kataoka, H.; Kume, N.; Miyamoto, S.; Minami, M.; Morimoto, M.; Hayashida, K.; Hashimoto, N.; Kita, T. Oxidized LDL Modulates Bax/Bcl-2 Through the Lectinlike Ox-LDL Receptor-1 in Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **2001**, *21*, 955–960.
- [85] Li, L.; Sawamura, T.; Renier, G. Glucose Enhances Human Macrophage LOX-1 Expression: Role for LOX-1 in Glucose-Induced Macrophage Foam Cell Formation. *Circ. Res.*, **2004**, *94*, 892–901.
- [86] Biocca, S.; Falconi, M.; Filesi, I.; Baldini, F.; Vecchione, L.; Mango, R.; Romeo, F.; Federici, G.; Desideri, A.; Novelli, G. Functional Analysis and Molecular Dynamics Simulation of LOX-1 K167N Polymorphism Reveal Alteration of Receptor Activity. *PLoS ONE*, **2009**, *4*, e4648.
- [87] Balzan, S.; Lubrano, V. LOX-1 Receptor: A Potential Link in Atherosclerosis and Cancer. *Life Sci.*, **2018**, *198*, 79–86.
- [88] Khaidakov, M.; Wang, X.; Mehta, J.L. Potential Involvement of LOX-1 in Functional Consequences of Endothelial Senescence. *PLoS ONE*, **2011**, *6*, e20964.
- [89] Jeannin, P.; Bottazzi, B.; Sironi, M.; Doni, A.; Rusnati, M.; Presta, M.; Maina, V.; Magistrelli, G.; Haeuw, J.F.; Hoeffel, G.; Thieblemont, N.; Corvaia, N.; Garlanda, C.; Delneste, Y.; Mantovani, A. Complexity and Complementarity of Outer Membrane Protein A Recognition by Cellular and Humoral Innate Immunity Receptors. *Immunity*, **2005**, *22*, 551–560.

- [90] Rabino, M.; Mallia, S.; Castiglioni, E.; Rovina, D.; Pompilio, G.; Gowran, A. The Endocannabinoid System and Cannabidiol: Past, Present, and Prospective for Cardiovascular Diseases. *Pharmaceuticals*, **2021**, *14*, 936.
- [91] Fulmer, M.L.; Thewke, D.P. The Endocannabinoid System and Heart Disease: The Role of Cannabinoid Receptor Type 2. *Cardiovasc. Hematol. Disord.-Drug Targets*, **2018**, *18*, 34–51.
- [92] Osafo, N.; Yeboah, O.K.; Antwi, A.O. Endocannabinoid System and Its Modulation of Brain, Gut, Joint and Skin Inflammation. *Mol. Biol. Rep.*, **2021**, *48*, 3665–3680.
- [93] Hryhorowicz, S.; Kaczmarek-Ryś, M.; Zielińska, A.; Scott, R.J.; Słomski, R.; Pławski, A. Endocannabinoid System as a Promising Therapeutic Target in Inflammatory Bowel Disease – A Systematic Review. *Front. Immunol.*, **2021**, *12*, 790803.
- [94] Barrie, N.; Manolios, N. The Endocannabinoid System in Pain and Inflammation: Its Relevance to Rheumatic Disease. *Eur. J. Rheumatol.*, **2017**, *4*, 210–218.
- [95] Turcotte, C.; Chouinard, F.; Lefebvre, J.S.; Flamand, N. Regulation of Inflammation by Cannabinoids, the Endocannabinoids 2-Arachidonoyl-Glycerol and Arachidonoyl-Ethanolamide, and Their Metabolites. *J. Leukoc. Biol.*, **2015**, *97*, 1049–1070.
- [96] Gaoni, Y.; Mechoulam, R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J. Am. Chem. Soc.*, **1964**, *86*, 1646–1647.
- [97] Crocq, M.-A. History of Cannabis and the Endocannabinoid System. *Dialogues Clin. Neurosci.*, **2020**, *22*, 223–228.
- [98] Devane, W.A.; Dysarz, F.A.; Johnson, M.R.; Melvin, L.S.; Howlett, A.C. Determination and Characterization of a Cannabinoid Receptor in Rat Brain. *Mol. Pharmacol.*, **1988**, *34*, 605–613.
- [99] Matsuda, L.A.; Lolait, S.J.; Brownstein, M.J.; Young, A.C.; Bonner, T.I. Structure of a Cannabinoid Receptor and Functional Expression of the Cloned cDNA. *Nature*, **1990**, *346*, 561–564.
- [100] Munro, S.; Thomas, K.L.; Abu-Shaar, M. Molecular Characterization of a Peripheral Receptor for Cannabinoids. *Nature*, **1993**, *365*, 61–65.
- [101] Devane, W.A.; Hanuš, L.; Breuer, A.; Pertwee, R.G.; Stevenson, L.A.; Griffin, G.; Gibson, D.; Mandelbaum, A.; Etinger, A.; Mechoulam, R. Isolation and Structure of a Brain Constituent That Binds to the Cannabinoid Receptor. *Science*, **1992**, *258*, 1946–1949.
- [102] Mechoulam, R.; Ben-Shabat, S.; Hanus, L.; Ligumsky, M.; Kaminski, N.E.; Schatz, A.R.; Gopher, A.; Almog, S.; Martin, B.R.; Compton, D.R.; Pertwee, R.G.; Griffin, G.; Bayewitch, M.; Barg, J.; Vogel, Z. Identification of an Endogenous 2-Monoglyceride, Present in Canine Gut, That Binds to Cannabinoid Receptors. *Biochem. Pharmacol.*, **1995**, *50*, 83–90.
- [103] Cravatt, B.F.; Giang, D.K.; Mayfield, S.P.; Boger, D.L.; Lerner, R.A.; Gilula, N.B. Molecular Characterization of an Enzyme That Degrades Neuromodulatory Fatty-Acid Amides. *Nature*, **1996**, *384*, 83–87.
- [104] Bisogno, T.; Howell, F.; Williams, G.; Minassi, A.; Cascio, M.G.; Ligresti, A.; Matias, I.; Schiano-Moriello, A.; Paul, P.; Williams, E.-J.; Gangadharan, U.; Hobbs, C.; Di Marzo, V.; Doherty, P. Cloning of the First Sn1-DAG Lipases Points to the Spatial and Temporal Regulation of Endocannabinoid Signaling in the Brain. *J. Cell Biol.*, **2003**, *163*, 463–468.
- [105] Cristino, L.; Bisogno, T.; Di Marzo, V. Cannabinoids and the Expanded Endocannabinoid System in Neurological Disorders. *Nat. Rev. Neurol.*, **2020**, *16*, 9–29.
- [106] Murakami, M.; Kudo, I. Phospholipase A2. *J. Biochem. (Tokyo)*, **2002**, *131*, 285–292.
- [107] Mechoulam, R.; Hanuš, L. A Historical Overview of Chemical Research on Cannabinoids. *Chem. Phys. Lipids*, **2000**, *108*, 1–13.
- [108] Rumińska, A.; Dobrzyń, A. [The endocannabinoid system and its role in regulation of metabolism in peripheral tissues]. *Postępy Biochem.*, **2012**, *58*, 127–134.
- [109] Lambert, D.M.; Fowler, C.J. The Endocannabinoid System: Drug Targets, Lead Compounds, and Potential Therapeutic Applications. *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 5059–5087.

- [110] Hanuš, L.; Abu-Lafi, S.; Frider, E.; Breuer, A.; Vogel, Z.; Shalev, D.E.; Kustanovich, I.; Mechoulam, R. 2-Arachidonoyl Glyceryl Ether, an Endogenous Agonist of the Cannabinoid CB₁ Receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2001**, *98*, 3662–3665.
- [111] Pertwee, R.G. Endocannabinoids and Their Pharmacological Actions. In: *Endocannabinoids*; Pertwee, R.G., Ed.; Handbook of Experimental Pharmacology; Springer International Publishing: Cham, **2015**; Vol. 231, pp. 1–37.
- [112] Ferreira, J.V.; Chaves, G.A.; Marino, B.L.B.; Sousa, K.P.A.; Souza, L.R.; Brito, M.F.B.; Teixeira, H.R.C.; da Silva, C.H.T.P.; Santos, C.B.R.; Hage-Melim, L.I.S. Cannabinoid Type 1 Receptor (CB1) Ligands with Therapeutic Potential for Withdrawal Syndrome in Chemical Dependents of *Cannabis Sativa*. *ChemMedChem*, **2017**, *12*, 1408–1416.
- [113] Miralpeix, C.; Reguera, A.C.; Fosch, A.; Zagmutt, S.; Casals, N.; Cota, D.; Rodríguez-Rodríguez, R. Hypothalamic Endocannabinoids in Obesity: An Old Story with New Challenges. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2021**, *78*, 7469–7490.
- [114] Mechoulam, R.; Peters, M.; Murillo-Rodríguez, E.; Hanus, L.O. Cannabidiol--Recent Advances. *Chem. Biodivers.*, **2007**, *4*, 1678–1692.
- [115] Showalter, V.M.; Compton, D.R.; Martin, B.R.; Abood, M.E. Evaluation of Binding in a Transfected Cell Line Expressing a Peripheral Cannabinoid Receptor (CB2): Identification of Cannabinoid Receptor Subtype Selective Ligands. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1996**, *278*, 989–999.
- [116] McPartland, J.M.; Glass, M.; Pertwee, R.G. Meta-Analysis of Cannabinoid Ligand Binding Affinity and Receptor Distribution: Interspecies Differences. *Br. J. Pharmacol.*, **2007**, *152*, 583–593.
- [117] Grotenhermen, F. Cannabinoids. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.*, **2005**, *4*, 507–530.
- [118] Hanus, L.; Abu-Lafi, S.; Frider, E.; Breuer, A.; Vogel, Z.; Shalev, D.E.; Kustanovich, I.; Mechoulam, R. 2-Arachidonoyl Glyceryl Ether, an Endogenous Agonist of the Cannabinoid CB₁ Receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2001**, *98*, 3662–3665.
- [119] Bisogno, T.; Melck, D.; Bobrov MYu; Gretskeya, N.M.; Bezuglov, V.V.; De Petrocellis, L.; Di Marzo, V. N-Acyl-Dopamines: Novel Synthetic CB(1) Cannabinoid-Receptor Ligands and Inhibitors of Anandamide Inactivation with Cannabimimetic Activity in Vitro and in Vivo. *Biochem. J.*, **2000**, *351*, 817–824.
- [120] Latek, D.; Kolinski, M.; Ghoshdastider, U.; Debinski, A.; Bombolewski, R.; Plazinska, A.; Jozwiak, K.; Filipek, S. Modeling of Ligand Binding to G Protein Coupled Receptors: Cannabinoid CB₁, CB₂ and Adrenergic β 2AR. *J. Mol. Model.*, **2011**, *17*, 2353–2366.
- [121] Li, J.; Ning, Y.; Hedley, W.; Saunders, B.; Chen, Y.; Tindill, N.; Hannay, T.; Subramaniam, S. The Molecule Pages Database. *Nature*, **2002**, *420*, 716–717.
- [122] Busquets-Garcia, A.; Bains, J.; Marsicano, G. CB₁ Receptor Signaling in the Brain: Extracting Specificity from Ubiquity. *Neuropsychopharmacology*, **2018**, *43*, 4–20.
- [123] Fagerberg, L.; Hallström, B.M.; Oksvold, P.; Kampf, C.; Djureinovic, D.; Odeberg, J.; Habuka, M.; Tahmasebpoor, S.; Danielsson, A.; Edlund, K.; Asplund, A.; Sjöstedt, E.; Lundberg, E.; Szgyarto, C.A.-K.; Skogs, M.; Takanen, J.O.; Berling, H.; Tegel, H.; Mulder, J.; Nilsson, P.; Schwenk, J.M.; Lindskog, C.; Danielsson, F.; Mardinoglu, A.; Sivertsson, A.; von Feilitzen, K.; Forsberg, M.; Zwahlen, M.; Olsson, I.; Navani, S.; Huss, M.; Nielsen, J.; Ponten, F.; Uhlén, M. Analysis of the Human Tissue-Specific Expression by Genome-Wide Integration of Transcriptomics and Antibody-Based Proteomics. *Mol. Cell. Proteomics MCP*, **2014**, *13*, 397–406.
- [124] Persidsky, Y.; Fan, S.; Dykstra, H.; Reichenbach, N.L.; Rom, S.; Ramirez, S.H. Activation of Cannabinoid Type Two Receptors (CB₂) Diminish Inflammatory Responses in Macrophages and Brain Endothelium. *J. Neuroimmune Pharmacol.*, **2015**, *10*, 302–308.
- [125] Komorowska-Müller, J.A.; Schmöle, A.-C. CB₂ Receptor in Microglia: The Guardian of Self-Control. *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, *22*, 19.

- [126] Rajesh, M.; Mukhopadhyay, P.; Bátkai, S.; Haskó, G.; Liaudet, L.; Huffman, J.W.; Csiszar, A.; Ungvari, Z.; Mackie, K.; Chatterjee, S.; Pacher, P. CB₂-Receptor Stimulation Attenuates TNF- α -Induced Human Endothelial Cell Activation, Transendothelial Migration of Monocytes, and Monocyte-Endothelial Adhesion. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.*, **2007**, *293*, H2210–H2218.
- [127] Rajesh, M.; Mukhopadhyay, P.; Haskó, G.; Huffman, J.W.; Mackie, K.; Pacher, P. CB₂ Cannabinoid Receptor Agonists Attenuate TNF- α -induced Human Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration. *Br. J. Pharmacol.*, **2008**, *153*, 347–357.
- [128] Wettschureck, N.; Offermanns, S. Mammalian G Proteins and Their Cell Type Specific Functions. *Physiol. Rev.*, **2005**, *85*, 1159–1204.
- [129] Zhu, G.; Liu, Y.; Zhi, Y.; Jin, Y.; Li, J.; Shi, W.; Liu, Y.; Han, Y.; Yu, S.; Jiang, J.; Zhao, X. PKA- and Ca²⁺-Dependent P38 MAPK/CREB Activation Protects against Manganese-Mediated Neuronal Apoptosis. *Toxicol. Lett.*, **2019**, *309*, 10–19.
- [130] Silva, A.J.; Kogan, J.H.; Frankland, P.W.; Kida, S. CREB AND MEMORY. *Annu. Rev. Neurosci.*, **1998**, *21*, 127–148.
- [131] Wen, A.Y.; Sakamoto, K.M.; Miller, L.S. The Role of the Transcription Factor CREB in Immune Function. *J. Immunol.*, **2010**, *185*, 6413–6419.
- [132] Bonhaus, D.W.; Chang, L.K.; Kwan, J.; Martin, G.R. Dual Activation and Inhibition of Adenylyl Cyclase by Cannabinoid Receptor Agonists: Evidence for Agonist-Specific Trafficking of Intracellular Responses. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1998**, *287*, 884–888.
- [133] Lauckner, J.E.; Hille, B.; Mackie, K. The Cannabinoid Agonist WIN55,212-2 Increases Intracellular Calcium via CB₁ Receptor Coupling to G_{q/11} G Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2005**, *102*, 19144–19149.
- [134] Kamato, D.; Thach, L.; Bernard, R.; Chan, V.; Zheng, W.; Kaur, H.; Brimble, M.; Osman, N.; Little, P.J. Structure, Function, Pharmacology, and Therapeutic Potential of the G Protein, G_i \pm /q,11. *Front. Cardiovasc. Med.*, **2015**, *2*.
- [135] Ye, L.; Cao, Z.; Wang, W.; Zhou, N. New Insights in Cannabinoid Receptor Structure and Signaling. *Curr. Mol. Pharmacol.*, **2019**, *12*, 239–248.
- [136] Ibsen, M.S.; Connor, M.; Glass, M. Cannabinoid CB₁ and CB₂ Receptor Signaling and Bias. *Cannabis Cannabinoid Res.*, **2017**, *2*, 48–60.
- [137] Fruman, D.A.; Chiu, H.; Hopkins, B.D.; Bagrodia, S.; Cantley, L.C.; Abraham, R.T. The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell*, **2017**, *170*, 605–635.
- [138] Smrcka, A.V. G Protein By Subunits: Central Mediators of G Protein-Coupled Receptor Signaling. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2008**, *65*, 2191–2214.
- [139] Ibsen, M.S.; Finlay, D.B.; Patel, M.; Javitch, J.A.; Glass, M.; Grimsey, N.L. Cannabinoid CB₁ and CB₂ Receptor-Mediated Arrestin Translocation: Species, Subtype, and Agonist-Dependence. *Front. Pharmacol.*, **2019**, *10*, 350.
- [140] Howlett, A.; Blume, L.; Dalton, G. CB₁ Cannabinoid Receptors and Their Associated Proteins. *Curr. Med. Chem.*, **2010**, *17*, 1382–1393.
- [141] Morales, P.; Jagerovic, N. Advances Towards The Discovery of GPR55 Ligands. *Curr. Med. Chem.*, **2016**, *23*, 2087–2100.
- [142] McHugh, D.; Hu, S.S.; Rimmerman, N.; Juknat, A.; Vogel, Z.; Walker, J.M.; Bradshaw, H.B. N-Arachidonoyl Glycine, an Abundant Endogenous Lipid, Potently Drives Directed Cellular Migration through GPR18, the Putative Abnormal Cannabidiol Receptor. *BMC Neurosci.*, **2010**, *11*, 44.
- [143] Brown, A.J. Novel Cannabinoid Receptors: Novel Cannabinoid Receptors. *Br. J. Pharmacol.*, **2007**, *152*, 567–575.
- [144] Cohen, K.; Weinstein, A. The Effects of Cannabinoids on Executive Functions: Evidence from Cannabis and Synthetic Cannabinoids—A Systematic Review. *Brain Sci.*, **2018**, *8*, 40.
- [145] Alhouayek, M.; Masquelier, J.; Muccioli, G.G. Lysophosphatidylinositols, from Cell Membrane Constituents to GPR55 Ligands. *Trends Pharmacol. Sci.*, **2018**, *39*, 586–604.

- [146] Drzazga, A.; Sowinska, A.; Krzeminska, A.; Rytczak, P.; Koziolkiewicz, M.; Gendaszewska-Darmach, E. Lysophosphatidylcholine Elicits Intracellular Calcium Signaling in a GPR55-Dependent Manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2017**, *489*, 242–247.
- [147] Elbegdorj, O.; Westkaemper, R.B.; Zhang, Y. A Homology Modeling Study toward the Understanding of Three-Dimensional Structure and Putative Pharmacological Profile of the G-Protein Coupled Receptor GPR55. *J. Mol. Graph. Model.*, **2013**, *39*, 50–60.
- [148] Lauckner, J.E.; Jensen, J.B.; Chen, H.-Y.; Lu, H.-C.; Hille, B.; Mackie, K. GPR55 Is a Cannabinoid Receptor That Increases Intracellular Calcium and Inhibits M Current. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2008**, *105*, 2699–2704.
- [149] Toker, A. The Biology and Biochemistry of Diacylglycerol Signalling. Meeting on Molecular Advances in Diacylglycerol Signalling. *EMBO Rep.*, **2005**, *6*, 310–314.
- [150] Henstridge, C.M.; Balenga, N.A.; Schröder, R.; Kargl, J.K.; Platzer, W.; Martini, L.; Arthur, S.; Penman, J.; Whistler, J.L.; Kostenis, E.; Waldhoer, M.; Irving, A.J. GPR55 Ligands Promote Receptor Coupling to Multiple Signalling Pathways: GPR55 Signalling. *Br. J. Pharmacol.*, **2010**, *160*, 604–614.
- [151] Dhanasekaran, N.; Dermott, J. Signaling by the G Class of G Proteins. *Cell. Signal.*, **1996**, *8*, 235–245.
- [152] Wang, D.; Tan, Y.; Kreitzer, G.E.; Nakai, Y.; Shan, D.; Zheng, Y.; Huang, X.-Y. G Proteins G12 and G13 Control the Dynamic Turnover of Growth Factor-Induced Dorsal Ruffles. *J. Biol. Chem.*, **2006**, *281*, 32660–32667.
- [153] Nilius, B.; Owsianik, G. The Transient Receptor Potential Family of Ion Channels. *Genome Biol.*, **2011**, *12*, 218.
- [154] Westman, J.; Grinstein, S.; Maxson, M.E. Revisiting the Role of Calcium in Phagosome Formation and Maturation. *J. Leukoc. Biol.*, **2019**, *106*, 837–851.
- [155] Bautista, D.M. Spicy Science: David Julius and the Discovery of Temperature-Sensitive TRP Channels. *Temperature*, **2015**, *2*, 135–141.
- [156] Starkus, J.; Jansen, C.; Shimoda, L.M.N.; Stokes, A.J.; Small-Howard, A.L.; Turner, H. Diverse TRPV1 Responses to Cannabinoids. *Channels*, **2019**, *13*, 172–191.
- [157] Ross, R.A. Anandamide and Vanilloid TRPV1 Receptors: Anandamide and Vanilloid Receptors. *Br. J. Pharmacol.*, **2003**, *140*, 790–801.
- [158] Zygmunt, P.M.; Ermund, A.; Movahed, P.; Andersson, D.A.; Simonsen, C.; Jönsson, B.A.G.; Blomgren, A.; Birnir, B.; Bevan, S.; Eschalier, A.; Mallet, C.; Gomis, A.; Högestätt, E.D. Monoacylglycerols Activate TRPV1 – A Link between Phospholipase C and TRPV1. *PLoS ONE*, **2013**, *8*, e81618.
- [159] Yang, F.; Zheng, J. Understand Spiciness: Mechanism of TRPV1 Channel Activation by Capsaicin. *Protein Cell*, **2017**, *8*, 169–177.
- [160] Samanta, A.; Hughes, T.E.T.; Moiseenkova-Bell, V.Y. Transient Receptor Potential (TRP) Channels. In: *Membrane Protein Complexes: Structure and Function*; Harris, J.R.; Boekema, E.J., Eds.; Subcellular Biochemistry; Springer Singapore: Singapore, **2018**; Vol. 87, pp. 141–165.
- [161] Caterina, M.J.; Schumacher, M.A.; Tominaga, M.; Rosen, T.A.; Levine, J.D.; Julius, D. The Capsaicin Receptor: A Heat-Activated Ion Channel in the Pain Pathway. *Nature*, **1997**, *389*, 816–824.
- [162] Owsianik, G.; Talavera, K.; Voets, T.; Nilius, B. PERMEATION AND SELECTIVITY OF TRP CHANNELS. *Annu. Rev. Physiol.*, **2006**, *68*, 685–717.
- [163] Morgan, M.; Nencini, S.; Thai, J.; Ivanusic, J.J. TRPV1 Activation Alters the Function of Aδ and C Fiber Sensory Neurons That Innervate Bone. *Bone*, **2019**, *123*, 168–175.
- [164] Shuba, Y.M. Beyond Neuronal Heat Sensing: Diversity of TRPV1 Heat-Capsaicin Receptor-Channel Functions. *Front. Cell. Neurosci.*, **2021**, *14*, 612480.
- [165] Qin, N.; Neepser, M.P.; Liu, Y.; Hutchinson, T.L.; Lubin, M.L.; Flores, C.M. TRPV2 Is Activated by Cannabidiol and Mediates CGRP Release in Cultured Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. *J. Neurosci.*, **2008**, *28*, 6231–6238.

- [166] De Petrocellis, L.; Orlando, P.; Moriello, A.S.; Aviello, G.; Stott, C.; Izzo, A.A.; Di Marzo, V. Cannabinoid Actions at TRPV Channels: Effects on TRPV3 and TRPV4 and Their Potential Relevance to Gastrointestinal Inflammation: Plant Cannabinoids and TRPV Channels. *Acta Physiol.*, **2012**, *204*, 255–266.
- [167] Muller, C.; Morales, P.; Reggio, P.H. Cannabinoid Ligands Targeting TRP Channels. *Front. Mol. Neurosci.*, **2019**, *11*, 487.
- [168] Story, G.M.; Peier, A.M.; Reeve, A.J.; Eid, S.R.; Mosbacher, J.; Hricik, T.R.; Earley, T.J.; Hergarden, A.C.; Andersson, D.A.; Hwang, S.W.; McIntyre, P.; Jegla, T.; Bevan, S.; Patapoutian, A. ANKTM1, a TRP-like Channel Expressed in Nociceptive Neurons, Is Activated by Cold Temperatures. *Cell*, **2003**, *112*, 819–829.
- [169] Moran, M.M.; McAlexander, M.A.; Bíró, T.; Szallasi, A. Transient Receptor Potential Channels as Therapeutic Targets. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2011**, *10*, 601–620.
- [170] Bautista, D.M.; Siemens, J.; Glazer, J.M.; Tsuruda, P.R.; Basbaum, A.I.; Stucky, C.L.; Jordt, S.-E.; Julius, D. The Menthol Receptor TRPM8 Is the Principal Detector of Environmental Cold. *Nature*, **2007**, *448*, 204–208.
- [171] Xu, L.; Han, Y.; Chen, X.; Aierken, A.; Wen, H.; Zheng, W.; Wang, H.; Lu, X.; Zhao, Z.; Ma, C.; Liang, P.; Yang, W.; Yang, S.; Yang, F. Molecular Mechanisms Underlying Menthol Binding and Activation of TRPM8 Ion Channel. *Nat. Commun.*, **2020**, *11*, 3790.
- [172] Pertwee, R.G. The Pharmacology of Cannabinoid Receptors and Their Ligands: An Overview. *Int. J. Obes.*, **2006**, *30*, S13–S18.
- [173] Mechoulam, R.; Shani, A.; Edey, H.; Grunfeld, Y. Chemical Basis of Hashish Activity. *Science*, **1970**, *169*, 611–612.
- [174] Turner, S.E.; Williams, C.M.; Iversen, L.; Whalley, B.J. Molecular Pharmacology of Phytocannabinoids. In: *Phytocannabinoids*; Kinghorn, A.D.; Falk, H.; Gibbons, S.; Kobayashi, J., Eds.; Progress in the Chemistry of Organic Natural Products; Springer International Publishing: Cham, **2017**; Vol. 103, pp. 61–101.
- [175] Pertwee, R.G. The Diverse CB₁ and CB₂ Receptor Pharmacology of Three Plant Cannabinoids: Δ^9 -tetrahydrocannabinol, Cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabivarin. *Br. J. Pharmacol.*, **2008**, *153*, 199–215.
- [176] Ahmed, W.; Katz, S. Therapeutic Use of Cannabis in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol. Hepatol.*, **2016**, *12*, 668–679.
- [177] Fitzpatrick, J.-M.; Minogue, E.; Curham, L.; Tyrrell, H.; Gavigan, P.; Hind, W.; Downer, E.J. MyD88-Dependent and -Independent Signalling via TLR3 and TLR4 Are Differentially Modulated by Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol in Human Macrophages. *J. Neuroimmunol.*, **2020**, *343*, 577217.
- [178] Mechoulam, R.; Peters, M.; Murillo-Rodriguez, E.; Hanuš, L.O. Cannabidiol – Recent Advances. *Chem. Biodivers.*, **2007**, *4*, 1678–1692.
- [179] Peng, J.; Fan, M.; An, C.; Ni, F.; Huang, W.; Luo, J. A Narrative Review of Molecular Mechanism and Therapeutic Effect of Cannabidiol (CBD). *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **2022**, *130*, 439–456.
- [180] Izzo, A.A.; Borrelli, F.; Capasso, R.; Di Marzo, V.; Mechoulam, R. Non-Psychotropic Plant Cannabinoids: New Therapeutic Opportunities from an Ancient Herb. *Trends Pharmacol. Sci.*, **2009**, *30*, 515–527.
- [181] Burstein, S.H. The Cannabinoid Acids. *Pharmacol. Ther.*, **1999**, *82*, 87–96.
- [182] Walsh, K.B.; McKinney, A.E.; Holmes, A.E. Minor Cannabinoids: Biosynthesis, Molecular Pharmacology and Potential Therapeutic Uses. *Front. Pharmacol.*, **2021**, *12*, 777804.
- [183] Henshaw, F.R.; Dewsbury, L.S.; Lim, C.K.; Steiner, G.Z. The Effects of Cannabinoids on Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines: A Systematic Review of *In Vivo* Studies. *Cannabis Cannabinoid Res.*, **2021**, *6*, 177–195.
- [184] Husni, A.S.; McCurdy, C.R.; Radwan, M.M.; Ahmed, S.A.; Slade, D.; Ross, S.A.; ElSohly, M.A.; Cutler, S.J. Evaluation of Phytocannabinoids from High Potency Cannabis Sativa Using *In Vitro* Bioassays to Determine Structure-Activity Relationships for Cannabinoid

- Receptor 1 and Cannabinoid Receptor 2. *Med. Chem. Res. Int. J. Rapid Commun. Des. Mech. Action Biol. Act. Agents*, **2014**, *23*, 4295–4300.
- [185] Navarro, G.; Varani, K.; Lillo, A.; Vincenzi, F.; Rivas-Santisteban, R.; Raïch, I.; Reyes-Resina, I.; Ferreiro-Vera, C.; Borea, P.A.; Sánchez de Medina, V.; Nadal, X.; Franco, R. Pharmacological Data of Cannabidiol- and Cannabigerol-Type Phytocannabinoids Acting on Cannabinoid CB1, CB2 and CB1/CB2 Heteromer Receptors. *Pharmacol. Res.*, **2020**, *159*, 104940.
- [186] Sugamura, K.; Sugiyama, S.; Nozaki, T.; Matsuzawa, Y.; Izumiya, Y.; Miyata, K.; Nakayama, M.; Kaikita, K.; Obata, T.; Takeya, M.; Ogawa, H. Activated Endocannabinoid System in Coronary Artery Disease and Antiinflammatory Effects of Cannabinoid 1 Receptor Blockade on Macrophages. *Circulation*, **2009**, *119*, 28–36.
- [187] Pacher, P.; Haskó, G. Endocannabinoids and Cannabinoid Receptors in Ischaemia–Reperfusion Injury and Preconditioning. *Br. J. Pharmacol.*, **2008**, *153*, 252–262.
- [188] Defer, N.; Wan, J.; Souktani, R.; Escoubet, B.; Perier, M.; Caramelle, P.; Manin, S.; Deveaux, V.; Bourin, M.-C.; Zimmer, A.; Lotersztajn, S.; Pecker, F.; Pavoine, C. The Cannabinoid Receptor Type 2 Promotes Cardiac Myocyte and Fibroblast Survival and Protects against Ischemia/Reperfusion-induced Cardiomyopathy. *FASEB J.*, **2009**, *23*, 2120–2130.
- [189] Steffens, S.; Veillard, N.R.; Arnaud, C.; Pelli, G.; Burger, F.; Staub, C.; Zimmer, A.; Frossard, J.-L.; Mach, F. Low Dose Oral Cannabinoid Therapy Reduces Progression of Atherosclerosis in Mice. *Nature*, **2005**, *434*, 782–786.
- [190] Dol-Gleizes, F.; Paumelle, R.; Visentin, V.; Marés, A.-M.; Desitter, P.; Hennuyer, N.; Gilde, A.; Staels, B.; Schaeffer, P.; Bono, F. Rimonabant, a Selective Cannabinoid CB1 Receptor Antagonist, Inhibits Atherosclerosis in LDL Receptor–Deficient Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **2009**, *29*, 12–18.
- [191] Han, K.H.; Lim, S.; Ryu, J.; Lee, C.-W.; Kim, Y.; Kang, J.-H.; Kang, S.-S.; Ahn, Y.K.; Park, C.-S.; Kim, J.J. CB1 and CB2 Cannabinoid Receptors Differentially Regulate the Production of Reactive Oxygen Species by Macrophages. *Cardiovasc. Res.*, **2009**, *84*, 378–386.
- [192] Rajesh, M.; Mukhopadhyay, P.; Haskó, G.; Liaudet, L.; Mackie, K.; Pacher, P. Cannabinoid-1 Receptor Activation Induces Reactive Oxygen Species-dependent and -independent Mitogen-activated Protein Kinase Activation and Cell Death in Human Coronary Artery Endothelial Cells. *Br. J. Pharmacol.*, **2010**, *160*, 688–700.
- [193] Gavva, N.R.; Tamir, R.; Qu, Y.; Klionsky, L.; Zhang, T.J.; Immke, D.; Wang, J.; Zhu, D.; Vanderah, T.W.; Porreca, F.; Doherty, E.M.; Norman, M.H.; Wild, K.D.; Bannon, A.W.; Louis, J.-C.; Treanor, J.J.S. AMG 9810 [(*E*)-3-(4-*t*-Butylphenyl)-*N*-(2,3-Dihydrobenzo[*b*][1,4]Dioxin-6-yl)Acrylamide], a Novel Vanilloid Receptor 1 (TRPV1) Antagonist with Antihyperalgesic Properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2005**, *313*, 474–484.
- [194] Ma, L.; Zhong, J.; Zhao, Z.; Luo, Z.; Ma, S.; Sun, J.; He, H.; Zhu, T.; Liu, D.; Zhu, Z.; Tepel, M. Activation of TRPV1 Reduces Vascular Lipid Accumulation and Attenuates Atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.*, **2011**, *92*, 504–513.
- [195] Li, B.-H.; Yin, Y.-W.; Liu, Y.; Pi, Y.; Guo, L.; Cao, X.-J.; Gao, C.-Y.; Zhang, L.-L.; Li, J.-C. TRPV1 Activation Impedes Foam Cell Formation by Inducing Autophagy in oxLDL-Treated Vascular Smooth Muscle Cells. *Cell Death Dis.*, **2014**, *5*, e1182–e1182.
- [196] Anil, S.M.; Peeri, H.; Koltai, H. Medical Cannabis Activity Against Inflammation: Active Compounds and Modes of Action. *Front. Pharmacol.*, **2022**, *13*, 908198.
- [197] Dziemitko, S.; Harasim-Symbor, E.; Chabowski, A. How Do Phytocannabinoids Affect Cardiovascular Health? An Update on the Most Common Cardiovascular Diseases. *Ther. Adv. Chronic Dis.*, **2023**, *14*, 204062232211432.
- [198] Happyana, N.; Kayser, O. Monitoring Metabolite Profiles of Cannabis Sativa L. Trichomes during Flowering Period Using 1H NMR-Based Metabolomics and Real-Time PCR. *Planta Med.*, **2016**, *82*, 1217–1223.

- [199] *Cannabis Inflorescence: Cannabis Spp.; Standards of Identity, Analysis, and Quality Control*; Upton, R.; ElSohly, M., Eds.; American Herbal Pharmacopoeia and therapeutic compendium; Revision 2014.; American Herbal Pharmacopoeia: Scotts Valley, CA, **2014**.
- [200] Chapman, M.J.; Goldstein, S.; Lagrange, D.; Laplaud, P.M. A Density Gradient Ultracentrifugal Procedure for the Isolation of the Major Lipoprotein Classes from Human Serum. *J. Lipid Res.*, **1981**, *22*, 339–358.
- [201] Chung, B.H.; Segrest, J.P.; Ray, M.J.; Brunzell, J.D.; Hokanson, J.E.; Krauss, R.M.; Beaudrie, K.; Cone, J.T. Single Vertical Spin Density Gradient Ultracentrifugation. *Methods Enzymol.*, **1986**, *128*, 181–209.
- [202] Jonas, A.; Phillips, M.C. CHAPTER 17 - Lipoprotein Structure. In: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (Fifth Edition)*; Vance, D.E.; Vance, J.E., Eds.; Elsevier: San Diego, **2008**; pp. 485–506.
- [203] Byun, J.; Mueller, D.M.; Fabjan, J.S.; Heinecke, J.W. Nitrogen Dioxide Radical Generated by the Myeloperoxidase-Hydrogen Peroxide-Nitrite System Promotes Lipid Peroxidation of Low Density Lipoprotein. *FEBS Lett.*, **1999**, *455*, 243–246.
- [204] Pinchuk, I.; Lichtenberg, D. Continuous Monitoring of Intermediates and Final Products of Oxidation of Low Density Lipoprotein by Means of UV-Spectroscopy. *Free Radic. Res.*, **1996**, *24*, 351–360.
- [205] Lowhalidanon, K.; Khunkaewla, P. Discrimination between Minimally Modified LDL and Fully Oxidized LDL Using Monoclonal Antibodies. *Anal. Biochem.*, **2021**, *619*, 114103.
- [206] Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal. Biochem.*, **1979**, *95*, 351–358.
- [207] Halliwell, B.; Whiteman, M. Measuring Reactive Species and Oxidative Damage *in Vivo* and in Cell Culture: How Should You Do It and What Do the Results Mean? *Br. J. Pharmacol.*, **2004**, *142*, 231–255.
- [208] Stephan, Z.F.; Yurachek, E.C. Rapid Fluorometric Assay of LDL Receptor Activity by Dil-Labeled LDL. *J. Lipid Res.*, **1993**, *34*, 325–330.
- [209] Muller, P.Y.; Milton, M.N. The Determination and Interpretation of the Therapeutic Index in Drug Development. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2012**, *11*, 751–761.
- [210] Laemmli, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, **1970**, *227*, 680–685.
- [211] Renart, J.; Reiser, J.; Stark, G.R. Transfer of Proteins from Gels to Diazobenzoyloxymethyl-Paper and Detection with Antisera: A Method for Studying Antibody Specificity and Antigen Structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1979**, *76*, 3116–3120.
- [212] Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1979**, *76*, 4350–4354.
- [213] Miranda, K.M.; Espey, M.G.; Wink, D.A. A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **2001**, *5*, 62–71.
- [214] Griess Diazotization. In: *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*; John Wiley & Sons, Ltd, **2010**; pp. 1267–1270.
- [215] Choi, Y.H.; Hazekamp, A.; Peltenburg-Looman, A.M.G.; Frédérich, M.; Erkelens, C.; Lefeber, A.W.M.; Verpoorte, R. NMR Assignments of the Major Cannabinoids and Cannabiflavonoids Isolated from Flowers of *Cannabis Sativa*. *Phytochem. Anal. PCA*, **2004**, *15*, 345–354.
- [216] Verhoeckx, K.C.M.; Korthout, H.A.A.J.; van Meeteren-Kreikamp, A.P.; Ehlert, K.A.; Wang, M.; van der Greef, J.; Rodenburg, R.J.T.; Witkamp, R.F. Unheated *Cannabis Sativa* Extracts and Its Major Compound THC-Acid Have Potential Immuno-Modulating Properties Not Mediated by CB1 and CB2 Receptor Coupled Pathways. *Int. Immunopharmacol.*, **2006**, *6*, 656–665.
- [217] Ingallina, C.; Sobolev, A.; Circi, S.; Spano, M.; Frascchetti, C.; Filippi, A.; Di Sotto, A.; Di Giacomo, S.; Mazzocanti, G.; Gasparrini, F.; Quaglio, D.; Campiglia, E.; Carradori, S.;

- Locatelli, M.; Vinci, G.; Rapa, M.; Ciano, S.; Giusti, A.; Botta, B.; Ghirga, F.; Capitani, D.; Mannina, L. Cannabis Sativa L. Inflorescences From Monoecious Cultivars Grown in Central Italy: An Untargeted Chemical Characterization From Early Flowering to Ripening. *Mol. Basel Switz.*, **2020**, *25*.
- [218] Yoshida, H.; Quehenberger, O.; Kondratenko, N.; Green, S.; Steinberg, D. Minimally Oxidized Low-Density Lipoprotein Increases Expression of Scavenger Receptor A, CD36, and Macrosialin in Resident Mouse Peritoneal Macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **1998**, *18*, 794–802.
- [219] Gómez-Icazbalceta, G.; Ruiz-Rivera, M.B.; Lamoyi, E.; Huerta, L. FRET in the Analysis of In Vitro Cell-Cell Fusion by Flow Cytometry. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, **2015**, *1313*, 217–227.
- [220] Kumar, P.; Nagarajan, A.; Uchil, P.D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb. Protoc.*, **2018**, *2018*.
- [221] Lauckner, J.E.; Jensen, J.B.; Chen, H.-Y.; Lu, H.-C.; Hille, B.; Mackie, K. GPR55 Is a Cannabinoid Receptor That Increases Intracellular Calcium and Inhibits M Current. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2008**, *105*, 2699–2704.
- [222] Muller, C.; Morales, P.; Reggio, P.H. Cannabinoid Ligands Targeting TRP Channels. *Front. Mol. Neurosci.*, **2019**, *11*, 487.
- [223] Hoosdally, S.J.; Andress, E.J.; Wooding, C.; Martin, C.A.; Linton, K.J. The Human Scavenger Receptor CD36. *J. Biol. Chem.*, **2009**, *284*, 16277–16288.
- [224] Nagarkatti, P.; Pandey, R.; Rieder, S.A.; Hegde, V.L.; Nagarkatti, M. Cannabinoids as Novel Anti-Inflammatory Drugs. *Future Med. Chem.*, **2009**, *1*, 1333–1349.
- [225] Lee, B.H.; Hwang, D.M.; Palaniyar, N.; Grinstein, S.; Philpott, D.J.; Hu, J. Activation of P2X(7) Receptor by ATP Plays an Important Role in Regulating Inflammatory Responses during Acute Viral Infection. *PLoS One*, **2012**, *7*, e35812.
- [226] Li, Y.-H.; Yan, Z.-Q.; Brauner, A.; Tullus, K. Activation of Macrophage Nuclear Factor- κ B and Induction of Inducible Nitric Oxide Synthase by LPS. *Respir. Res.*, **2002**, *3*, 16.
- [227] Christian, F.; Smith, E.; Carmody, R. The Regulation of NF- κ B Subunits by Phosphorylation. *Cells*, **2016**, *5*, 12.
- [228] Poznyak, A.V.; Nikiforov, N.G.; Markin, A.M.; Kashirskikh, D.A.; Myasoedova, V.A.; Gerasimova, E.V.; Orekhov, A.N. Overview of OxLDL and Its Impact on Cardiovascular Health: Focus on Atherosclerosis. *Front. Pharmacol.*, **2021**, *11*, 2248.
- [229] Hampson, A.J.; Grimaldi, M.; Axelrod, J.; Wink, D. Cannabidiol and (-)Delta9-Tetrahydrocannabinol Are Neuroprotective Antioxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1998**, *95*, 8268–8273.
- [230] Atalay, S.; Jarocka-Karpowicz, I.; Skrzydlewska, E. Antioxidative and Anti-Inflammatory Properties of Cannabidiol. *Antioxidants*, **2019**, *9*, 21.
- [231] Rovira, C. Study of Ligand-Protein Interactions by Means of Density Functional Theory and First-Principles Molecular Dynamics. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, **2005**, *305*, 517–554.
- [232] Borges, R.; Batista, J.; Viana, R.; Baetas, A.; Orestes, E.; Andrade, M.; Honório, K.; da Silva, A. Understanding the Molecular Aspects of Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol as Antioxidants. *Molecules*, **2013**, *18*, 12663–12674.
- [233] Stephen, S.L.; Freestone, K.; Dunn, S.; Twigg, M.W.; Homer-Vanniasinkam, S.; Walker, J.H.; Wheatcroft, S.B.; Ponnambalam, S. Scavenger Receptors and Their Potential as Therapeutic Targets in the Treatment of Cardiovascular Disease. *Int. J. Hypertens.*, **2010**, *2010*, 646929.
- [234] De Petrocellis, L.; Ligresti, A.; Moriello, A.S.; Allarà, M.; Bisogno, T.; Petrosino, S.; Stott, C.G.; Di Marzo, V. Effects of Cannabinoids and Cannabinoid-Enriched Cannabis Extracts on TRP Channels and Endocannabinoid Metabolic Enzymes. *Br. J. Pharmacol.*, **2011**, *163*, 1479–1494.

- [235] Seccia, T.M.; Rigato, M.; Ravarotto, V.; Calò, L.A. ROCK (RhoA/Rho Kinase) in Cardiovascular-Renal Pathophysiology: A Review of New Advancements. *J. Clin. Med.*, **2020**, *9*, 1328.
- [236] Goswami, R.; Merth, M.; Sharma, S.; Alharbi, M.O.; Aranda-Espinoza, H.; Zhu, X.; Rahaman, S.O. TRPV4 Calcium-Permeable Channel Is a Novel Regulator of Oxidized LDL-Induced Macrophage Foam Cell Formation. *Free Radic. Biol. Med.*, **2017**, *110*, 142–150.
- [237] De Petrocellis, L.; Orlando, P.; Moriello, A.S.; Aviello, G.; Stott, C.; Izzo, A.A.; Di Marzo, V. Cannabinoid Actions at TRPV Channels: Effects on TRPV3 and TRPV4 and Their Potential Relevance to Gastrointestinal Inflammation. *Acta Physiol.*, **2012**, *204*, 255–266.
- [238] Rahaman, S.O.; Lennon, D.J.; Febbraio, M.; Podrez, E.A.; Hazen, S.L.; Silverstein, R.L. A CD36-Dependent Signaling Cascade Is Necessary for Macrophage Foam Cell Formation. *Cell Metab.*, **2006**, *4*, 211–221.
- [239] Rahaman, S.O.; Zhou, G.; Silverstein, R.L. Vav Protein Guanine Nucleotide Exchange Factor Regulates CD36 Protein-Mediated Macrophage Foam Cell Formation via Calcium and Dynamin-Dependent Processes. *J. Biol. Chem.*, **2011**, *286*, 36011–36019.
- [240] Kzhyshkowska, J.; Neyen, C.; Gordon, S. Role of Macrophage Scavenger Receptors in Atherosclerosis. *Immunobiology*, **2012**, *217*, 492–502.
- [241] Glass, C.K.; Witztum, J.L. Atherosclerosis. the Road Ahead. *Cell*, **2001**, *104*, 503–516.
- [242] Deng, T.; Yu, L.; Ge, Y.; Zhang, L.; Zheng, X. Intracellular-Free Calcium Dynamics and F-Actin Alteration in the Formation of Macrophage Foam Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2005**, *338*, 748–756.
- [243] Rezende, L.; Couto, N.F.D.; Fernandes-Braga, W.; Epshtein, Y.; Alvarez-Leite, J.I.; Levitan, I.; Andrade, L.D.O. OxLDL Induces Membrane Structure Rearrangement Leading to Biomechanics Alteration and Migration Deficiency in Macrophage. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, **2022**, *1864*, 183951.
- [244] Mietus-Snyder, M.; Frieria, A.; Glass, C.K.; Pitas, R.E. Regulation of Scavenger Receptor Expression in Smooth Muscle Cells by Protein Kinase C. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **1997**, *17*, 969–978.
- [245] Mineo, C. Lipoprotein Receptor Signalling in Atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.*, **2020**, *116*, 1254–1274.
- [246] Ganesan, R.; Henkels, K.M.; Wrenshall, L.E.; Kanaho, Y.; Di Paolo, G.; Frohman, M.A.; Gomez-Cambronero, J. Oxidized LDL Phagocytosis during Foam Cell Formation in Atherosclerotic Plaques Relies on a PLD2-CD36 Functional Interdependence. *J. Leukoc. Biol.*, **2018**, *103*, 867–883.
- [247] Wu, X.; Singla, S.; Liu, J.J.; Hong, L. The Role of Macrophage Ion Channels in the Progression of Atherosclerosis. *Front. Immunol.*, **2023**, *14*, 1225178.
- [248] Libby, P.; Ridker, P.M.; Maseri, A. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation*, **2002**, *105*, 1135–1143.
- [249] Geovanini, G.R.; Libby, P. Atherosclerosis and Inflammation: Overview and Updates. *Clin. Sci.*, **2018**, *132*, 1243–1252.
- [250] Shi, T.; Liu, K.; Peng, Y.; Dai, W.; Du, D.; Li, X.; Liu, T.; Song, N.; Meng, Y. Research Progress on the Therapeutic Effects of Nanoparticles Loaded with Drugs against Atherosclerosis. *Cardiovasc. Drugs Ther.*, **2023**.
- [251] Bäck, M.; Yurdagul, A.; Tabas, I.; Öörni, K.; Kovanen, P.T. Inflammation and Its Resolution in Atherosclerosis: Mediators and Therapeutic Opportunities. *Nat. Rev. Cardiol.*, **2019**, *16*, 389–406.
- [252] Panikashvili, D.; Mechoulam, R.; Beni, S.M.; Alexandrovich, A.; Shohami, E. CB1 Cannabinoid Receptors Are Involved in Neuroprotection via NF-Kappa B Inhibition. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.*, **2005**, *25*, 477–484.
- [253] Ali, A.M.; El-Tawil, O.S.; Al-Mokaddem, A.K.; Abd El-Rahman, S.S. Promoted Inhibition of TLR4/miR-155/ NFkB P65 Signaling by Cannabinoid Receptor 2 Agonist (AM1241), Aborts

- Inflammation and Progress of Hepatic Fibrosis Induced by Thioacetamide. *Chem. Biol. Interact.*, **2021**, 336, 109398.
- [254] Kozela, E.; Pietr, M.; Juknat, A.; Rimmerman, N.; Levy, R.; Vogel, Z. Cannabinoids Delta(9)-Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol Differentially Inhibit the Lipopolysaccharide-Activated NF-kappaB and Interferon-Beta/STAT Proinflammatory Pathways in BV-2 Microglial Cells. *J. Biol. Chem.*, **2010**, 285, 1616–1626.
- [255] Caterina, M.J.; Leffler, A.; Malmberg, A.B.; Martin, W.J.; Trafton, J.; Petersen-Zeit, K.R.; Koltzenburg, M.; Basbaum, A.I.; Julius, D. Impaired Nociception and Pain Sensation in Mice Lacking the Capsaicin Receptor. *Science*, **2000**, 288, 306–313.
- [256] Christoph, T.; Grünweller, A.; Mika, J.; Schäfer, M.K.-H.; Wade, E.J.; Weihe, E.; Erdmann, V.A.; Frank, R.; Gillen, C.; Kurreck, J. Silencing of Vanilloid Receptor TRPV1 by RNAi Reduces Neuropathic and Visceral Pain in Vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2006**, 350, 238–243.
- [257] Christoph, T.; Gillen, C.; Mika, J.; Grünweller, A.; Schäfer, M.K.-H.; Schiene, K.; Frank, R.; Jostock, R.; Bahrenberg, G.; Weihe, E.; Erdmann, V.A.; Kurreck, J. Antinociceptive Effect of Antisense Oligonucleotides against the Vanilloid Receptor VR1/TRPV1. *Neurochem. Int.*, **2007**, 50, 281–290.
- [258] Costa, B.; Giagnoni, G.; Franke, C.; Trovato, A.E.; Colleoni, M. Vanilloid TRPV1 Receptor Mediates the Antihyperalgesic Effect of the Nonpsychoactive Cannabinoid, Cannabidiol, in a Rat Model of Acute Inflammation. *Br. J. Pharmacol.*, **2004**, 143, 247–250.
- [259] Wardyn, J.D.; Ponsford, A.H.; Sanderson, C.M. Dissecting Molecular Cross-Talk between Nrf2 and NF-κB Response Pathways. *Biochem. Soc. Trans.*, **2015**, 43, 621–626.
- [260] Dinkova-Kostova, A.T.; Fahey, J.W.; Kostov, R.V.; Kensler, T.W. KEAP1 and Done? Targeting the NRF2 Pathway with Sulforaphane. *Trends Food Sci. Technol.*, **2017**, 69, 257–269.
- [261] Casares, L.; García, V.; Garrido-Rodríguez, M.; Millán, E.; Collado, J.A.; García-Martín, A.; Peñarando, J.; Calzado, M.A.; De La Vega, L.; Muñoz, E. Cannabidiol Induces Antioxidant Pathways in Keratinocytes by Targeting BACH1. *Redox Biol.*, **2020**, 28, 101321.
- [262] Lin, W.; Wu, R.T.; Wu, T.; Khor, T.-O.; Wang, H.; Kong, A.-N. Sulforaphane Suppressed LPS-Induced Inflammation in Mouse Peritoneal Macrophages through Nrf2 Dependent Pathway. *Biochem. Pharmacol.*, **2008**, 76, 967–973.
- [263] Wang, L.; He, C. Nrf2-Mediated Anti-Inflammatory Polarization of Macrophages as Therapeutic Targets for Osteoarthritis. *Front. Immunol.*, **2022**, 13, 967193.
- [264] Soares, M.P.; Seldon, M.P.; Gregoire, I.P.; Vassilevskaia, T.; Berberat, P.O.; Yu, J.; Tsui, T.-Y.; Bach, F.H. Heme Oxygenase-1 Modulates the Expression of Adhesion Molecules Associated with Endothelial Cell Activation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, **2004**, 172, 3553–3563.