



**INSTITUTO LATINOAMERICANO DE CIENCIAS DE LA
VIDA Y LA NATURALEZA (ILACVN)**

BIOTECNOLOGÍA

**ANÁLISIS DEL EFECTO *IN VITRO* DE EXTRACTOS DE CANNABINOIDES EN
FIBROBLASTOS MRC-5**

BRUNO JAVIER ZEPEDA ROJAS

Foz do Iguaçu
2023



**INSTITUTO LATINOAMERICANO DE CIENCIAS DE LA
VIDA Y LA NATURALEZA (ILACVN)**

BIOTECNOLOGÍA

**ANÁLISIS DEL EFECTO *IN VITRO* DE EXTRACTOS DE CANNABINOIDES EN
FIBROBLASTOS MRC-5**

BRUNO JAVIER ZEPEDA ROJAS

Trabajo de Conclusión de Curso presentado al Instituto Latinoamericano de Ciencias de la Vida y de la Naturaleza de la Universidad Federal de Integración Latinoamericana, como requisito parcial para obtener el título de Licenciado en Biotecnología.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luis María Ruiz

Foz do Iguaçu
2023

BRUNO JAVIER ZEPEDA ROJAS

**ANÁLISIS DEL EFECTO *IN VITRO* DE EXTRACTOS DE CANNABINOIDES EN
FIBROBLASTOS MRC-5**

Trabajo de Conclusión de Curso presentado al Instituto Latinoamericano de Ciencias de la Vida y de la Naturaleza de la Universidad Federal de Integración Latinoamericana, como requisito parcial para obtener el título de Licenciado en Biotecnología.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luis Maria Ruiz
UNILA

Prof. Dr. Francisney Pinto do Nascimento
UNILA

Prof. Dr. Kelvinson Fernandes Viana
UNILA

Foz do Iguaçu, 15 de junio de 2023

TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Bruno Javier Zepeda Rojas

Curso: Biotecnologia

	Tipo de Documento
<input checked="" type="checkbox"/> graduação	<input type="checkbox"/> artigo
<input type="checkbox"/> especialização	<input checked="" type="checkbox"/> trabalho de conclusão de curso
<input type="checkbox"/> mestrado	<input type="checkbox"/> monografia
<input type="checkbox"/> doutorado	<input type="checkbox"/> dissertação
	<input type="checkbox"/> tese
	<input type="checkbox"/> CD/DVD – obras audiovisuais
	<input type="checkbox"/> _____

Título do trabalho acadêmico: *Análisis del Efecto in vitro* de Extractos de Cannabinoides en Fibroblastos MRC-5

Nome do orientador(a): Prof. Dr. Jorge Luis Maria Ruiz

Data da Defesa: 15/06/2023

Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):

a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino-Americana – BIUNILA a disponibilizar a obra, gratuitamente e de acordo com a licença pública *Creative Commons Licença 3.0 Unported*.

Foz do Iguaçu, 15 de junho de 2023.

Assinatura do Responsável

Dedico este trabajo a mis padres.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis padres, Karla y Carlos, por el apoyo y confianza brindados a lo largo de toda la vida y, en especial, en los últimos cinco años. Agradezco a mis hermanas, Ariadna y Akane, por estar cerca a pesar de la distancia; siempre ayudándome a recordar de dónde vengo, aspecto imprescindible para saber hacia dónde voy. Gracias al resto de mi familia por siempre estar pendientes de mí a pesar del tiempo lejos de ellos.

Le agradezco al profesor Dr. Jorge Luis María Ruíz por todo el apoyo y guía brindados en el proceso entero de la realización de este proyecto. Su experiencia y paciencia en el ámbito de la investigación con células fueron clave para poder concluir el trabajo.

Agradezco a la Universidade Federal da Integração Latino-Americana, por haberme dado la oportunidad de recibir una educación superior de calidad, gratuita y completa. La idea detrás de tan increíble iniciativa, detrás de esta institución, es algo que se debería implementar más alrededor de América Latina y el mundo.

Le doy gracias a todos los profesores que fueron parte de mi formación académica en el curso de Biotecnología, sus enseñanzas han sido fundamentales para mi crecimiento como profesional. Gracias al profesor Dr. Francisney Pinto do Nascimento por facilitar los extractos usados en el estudio; promoviendo la investigación científica del creciente campo del cannabis.

Un especial agradecimiento a la familia de casa, Mateo, Jonathan y Grecia; esta familia que uno escoge es tan importante como la de sangre y ha probado ser indispensable en el día a día. Agradezco de forma igual de especial a mi novia Yoselin por siempre estar a mi lado, por apoyarme y motivarme a seguir cuando uno necesita un pequeño empujón.

Finalmente, pero no menos importante, quiero agradecer a mi papá y a mi abuelita, Cristina, por haberme enseñado a aprender de ciencia desde muy temprana edad, por haberme motivado a investigar, a ser curioso y a perseguir las respuestas de lo que uno desconoce.

ZEPEDA ROJAS, Bruno Javier. **ANÁLISIS DEL EFECTO *IN VITRO* DE EXTRACTOS DE CANNABINOIDES EN FIBROBLASTOS MRC-5**. 2023. 52 páginas. Trabajo de Conclusión de Curso (Graduación en Biotecnología) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2023.

RESUMEN

La cicatrización es uno de los procesos de reparación más importantes del cuerpo, pues permite que el organismo se cure de lesiones que podrían volverse perjudiciales para la integridad del individuo. Los fibroblastos son células esenciales en el proceso de cicatrización debido a su rol en la síntesis de fibras de colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular. Existe un creciente interés en el desarrollo de nuevas terapias que puedan auxiliar en la curación de heridas, pues algunos tratamientos convencionales generan efectos secundarios indeseados o no poseen gran efectividad. La planta *Cannabis sativa* es una de las más estudiadas actualmente, gracias a su gran variedad de propiedades medicinales. Se ha comprobado que los cannabinoides, moléculas producidas por la planta, poseen un alto potencial para inducir diversos efectos en las células del cuerpo humano; esto debido a la presencia del sistema endocannabinoide en tejidos a lo largo del organismo. El efecto de estos compuestos en fibroblastos ha sido poco estudiado, por lo que en el presente trabajo se analizó el efecto *in vitro* de un extracto de THC/CBD en fibroblastos MRC-5. Para esto, se llevó a cabo un ensayo de citotoxicidad con MTT, se elaboró una curva de crecimiento celular y un ensayo de migración. Los resultados del estudio revelaron que el extracto no presenta toxicidad en las células, factor importante para su utilización en el desarrollo de terapias. A pesar de que, estadísticamente, no se encontraron diferencias significativas en la tasa de proliferación celular cuando tratadas con el extracto, en todos los experimentos realizados los fibroblastos presentaron tendencia a una mayor proliferación. Estos descubrimientos son promisorios, pues abren las puertas a posteriores investigaciones donde se pueda comprobar de manera más completa dicho efecto en las células; abriendo el camino de posibles nuevas terapias para el tratamiento de heridas.

Palabras llave: Fibroblasto; MRC-5; *Cannabis sativa*; THC; CBD.

ZEPEDA ROJAS, Bruno Javier. **ANÁLISE DO EFEITO *IN VITRO* DE EXTRATOS DE CANABINÓIDES EM FIBROBLASTOS MRC-5**. 2023. 52 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2023.

RESUMO

A cicatrização é um dos processos de reparação mais importantes do corpo, pois permite que o organismo se cure de lesões que poderiam se tornar prejudiciais para a integridade do indivíduo. Os fibroblastos são células essenciais no processo de cicatrização devido ao seu papel na síntese de fibras de colágeno e outras proteínas da matriz extracelular. Há um interesse crescente no desenvolvimento de novas terapias que possam auxiliar na cicatrização de feridas, uma vez que alguns tratamentos convencionais geram efeitos colaterais indesejados ou têm pouca eficácia. A planta *Cannabis sativa* é uma das mais estudadas atualmente, graças à sua grande variedade de propriedades medicinais. Foi comprovado que os canabinóides, moléculas produzidas pela planta, possuem um alto potencial para induzir diversos efeitos nas células do corpo humano, devido à presença do sistema endocanabinóide em tecidos ao longo do organismo. O efeito desses compostos em fibroblastos têm sido pouco estudado, portanto, neste trabalho, foi analisado o efeito *in vitro* de um extrato de THC/CBD em fibroblastos MRC-5. Para isso, foi realizado um ensaio de citotoxicidade com MTT, foi elaborada uma curva de crescimento celular e um ensaio de migração. Os resultados do estudo revelaram que o extrato não apresenta toxicidade nas células, fator importante para sua utilização no desenvolvimento de terapias. Embora estatisticamente não tenham sido encontradas diferenças significativas na taxa de proliferação celular quando tratadas com o extrato, em todos os experimentos realizados, os fibroblastos apresentaram tendência a uma maior proliferação. Essas descobertas são promissoras, pois abrem as portas para pesquisas posteriores, nas quais possa ser comprovado de forma mais abrangente esse efeito nas células, abrindo caminho para possíveis novas terapias para o tratamento de feridas.

Palavras chave: Fibroblasto; MRC-5; *Cannabis sativa*; THC; CBD.

ZEPEDA ROJAS, Bruno Javier. **ANALYSIS OF THE *IN VITRO* EFFECT OF CANNABINOID EXTRACTS IN MRC-5 FIBROBLASTS**. 2023. 52 pages. Course Completion Project (Bachelor in Biotechnology) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2023.

ABSTRACT

Wound healing and scarring are some of the most important repair processes in the body, as they allow the body to heal from injuries that could otherwise become detrimental to the individual's integrity. Fibroblasts are essential cells in the healing process due to their role in the synthesis of collagen fibers and other extracellular matrix proteins. There is a growing interest in the development of new therapies that can assist in wound healing, since some conventional treatments may lead to unwanted side effects or are not very effective. The *Cannabis sativa* plant is currently one of the most researched ones, thanks to its wide variety of medicinal properties. It has been proven that cannabinoids, molecules produced by the plant, have a high potential to induce various effects in the human body; mainly due to the presence of the endocannabinoid system in several tissues throughout the body. The effect of these compounds on fibroblasts has been little studied, so in this work we analyzed the *in vitro* effect of a THC/CBD extract on MRC-5 fibroblasts. For this, an MTT cytotoxicity assay was carried out, along with a cell growth curve and a migration assay. The results of the study revealed that the extract does not show cell toxicity, an important factor for its use in the development of therapies. Despite the fact that, statistically, no significant differences were found in the cell proliferation rate when treated with the extract, fibroblasts showed a tendency to increase proliferation in all of the experiments that were carried out. These discoveries are promising, since they open the doors for further research where this effect on the cells can be more fully verified; opening the way for possible new therapies for wound treatment.

Key words: Fibroblast; MRC-5, *Cannabis sativa*; THC; CBD.

LISTA DE ILUSTRACIONES

Figura 1 - Esquema de la estructura general de los fitocannabinoides.....	18
Figura 2 - Estructura molecular del THC.....	19
Figura 3 - Estructura molecular del CBD.....	20
Figura 4 - Extracto de THC/CBD 0,5 mg/ml.....	27
Figura 5 - Cultivo de fibroblastos MRC-5 en frasco de poliestireno de 75 cm ²	28
Figura 6 - Placa de 96 pozos después del ensayo de MTT.....	31
Figura 7 - Análisis de la viabilidad celular por ensayo de MTT en fibroblastos MRC-5 al ser tratados con distintas concentraciones de extracto de THC/CBD.....	33
Figura 8 - Curvas de crecimiento de fibroblastos MRC-5 sin tratamiento (azul) y al ser tratados con el extracto de THC/CBD en concentración de 0,01 mg/ml (verde).....	35
Figura 9 - Fotografías de las células control (sin tratamiento) en el ensayo de migración celular. 24h.....	36
Figura 10 - Fotografías de las células tratadas con THC/CBD a 0,01 mg/ml, en el ensayo de migración celular. 24h.....	36
Figura 11 - Fotografías de las células tratadas con THC/CBD a 0,005 mg/ml, en el ensayo de migración celular. 24h.....	37
Figura 12 - Fotografías de las células control (sin tratamiento) en el ensayo de migración celular. 48h.....	37
Figura 13 - Fotografías de las células tratadas con THC/CBD a 0,01 mg/ml, en el ensayo de migración celular. 48h.....	38
Figura 14 - Fotografías de las células tratadas con THC/CBD a 0,005 mg/ml, en el ensayo de migración celular. 48h.....	38
Figura 15 - Promedio de los porcentajes de reducción del área de la cicatriz. Control (sin tratamiento), C1 (THC/CBD 0,01 mg/ml) y C2 (THC/CBD 0,005 mg/ml).....	40

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1** - Valores de viabilidad celular (%) después del ensayo de MTT.....32
- Tabla 2** - Número de células/ml en cada pozo de control, cada 24 horas, durante 4 días...34
- Tabla 3** - Número de células/ml en cada pozo tratado con THC/CBD en concentración de 0,01 mg/ml, cada 24 horas, durante 4 días.....34
- Tabla 4** - Datos de reducción del área de la cicatriz en el ensayo de migración celular. C1 corresponde a THC/CBD a 0,01 mg/ml; C2 corresponde a THC/CBD a 0,005 mg/ml.....39

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

2-AG	2-Araquidonoilglicerol
AEA	Anandamida
CAFs	Cancer associated fibroblasts (fibroblastos asociados a cáncer)
cAMP	Cyclic adenosine triphosphate (trifosfato de adenosina cíclico)
CBD	Cannabidiol
DAPI	4'-6-diamino-2-fenilindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
FGF	Fibroblast growth factor (factor de crecimiento de fibroblastos)
GAGs	Glicosaminoglicanos
GPCR	G-Protein coupled receptors (receptores asociados a proteína G)
IC ₅₀	Concentración Inhibitoria Media
MAPKs	Mitogen activated protein kinases (Proteínas quinasas activadas por mitógenos)
MEC	Matriz extracelular
MRC-5	Cepa celular #5 del Consejo de Investigación Médica del Reino Unido
MTT	Ensayo de brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio
PBS	Phosphate-buffered saline (Tampón fosfato salino)
RER	Retículo endoplasmático rugoso
SFB	Suero fetal bovino
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirido
TGF- β	Transforming growth factor-beta
THC	Δ -9-tetrahidrocannabinol
TRP	Transient receptor potential channels (canales de potencial transitorio)

SUMARIO

1. Introducción	13
2. Marco Teórico	16
2.1 Cannabis y el Humano: Una Breve Historia	16
2.2 Cannabinoides: Aspectos Moleculares	17
2.3 Sistema Endocannabinoide	20
2.4 Fibroblastos	21
2.5 Fibroblastos en la Cicatrización	22
2.6 Trastornos en la Cicatrización	22
2.7 Cannabinoides y Fibroblastos	23
3. Justificativa	25
4. Objetivos	26
4.1 Objetivo General	26
4.2 Objetivos Específicos	26
5. Metodología	27
5.1 Extracto de THC/CBD	27
5.2 Cultivo de Células	27
5.3 Ensayo de Citotoxicidad	28
5.4 Curva de Crecimiento	29
5.5 Ensayo de Migración Celular	29
5.6 Análisis Estadísticos	30
6. Resultados	31
6.1 Ensayo de Citotoxicidad	31
6.2 Curva de Crecimiento	33
6.3 Ensayo de Migración Celular	35
7. Discusión	41
8. Conclusión	45
Referencias	46

1. Introducción

La piel es uno de los órganos más importantes encontrados en el cuerpo humano, ya que al cubrirlo en básicamente toda su extensión, crea una barrera física entre el interior del organismo y el ambiente que lo rodea (PROKSCH *et al.*, 2008). Conformada por tres capas llamadas epidermis, dermis e hipodermis (de gran variación tanto en estructura como en función), la piel está compuesta de una compleja red que sirve como la primera línea de defensa del cuerpo contra patógenos, la luz UV, diversas formas de ataques físicos, abrasiones químicas, así como también evita la pérdida desregulada de agua y solutos (YOUSEF *et al.*, 2021).

Por su exposición permanente al ambiente externo, la piel no es ninguna extraña a heridas y diversos tipos de lesiones. Sin embargo, el organismo tiene mecanismos para ayudar a curar y regenerar partes del cuerpo que hayan sufrido daños: un proceso complejo conocido como cicatrización, que involucra una compleja interacción entre numerosos tipos de células, citocinas, mediadores y el sistema vascular (WALLACE *et al.*, 2023).

En casos de heridas en la piel, el sangrado se detiene gracias a las plaquetas; estas liberan moléculas de señalización para atraer a los fibroblastos al frente. Los fibroblastos son los principales participantes en el sellado y cicatrizado de la herida, pues son las células encargadas de producir colágeno, proteínas especializadas en funcionar como andamios de construcción para la reparación del tejido (OZGOK *et al.*, 2022).

Aunque ha evolucionado para ser un mecanismo muy efectivo, el proceso de reparación de heridas del organismo está lejos de ser perfecto y libre de errores. Debido a particularidades de cada individuo, tales como factores genéticos, estilo de vida (abuso de tabaco, estrés, obesidad, desnutrición), lesiones debido a accidentes y enfermedades crónicas, el sistema de reparación de heridas puede verse perturbado y llevar a una cicatrización excesiva o a la incapacidad de curar completamente la herida; ambos casos considerados como problemas serios para el paciente (WERNICK *et al.*, 2022; WILKINSON *et al.*, 2020).

Proveer al paciente con tratamientos adecuados para la curación de estas lesiones y reducir el impacto estético que conlleva es una de las principales preocupaciones en la atención clínica (TÉOT *et al.*, 2020). En 2018, se estimó que el tamaño del mercado global de tratamiento de heridas pasaba de los USD 18,4 mil millones y se espera que este crezca en un 3,9%, de manera anual, hasta el 2026 (SEN *et al.*, 2019), demostrando la gran necesidad mundial del desarrollo de terapias eficaces para este problema.

A lo largo de la historia, el reino vegetal ha probado ser una valiosa fuente de una amplia gama de compuestos utilizados en la fabricación de drogas, al punto de considerar el uso de plantas con fines terapéuticos como los orígenes de la medicina moderna (SALMERÓN-MANZANO *et al.*, 2020). La planta de *Cannabis sativa* L. es una especie que se ha utilizado por sus propiedades medicinales desde épocas antiguas y que, en la era moderna, desde el descubrimiento del sistema endocannabinoide, ha despertado el interés de los científicos debido a su gran variedad de formas de interactuar con el cuerpo humano (RUSSO, 2007).

Se ha comprobado que los cannabinoides encontrados en mayores concentraciones en la planta de cannabis, el THC y el CBD, son capaces de crear diversas respuestas fisiológicas en el cuerpo humano al interactuar con los receptores endocannabinoides CB1 y CB2 (CHANDA *et al.*, 2019).

Así como muchas células y tejidos del cuerpo, los fibroblastos presentan receptores endocannabinoides en su membrana celular (RÍO *et al.*, 2018). En estudios previos, se demostró que el mecanismo de cicatrización del cuerpo puede estar altamente regulado por el sistema endocannabinoide y que sus componentes, como los fibroblastos, responden de manera diversa al ser tratados con cannabinoides sintéticos (GARCÍA-GONZÁLEZ *et al.*, 2009; CORREIA-SÁ *et al.*, 2020).

Debido al alto potencial que tiene la planta de cannabis y sus compuestos para desencadenar algún efecto en la mayoría de las células del cuerpo humano, explorar su efecto en fibroblastos puede ser clave para el desarrollo de nuevas terapias relacionadas a la cicatrización.

Hasta la fecha, no existen muchos estudios que analicen el efecto del THC y el CBD en fibroblastos, por lo que el presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto *in vitro* de estos compuestos en el modelo de línea celular de fibroblastos MRC-5.

2. Marco Teórico

2.1 Cannabis y el Humano: Una Breve Historia

Desde tiempos inmemoriales, la planta de cannabis (popularmente conocida como marihuana) ha caminado al lado del ser humano alrededor del mundo. Debido a sus múltiples usos y propiedades, la planta ha sido indispensable en diferentes aspectos del desarrollo humano, quien hizo uso de sus flores y hojas en el campo de la medicina y de las fibras de sus tallos para textiles, papel, cuerdas, ropa y, más recientemente, biocombustibles. Las fibras para dichos usos se obtienen de una clase botánica distinta de la planta de cannabis, mejor conocida como cáñamo (JOHNSON, 2019).

Se estima que la planta de *Cannabis sativa* L. fue uno de los primeros vegetales en ser cultivados, habiendo registros genéticos y arqueológicos que indican que se domesticó hace 12,000 años en Asia del Este durante el período Neolítico (REN *et al.*, 2019). La evidencia escrita más antigua del uso del cannabis se remonta a la antigua Grecia, donde el historiador Herodotus hace referencia a la inhalación del humo de cannabis en su libro de 440 a.e.c, *Historias* (BUTRICA, 2002).

Aunque hay debates sobre si la *Cannabis sativa* L. puede considerarse como una especie que en algún momento sucedió de forma natural antes de su domesticación por el humano, vale la pena mencionar que, con el tiempo, sí comenzó a encontrarse en la naturaleza. En el siglo XIX, Hooker observó cannabis silvestre en las cercanías del sudoeste de los Himalayas y Vavilov registró observaciones de la planta en Asia Central, el noreste de la India, Afganistán, Tayikistán y Uzbekistán (RUSSO, 2007).

Alrededor del año 1230, los pueblos Persas llevaron el cannabis a las civilizaciones árabes del oeste y, según registros, un siglo antes el cannabis fue introducido a Egipto por parte de “místicos viajeros Islámicos” (ROBERT *et al.*, 2013). A lo largo de los siguientes siglos, el cannabis se esparció por todo el continente Africano, existiendo evidencia química de su uso en pipas encontradas en Etiopía y Sudáfrica que datan del siglo XIV (RUBIN, 1975). Se estima que en los años 1500 los españoles introdujeron el cáñamo industrial en Chile, mientras que en Estados Unidos se convirtió en un cultivo esencial para las primeras colonias durante los 1600 (BOOTH, 2015).

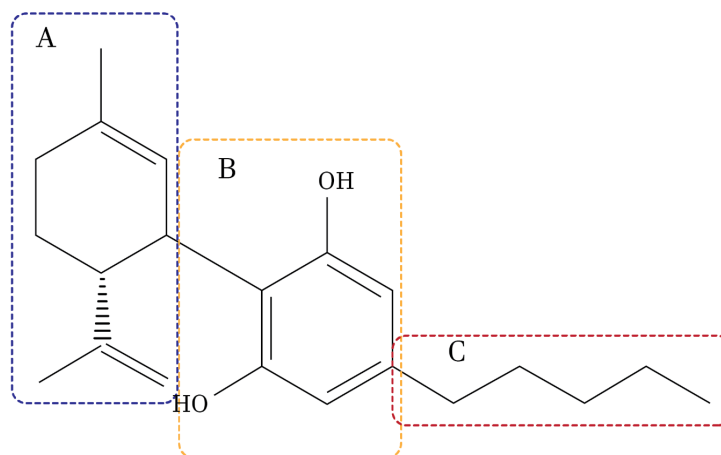
De manera general, tanto en la antigüedad como en la era moderna, el cannabis ha despertado interés en el campo de la medicina por su potencial en el tratamiento de distintos síntomas y condiciones de salud importantes como lo son el dolor crónico, espasticidad, cáncer, trastornos convulsivos, náuseas, anorexia y enfermedades infecciosas (RUSSO, 2007). Con el descubrimiento de los cannabinoides y el sistema endocannabinoide en el siglo XX, los científicos comenzaron a explorar y desarrollar nuevos fármacos y terapias a base de la planta y sus extractos, con resultados interesantes en el tratamiento de esclerosis múltiple, la caquexia causada por el SIDA, epilepsia, artritis reumatoide y glaucoma (MURNION, 2015).

Sin embargo, mucha de la investigación científica enfocada en el cannabis como medicina ha sido afectada considerablemente por restricciones de producción y el hecho de que la planta es considerada ilegal por muchos gobiernos alrededor del mundo. Dichas medidas se implementaron desde que, a mediados del siglo pasado, investigaciones financiadas por el gobierno de los Estados Unidos y realizadas a base de interés político, comenzarán a esparcir desinformación sobre las verdaderas propiedades de la planta, lo que llevó al gobierno a declarar al cannabis, erróneamente, como un compuesto con alto riesgo de adicción y sin ningún uso médico en su Acta de Sustancias Controladas (RELEASE THE STRAINS, 2015). Aunque hoy en día distintos países han revisado y modificado sus legislaciones para liberar el uso del cannabis, tanto medicinal como recreativo, aún hace falta mucho para que la investigación científica pueda avanzar sin dificultades, se desmitifique el preconceito que las generaciones pasadas han desarrollado por años de exposición a desinformación y se explote el potencial de la planta en nuestra sociedad.

2.2 Cannabinoides: Aspectos Moleculares

Comúnmente hablando, se entiende que los cannabinoides son compuestos terpenofenólicos producidos por la *Cannabis sativa* L.; sin embargo, existen diferentes tipos que ocurren de forma natural: desde los fitocannabinoides encontrados en la planta, hasta los endocannabinoides que ocurren en el organismo humano, como la anandamida y el 2-AG. De forma general, estas moléculas se pueden definir químicamente como monoterpenoides que contienen un núcleo resorcinol, comúnmente acompañado de un grupo isoprenil y una cadena lateral conteniendo un grupo alquilo (**Figura 1**) (HANUS *et al.*, 2016). Todos los tipos de cannabinoides se caracterizan por ser capaces de interactuar con el sistema endocannabinoide encontrado en humanos y otros animales, aún cuando el cannabinoide en cuestión no sea endógeno del cuerpo.

Figura 1 - Esquema de la estructura general de los fitocannabinoides.



Nota: (A) Grupo isoprenil, (B) núcleo resorcinol y (C) cadena lateral con un grupo alquilo. Fuente: Del autor.

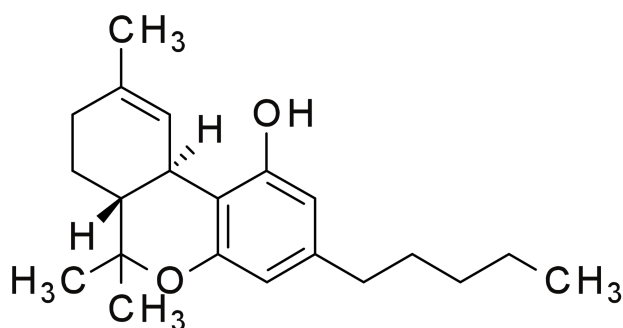
Los primeros cannabinoides aislados y estudiados fueron obtenidos de la planta de *Cannabis sativa* L. y, con el tiempo, se fueron descubriendo fitocannabinoides en diversas especies de angiospermas, algunos musgos e incluso en determinados hongos (GULCK *et al.*, 2020). Solamente en la planta de cannabis se han identificado por lo menos 113 cannabinoides, todos acumulados junto con terpenos en tricomas glandulares localizados en todas las zonas aéreas de la planta (FLORES-SÁNCHEZ *et al.*, 2008). Dichos fitocannabinoides son clasificados en distintas clases dependiendo de su ruta biosintética: cannabigeroles (CBGs), cannabicromenos (CBCs), cannabidiol (CBD), delta-9-tetrahidrocannabinol (Δ -9-THC), delta-8-tetrahidrocannabinol (Δ -8-THC), cannabiciol (CBL), cannabielsoin (CBE), cannabinol (CBN), cannabinodiol (CBND), cannabitriol (CBT), entre otros (ELSOHLY, 2005; FILIPIUC *et al.*, 2021).

Hasta ahora, los cannabinoides más estudiados y de mayor interés médico y comercial son el THC y el CBD, principalmente por ser los que se encuentran en mayores concentraciones en la *Cannabis sativa* L. Como muchos metabolitos secundarios encontrados en plantas que presentan actividad farmacológica, el THC es un compuesto liposoluble, del que

se asume es producido en la planta como una adaptación evolutiva para protegerse contra insectos, la luz UV y el estrés externo (PATE, 1983; PATE, 1994).

El THC (**Figura 2**) es el principal responsable del efecto psicoactivo de la planta de marihuana, causando efectos tales como euforia, sedación, incremento del apetito, función cognitiva alterada, analgesia, ansiedad, entre otros (BANISTER *et al.*, 2019). Al ser consumida, la molécula actúa como un agonista parcial en los receptores cannabinoides CB1 y CB2 (mimetizando la acción de los endocannabinoides AEA y 2-AG) (MECHOULAM, 2014) y se cree que el efecto psicoactivo se genera principalmente por la acción del THC en el primer receptor. Al ser una molécula lipofílica, el THC también puede interactuar de forma no específica con una gran gama de células en el cerebro y cuerpo, a través de distintos receptores, como los canales de potencial transitorio (TRP) o los receptores de serotonina (5-HT), por ejemplo (HUESTIS, 2007; MULLER *et al.*, 2019). De manera general, es aceptado que la activación de los receptores CB1 vía THC y otros cannabinoides, ocasiona una reducción en las concentraciones de adenosina monofosfato cíclico (cAMP) debido a la inhibición de la adenilil ciclasa, lo que lleva a la fosforilación y consecuente activación de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y de otras quinasas de señalización intracelular, que ocasionan una respuesta por parte de la célula (KUBRUSLY *et al.*, 2018; GALVE-ROPERH *et al.*, 2002).

Figura 2 - Estructura molecular del THC

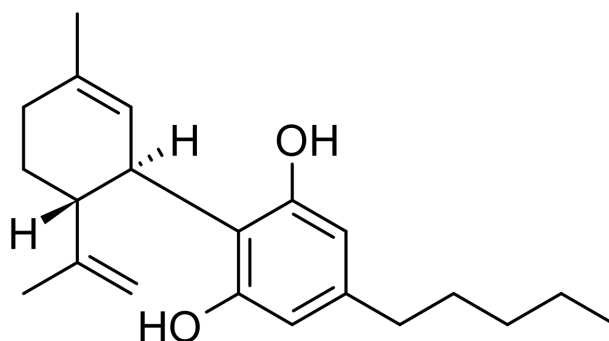


Fuente: THC Structure. (2023). Wikimedia Commons.

El otro cannabinoide encontrado en altas concentraciones en la planta de cannabis, el CBD (**Figura 3**), tiene efectos biológicos tan variados que desde hace años la molécula ha maravillado a los científicos y ha sido estudiada como posible fármaco porque presenta efectos contra la ansiedad, las náuseas y el dolor; además de poder actuar como agente antiinflamatorio y ser capaz de atenuar reacciones autoinmunes (MECHOULAM, 2014).

Aunque es muy similar estructuralmente al THC y se sabe que también actúa como un agonista parcial en los receptores CB1, CB2 y otros receptores acoplados a proteína G (GPCRs), hasta ahora no se ha podido definir claramente cuál es el mecanismo de acción del CBD. Asimismo, se ha demostrado que esta molécula tiene la capacidad de alterar la actividad del THC, como fue demostrado en 1980 en un experimento donde el CBD contrarió los efectos del THC en monos rhesus (MECHOULAM, 2014). Desde entonces, interacciones de este tipo entre ambas moléculas han incrementado la curiosidad de los investigadores sobre la posible sinergia de estos cannabinoides y cómo esta complementariedad se manifiesta en los efectos vistos en el organismo.

Figura 3 - Estructura molecular del CBD.



Fuente: CBD Structure (2023). Wikipedia.

2.3 Sistema Endocannabinoide

Debido a la naturaleza lipofílica de los cannabinoides, inicialmente se creía que actuaban en las células atravesando la membrana celular de manera no específica. Sin embargo, luego del descubrimiento del THC (y la aparición de varios cannabinoides sintetizados químicamente), se logró hacer un mapeamiento y caracterización farmacológica de los sitios de enlace de los cannabinoides en el cerebro, llevando al descubrimiento de los receptores CB y, en consecuencia, del sistema endocannabinoide (CHANDA *et al.*, 2019).

De forma general, se puede afirmar que este sistema cumple funciones de regulación y mediación de distintos procesos fisiológicos, a través de neurotransmisores endógenos conocidos como endocannabinoides. Entre los primeros endocannabinoides en ser identificados se destacan la anandamida (AEA) y el 2-AG, siendo este último el que se encuentra en mayores cantidades en el cerebro (REISENBERG *et al.*, 2012). En las décadas recientes, múltiples estudios en humanos y animales han respaldado que los endocannabinoides juegan un papel importante en la memoria, el estado de ánimo, la

regulación de rutas de dolor del cerebro y médula espinal, en sistemas cerebrales de recompensa y adicción a drogas, además de procesos metabólicos como lipólisis, metabolismos de glucosa y balance de energía (EZZILI *et al.*, 2010). Además, se ha identificado que en tejidos periféricos, los cannabinoides modulan rutas de transducción de señales y otras funciones relacionadas a la señalización celular, como la liberación de citocinas.

Los receptores del sistema endocannabinoide se encuentran distribuidos en grandes cantidades a lo largo de diversos tejidos en el cuerpo. El receptor CB1 es el receptor acoplado a proteína G (GPCR) más abundante en el sistema nervioso central de los mamíferos, encontrado en mayores cantidades en regiones del cerebelo, el córtex, el hipocampo y la ganglia basal; sin embargo, también se ha identificado en neuronas de tejidos periféricos del cuerpo, como en el corazón, el vas deferens, la vejiga urinaria y el intestino delgado (MACKIE, 2005). Por otro lado, el receptor CB2 está más presente en células del sistema inmune y en algunas de la glía cerebral (SIM-SELLEY, 2003).

En el caso de la piel, se ha demostrado que el tejido es naturalmente rico en receptores CB1 y CB2, ambos siendo identificados en queratinocitos, folículos pilosos, glándulas sebáceas, melanocitos, fibroblastos, fibras nerviosas y adipocitos (RÍO *et al.*, 2018). La abundancia de células cutáneas que presentan receptores cannabinoides, demuestra las múltiples funciones de señalización y regulación que juegan los cannabinoides en la piel. Aparte de los receptores CB, hay muchas estructuras en la piel que expresan receptores que son también estimulados por cannabinoides, siendo los canales de potencial transitorio (TRP) un buen ejemplo, ya que responden tanto a cannabinoides naturales como sintéticos (ATOYAN *et al.*, 2009). Sin embargo, a pesar de que la piel posee receptores CB1 y CB2 en relativa abundancia, su respuesta a la interacción con cannabinoides ha sido poco estudiada.

2.4 Fibroblastos

Los fibroblastos (denominados fibrocitos en su forma inactiva) son el tipo de célula más abundante del tejido conectivo en la mayoría de los animales. Viven aproximadamente 57 días y, en estado de homeostasis, tienen la función de sintetizar la matriz extracelular (MEC) y distintos tipos de fibras de colágeno (en particular las del tipo I, III y IV), lo que también les da el rol de generar el estroma del tejido (FIBROBLAST, 2014). Aunque en menores cantidades, son también productores de glicosaminoglicanos (GAGs), elastina y algunas glicoproteínas.

Los fibroblastos son morfológicamente heterogéneos, lo que los hace adoptar apariencias distintas dependiendo del local donde se encuentran y la actividad que llevan a cabo. De forma general, son células alargadas y planas, fusiformes, con un núcleo plano y ovalado, además de presentar numerosos prolongamientos citoplasmáticos. En su citoplasma, presentan una gran cantidad de retículo endoplasmático rugoso (RER), un complejo de Golgi altamente desarrollado y una membrana celular con abundantes pliegues, debido a la cantidad de exportaciones vesiculares que la célula suele tener (DICK *et al.*, 2022).

2.5 Fibroblastos en la Cicatrización

Debido a su capacidad de sintetizar colágeno, los fibroblastos juegan un rol esencial en el proceso de reparación y cicatrización de tejidos dañados. En caso de que un tejido sufra daños, los fibroblastos son inicialmente estimulados y llamados a la zona por macrófagos que producen diversos factores de crecimiento (FGF, TGF- β) y citocinas, donde luego proliferan y secretan colágeno. Durante las primeras fases de la reparación del tejido, la cantidad de fibroblastos es poca y se encuentran alejados unos de los otros, siendo sustentados por nuevos vasos sanguíneos que recién se forman en el local (complejo conocido como tejido de granulación). Conforme avanza el tiempo, la cantidad de fibroblastos es considerablemente mayor y, cuando el tejido ha sido reparado completamente, estos se van retirando y dejan una cicatriz colagenosa que continuará remodelándose y haciéndose más fuerte con el tiempo (KRAFTS, 2010).

Existen casos extremos en estados patológicos en los que los fibroblastos pueden generar mucha más matriz extracelular de la necesaria, lo que lleva a la deposición desregulada de colágeno y demás proteínas estructurales; afectando el funcionamiento normal de órganos y tejidos, o incluso ocasionando disfunción irreversible en los mismos.

2.6 Trastornos en la Cicatrización

Al ser un proceso complejo, existe el riesgo de que la cicatrización no suceda de manera correcta debido a factores variados. Hay dos maneras de clasificar los factores que alteran el proceso normal de cicatrización: los locales y los sistémicos. Los factores locales afectan directamente las características de la herida, buenos ejemplos serían la oxigenación o el desarrollo de infecciones; mientras que los factores sistémicos son aquellos causados por la salud o estado patológico del paciente, que alteran su capacidad de curar la herida de manera

normal, como por ejemplo, la edad, nutrición, estrés psicológico, padecimiento de enfermedades, etc (GUO *et al.*, 2010).

De manera general, las personas de edad avanzada (>60 años) están mayor riesgo de padecer de cicatrización lenta, pues presentan un retraso para dar inicio a las primeras fases de la cicatrización. Esto deja la herida más expuesta, incrementando el riesgo de infección y comprometiendo la calidad de curación de dicha lesión (KEYLOCK *et al.*, 2008).

Pacientes con enfermedades como la diabetes, sufren de heridas crónicas debido a una compleja combinación de factores vasculares, neuropáticos, inmunes y bioquímicos; en particular una inflamación constante, angiogénesis trastornada y desbalance en la deposición de MEC. Esto conduce a un deterioro en la calidad de vida de los pacientes, provocado por la carga que conlleva lidiar con el tratamiento constante de este tipo de heridas (SPAMPINATO *et al.*, 2020).

Trastornos en el proceso de curación de heridas no son exclusivamente por falta de cicatrización, si no que se puede dar un exceso de la misma también. La fibrosis es la acumulación de un exceso de componentes de MEC. En dados casos, los fibroblastos sintetizan estos compuestos en cantidades fuera de lo normal y, cuando se vuelve demasiado progresiva, la fibrosis puede ocasionar fallo en los órganos y la muerte (WYNN *et al.*, 2012).

Independientemente del tipo de alteración en el proceso de cicatrización o de la causa de la misma, una forma de controlar estos problemas es a través de la regulación de fibroblastos, los principales encargados de que este proceso sea completado con éxito (KENDALL *et al.*, 2014). Al ser células con expresión de receptores CB1 y CB2 y conociendo el rol del sistema endocannabinoide en la regulación de procesos fisiológicos a largo del cuerpo, se ha comenzado a explorar los estímulos que estos compuestos pueden desencadenar en los fibroblastos.

2.7 Cannabinoides y Fibroblastos

Aunque hay pocos estudios del efecto de fitocannabinoides en fibroblastos, algunos sugieren que, efectivamente, estas células responden a tratamientos con distintos tipos de cannabinoides. En un estudio utilizando fibroblastos dérmicos CCD-1064Sk saludables, se

demonstró que tanto el THC como el CBD incrementan la tasa de crecimiento celular (GERASYMCHUK *et al.*, 2022).

Investigaciones han demostrado que fibroblastos con comportamiento anormal en enfermedades fibróticas pueden responder a estímulos por cannabinoides, incluyendo algunos cannabinoides sintéticos. García-González *et al.* demostraron que fibroblastos aislados de pacientes con esclerosis sistémica difusa, expresan receptores CB1 y CB2 en grandes cantidades, lo que indica que el sistema endocannabinoide está relacionado de alguna forma en la regulación de patologías como esta. En la misma investigación, se demostró que estos fibroblastos presentaron una caída considerable en la deposición desregulada de matriz extracelular (reduciendo la síntesis de colágeno I) al ser tratados con el cannabinoide sintético WIN55,212-2, agonista de receptores CB1 y CB2 (GARCÍA-GONZÁLEZ *et al.*, 2009).

Haciendo uso del mismo cannabinoide sintético, Pietrovito *et al.* comprobaron que es posible reducir la activación y reactividad de fibroblastos asociados a cáncer (CAFs), al impedir la migración de dichas células, la expresión de α -actina y de metaloproteasa-2, características esenciales de este tipo de fibroblastos (PIETROVITO *et al.*, 2020).

En otra investigación, se encontró que las concentraciones de anandamida en la sangre de pacientes con cicatrización normal, era significativamente mayor que aquellas encontradas en pacientes que desarrollaron cicatrices hipertróficas; sugiriendo que este endocannabinoide desempeña funciones importantes en la correcta regulación de fibroblastos en la reparación de tejidos (CORREIA-SÁ *et al.*, 2020).

Siendo que el sistema endocannabinoide parece jugar un rol importante en la regulación de fibroblastos tanto saludables y con funcionamiento normal, como en aquellos que tienen sus funciones afectadas de alguna manera, resulta interesante investigar más los posibles efectos que puedan tener distintos cannabinoides en dichas células.

3. Justificativa

Los cannabinoides han probado ser moléculas con una amplia gama de aplicaciones, especialmente en el ámbito terapéutico, gracias a la extendida distribución del sistema endocannabinoide en el cuerpo y el importante rol que juega regulando diversos procesos fisiológicos. Se ha encontrado que, como en muchas otras células, los fibroblastos expresan receptores cannabinoides y son capaces de responder de alguna manera a estímulos por parte de estos compuestos; por lo que vale la pena investigar el efecto que pueden tener los fitocannabinoides encontrados en mayores cantidades en la planta de cannabis (THC y CBD) en dichas células. Dependiendo de los resultados, se pueden abrir las puertas de nuevas aplicaciones donde se requiera el estímulo de fibroblastos en procesos de cicatrización, o bien, en la inhibición de su actividad en estados patológicos de fibrosis.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

Analizar el efecto *in vitro* de extractos de cannabinoides (THC/CBD) en fibroblastos MRC-5.

4.2 Objetivos Específicos

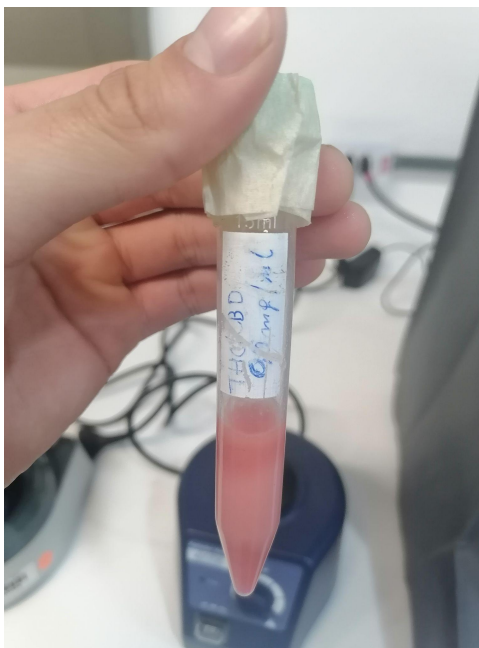
- Evaluar la actividad citotóxica de los tratamientos de cannabinoides en fibroblastos MRC-5
- Estudiar el efecto del extracto en la proliferación de fibroblastos MRC-5 elaborando una curva de crecimiento celular
- Determinar cambios en la motilidad celular de los fibroblastos MRC-5 a través de ensayos de migración celular

5. Metodología

5.1 Extracto de THC/CBD

Los extractos usados para la preparación de los tratamientos fueron proveídos por el Prof. Dr. Francisney Pinto do Nascimento, jefe del Laboratorio de Neurofarmacología Clínica de la Universidad Federal de Integración Latinoamericana. Los extractos son, originalmente, destinados para ser ingeridos de forma oral en tratamientos clínicos. El extracto de THC/CBD es de la empresa Abrace Esperança, encontrado en una concentración de 15 mg/mL tanto de THC como de CBD. Se utilizaron 5 mL del extracto y fueron diluídos en medio de cultivo DMEM hasta obtener una solución homogénea que fuera apta para aplicar de manera *in vitro* en los fibroblastos, quedando en una concentración aproximada de 0,5 mg/mL. El extracto es oleoso y tiende a formar burbujas de aceite al entrar en contacto con el medio de cultivo, lo que dificultó conseguir una dilución eficiente.

Figura 4 - Extracto de THC/CBD 0,5 mg/ml.



Fuente: Del autor.

5.2 Cultivo de Células

Fueron utilizados fibroblastos MRC-5 (ATCC-CCL-171), células con capacidad de adherirse a la superficie de cultivo y originalmente obtenidas de pulmones. Para la manutención y crecimiento de las células, fueron empleados frascos de poliestireno de 25 cm² y 75 cm² especializados para el cultivo celular, conteniendo medio DMEM, suplementado con 10% de

suero fetal bovino (SFB) y 1% penicilina/estreptomicina. Los recipientes se mantuvieron en la incubadora a 37°C y CO₂ al 5%.

Figura 5 - Cultivo de fibroblastos MRC-5 en frasco de poliestireno de 75 cm².

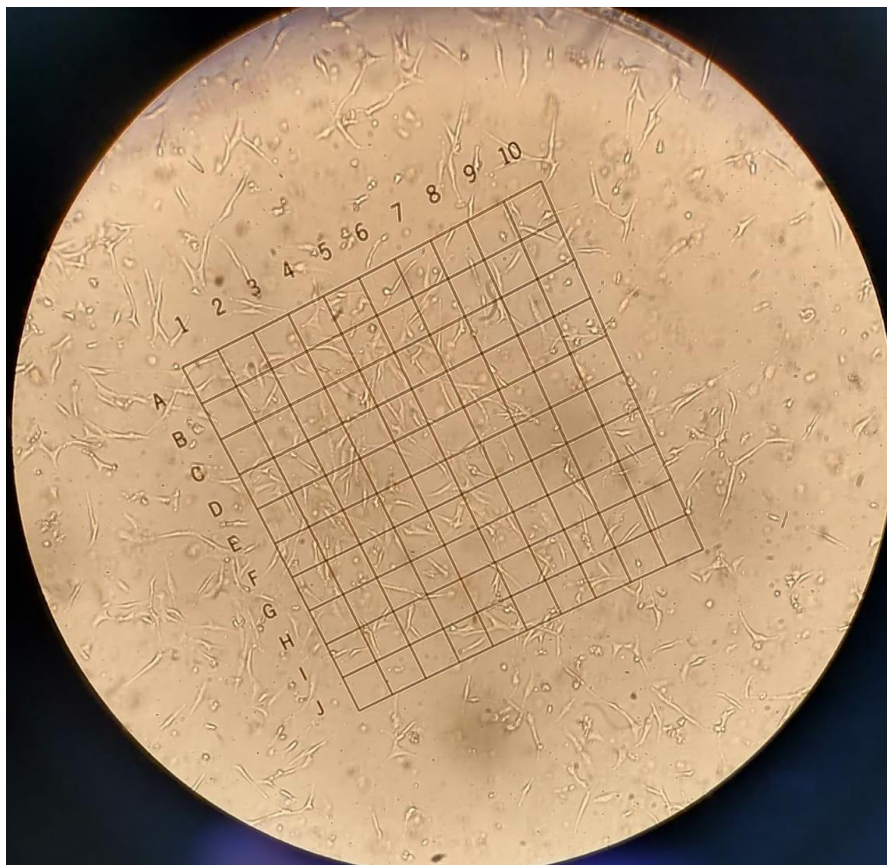


Imagen tomada con microscopio invertido. Fuente: Del autor.

5.3 Ensayo de Citotoxicidad

Para determinar la citotoxicidad del extracto de THC/CBD, fue realizado un ensayo de citotoxicidad celular colorimétrico usando brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Las células fueron cultivadas hasta alcanzar un 80% de confluencia. Posteriormente, se contabilizaron 1×10^4 células en 50 μ l de medio y fueron distribuidas en cada pozo de una placa de 96 pozos.

Las células se cultivaron a 37°C durante 12 horas para permitir la adhesión celular, y después se adicionaron 8 diluciones seriadas del compuesto en un volumen de 50 μ l. Las concentraciones aplicadas fueron: 0,1 mg/ml; 0,05 mg/ml; 0,01 mg/ml; 0,005 mg/ml; 0,001 mg/ml; 0,0005 mg/ml; 0,0001 mg/ml y 0,00005 mg/ml.

Después de 24 horas, se adicionaron 10 µl de solución MTT (5 mg/ml) en cada pozo y se incubaron por otras 4 horas a 37°C. Hecho esto, se retiró el medio y los cristales formados fueron diluidos con 100 µl de DMSO.

Los resultados se analizaron en espectrofotómetro, para determinar la absorbancia en longitud de onda de 492 nm y 630 nm. Los resultados serán expresados en porcentaje de viabilidad celular y analizados utilizando el programa *GraphPad Prism 6*.

5.4 Curva de Crecimiento

Los fibroblastos MRC-5, en concentración de 1×10^3 células, fueron cultivados en una placa de 24 pozos y suplementados con medio DMEM conteniendo SFB y penicilina/estreptomicina, a 37°C y CO₂ al 5%. Se le aplicó el extracto de THC/CBD en concentración de 0,01 mg/ml a la mitad de los pozos de la placa, dejando la otra mitad sin tratamiento para funcionar de control.

Pasadas 24 horas, se removió el medio de cultivo de la primera fila de pozos (tres pozos con el tratamiento y 3 de control), se realizó lavado con PBS y se procedió a la tripsinización de las células para su posterior conteo utilizando azul de tripano para la tinción de las células y la cámara de Neubauer para su visualización. Este procedimiento se repitió en las siguientes 3 filas de pozos de la placa pasadas 48, 72 y 96 horas desde el comienzo del experimento.

Tomando los datos del conteo se usó el programa *GraphPad Prism 6* para elaborar la curva de crecimiento de los fibroblastos MRC-5 al ser tratados con el extracto de THC/CBD en la concentración de 0,01 mg/ml, así como sin tratamiento.

5.5 Ensayo de Migración Celular

Los fibroblastos MRC-5, en concentración de $2,5 \times 10^5$ células, fueron cultivados en una placa de 12 pozos y suplementados con medio DMEM conteniendo SFB y penicilina/estreptomicina, a 37°C y CO₂ al 5%, haciendo cambio del medio cada dos días. Una vez que el cultivo alcanzó una confluencia del 90-95%, se utilizó una punta de pipeta plástica de 10 µl esterilizada para crear una cicatriz en la camada de células; luego cada pozo con cicatriz fue fotografiado utilizando microscopio invertido.

Una vez tomadas las fotos iniciales, se aplicó la solución de THC/CBD en la concentración de 0,01 mg/mL y 0,005 mg/mL, ambas en triplicata. Los cultivos se analizaron en intervalos de tiempo de 24h y 48h, para registrar la estimulación de las células por parte de los tratamientos investigados. Las fotografías fueron analizadas usando el software ImageJ.

5.6 Análisis Estadísticos

Para analizar la significancia estadística de los datos obtenidos a partir del ensayo de citotoxicidad usando MTT, se usarán el test de Bonferroni y el Análisis de varianza de una sola vía (ANOVA). El valor IC_{50} será determinado con ayuda del software *GraphPad Prism 6*.

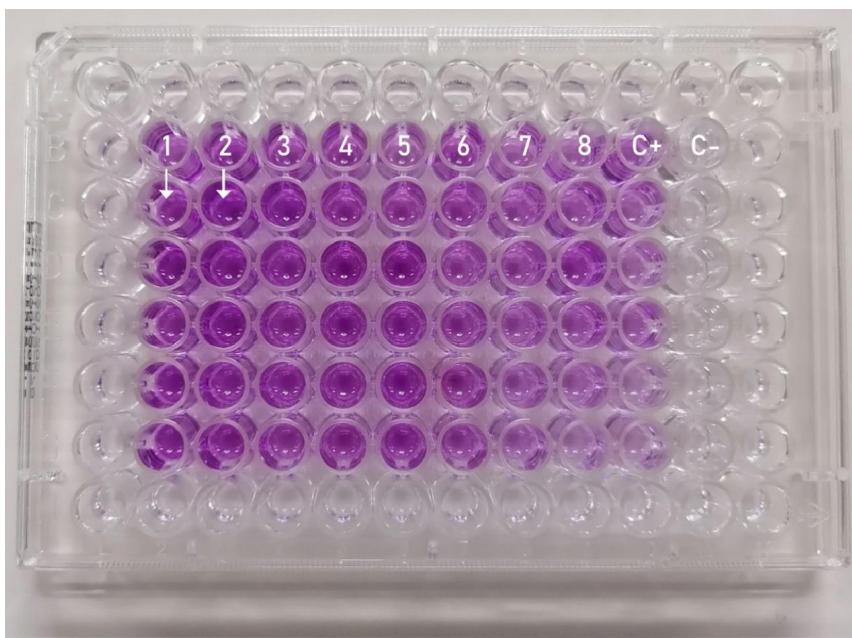
6. Resultados

6.1 Ensayo de Citotoxicidad

Para evaluar la citotoxicidad del extracto de THC/CBD en fibroblastos MRC-5, se realizó el ensayo MTT, que permitió cuantificar la viabilidad de las células en cada pozo luego de ser tratadas por 24 horas con las 8 concentraciones determinadas anteriormente.

En la **Figura 6**, puede observarse la placa de 96 pozos al final del ensayo. Las concentraciones se aplicaron, en sextuplicata, de forma decreciente, de izquierda a derecha. Las últimas dos columnas se utilizaron para la aplicación de los controles positivo y negativo. Es posible apreciar que, en los pozos donde fueron aplicadas las mayores concentraciones, hay una coloración más intensa y dicha intensidad se atenúa conforme las concentraciones bajan.

Figura 6 - Placa de 96 pozos después del ensayo de MTT.



Nota: Concentraciones del extracto de THC/CBD: (1) 0,1 mg/ml; (2) 0,05 mg/ml; (3) 0,01 mg/ml; (4) 0,005 mg/ml; (5) 0,001 mg/ml; (6) 0,0005 mg/ml; (7) 0,0001 mg/ml; (8) 0,00005 mg/ml. C+: células sin tratamiento; C-: células muertas. Fuente: Del autor.

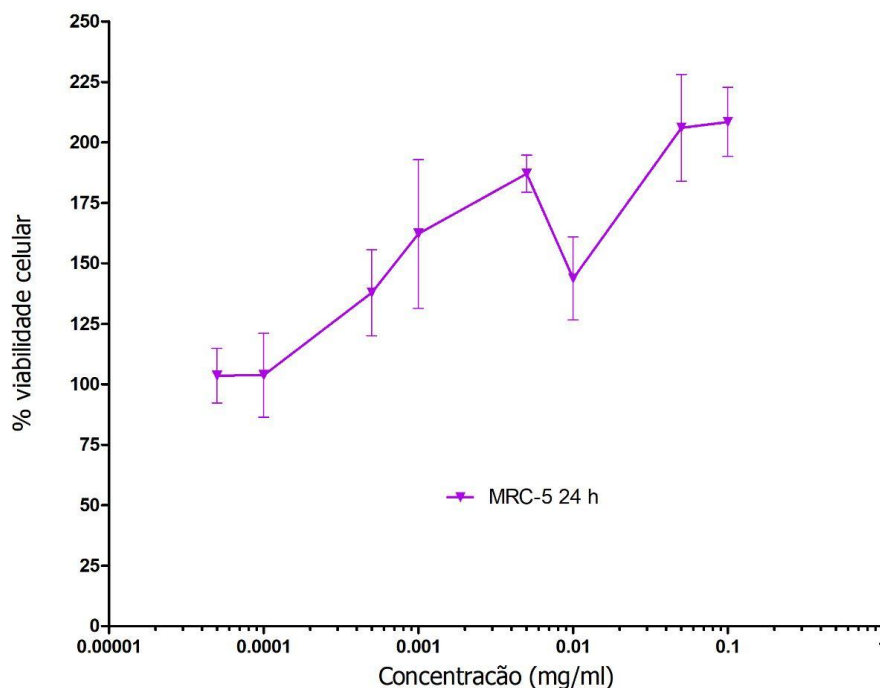
A partir de las absorbancias obtenidas al hacer la lectura en el espectrofotómetro, se obtuvieron los promedios de viabilidad celular de cada concentración y de los controles (**Tabla 1**).

Tabla 1 - Valores de viabilidad celular (%).

Concentración (mg/mL)	Promedio	Desvío Estándar
0,1	193,8	26,20
0,05	194,7	34,23
0,01	155,2	31,93
0,005	194,4	19,28
0,001	173,3	38,55
0,0005	147,2	27,78
0,0001	103,8	17,33
0,00005	105,1	32,55
Control (sin tratamiento)	100,0	34,18

Haciendo uso del programa *GraphPad Prism 6*, se obtuvo la curva de viabilidad celular en relación a las distintas concentraciones analizadas (**Figura 7**). En base al análisis estadístico, el extracto, en su mayor concentración, presentó una diferencia significativa en comparación a la menor concentración; mostrando que, conforme aumenta la concentración del extracto, se induce la proliferación de las células.

Figura 7 - Análisis de la viabilidad celular por ensayo de MTT en fibroblastos MRC-5 al ser tratados con distintas concentraciones de extracto de THC/CBD.



Nota: Cada punto representa el promedio \pm la desviación estándar.

Finalmente, al no existir una concentración que llevase a muerte celular, no fue posible determinar un valor de IC_{50} entre las concentraciones administradas. El extracto en cuestión, en las concentraciones utilizadas, no es tóxico para los fibroblastos MRC-5.

Al comprobar que el extracto no presenta toxicidad, se escogió la concentración de 0,01 mg/ml para continuar con los experimentos debido a que las dos concentraciones mayores presentaban una elevada cantidad de burbujas de aceite, lo que dificultaba considerablemente la correcta homogeneización del extracto en el medio de cultivo.

6.2 Curva de Crecimiento

Las células utilizadas para la elaboración de la curva de crecimiento fueron contadas cada 24 horas, por un período de cuatro días. Se calculó el promedio de la cantidad de células en los pozos de control, así como en los pozos que recibieron el tratamiento con el extracto de THC/CBD en la concentración de 0,01 mg/ml. La cantidad calculada de células/ml en cada pozo, así como los promedios y desviaciones estándar, pueden ser observados en las **Tablas 2 y 3**.

Tabla 2 - Número de células/ml en cada pozo de control, cada 24 horas, durante 4 días.

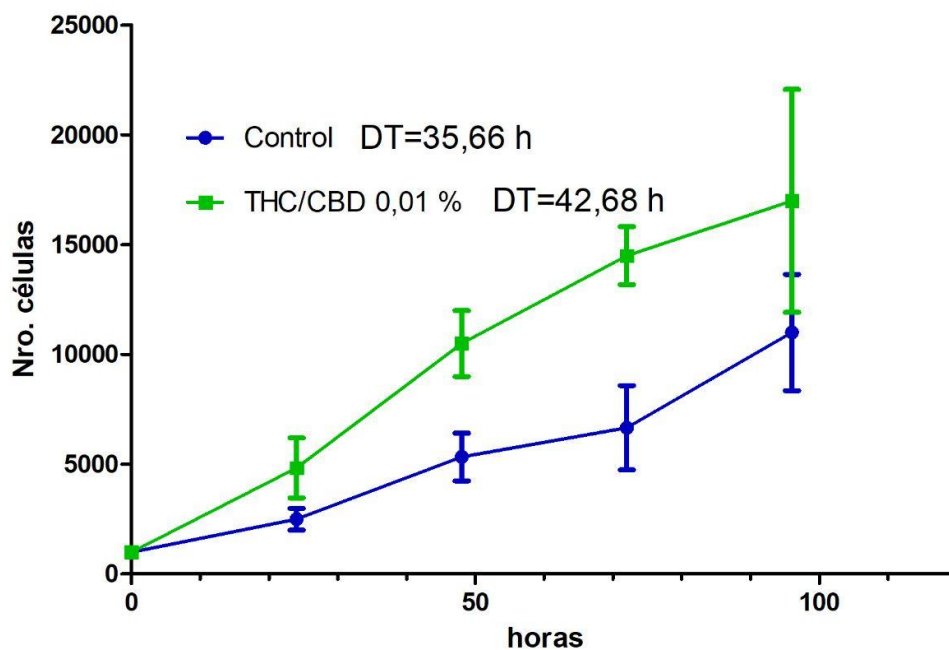
Tiempo (horas)	Control 1 (cél/ml)	Control 2 (cél/ml)	Control 3 (cél/ml)	Promedio	Desviación Estándar
0	1000	1000	1000	1000	0
24	1500	3000	3000	2500	866,03
48	4500	4000	7500	5333,33	1892,97
72	4500	5000	10500	6666,67	3329,16
96	12000	15000	6000	11000	4582,58

Tabla 3 - Número de células/ml en cada pozo tratado con THC/CBD en concentración de 0,01 mg/ml, cada 24 horas, durante 4 días.

Tiempo (horas)	THC/CBD (cél/ml)	THC/CBD (cél/ml)	THC/CBD (cél/ml)	Promedio	Desviación Estándar
0	1000	1000	1000	1000	0
24	3000	7500	4000	4833,33	2362,91
48	7500	12000	12000	10500	2598,08
72	12000	16500	15000	14500	2291,29
96	10500	27000	13500	17000	8789,20

Haciendo uso de estos datos, se obtuvo la gráfica de las curvas de crecimiento de los fibroblastos MRC-5 sin ningún tratamiento y al ser tratados con el extracto de THC/CBD (**Figura 8**).

Figura 8 - Curvas de crecimiento de fibroblastos MRC-5 sin tratamiento (azul) y al ser tratados con el extracto de THC/CBD en concentración de 0,01 mg/ml (verde).



Nota: Cada punto representa el promedio \pm la desviación estándar.

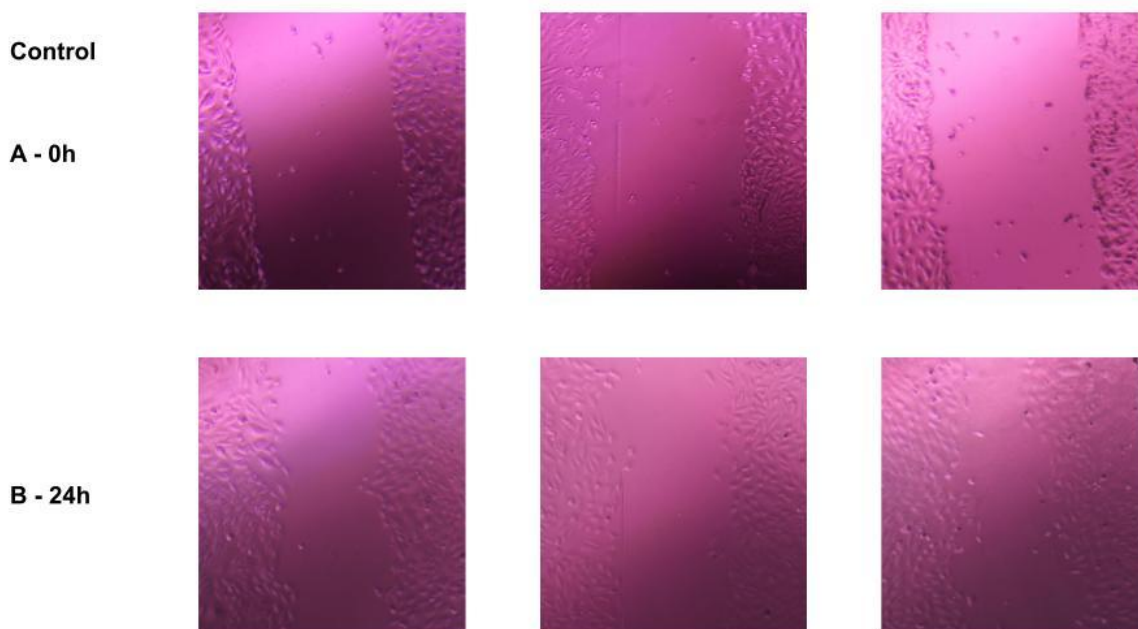
Al realizar el análisis estadístico, se encontró que no hubo una diferencia significativa en el crecimiento de las células cuando tratadas con el extracto de THC/CBD en la concentración de 0,01 mg/ml.

6.3 Ensayo de Migración Celular

Se realizó el ensayo de migración celular para estudiar el efecto que tiene el extracto de THC/CBD en la proliferación de los fibroblastos MRC-5. Se escogieron las concentraciones de 0,01 mg/ml (C1) y 0,005 mg/ml (C2) para llevar a cabo el ensayo, además de un control con fibroblastos que no fueron tratados con el extracto. Las células fueron analizadas al pasar 24 y 48 horas del inicio del experimento.

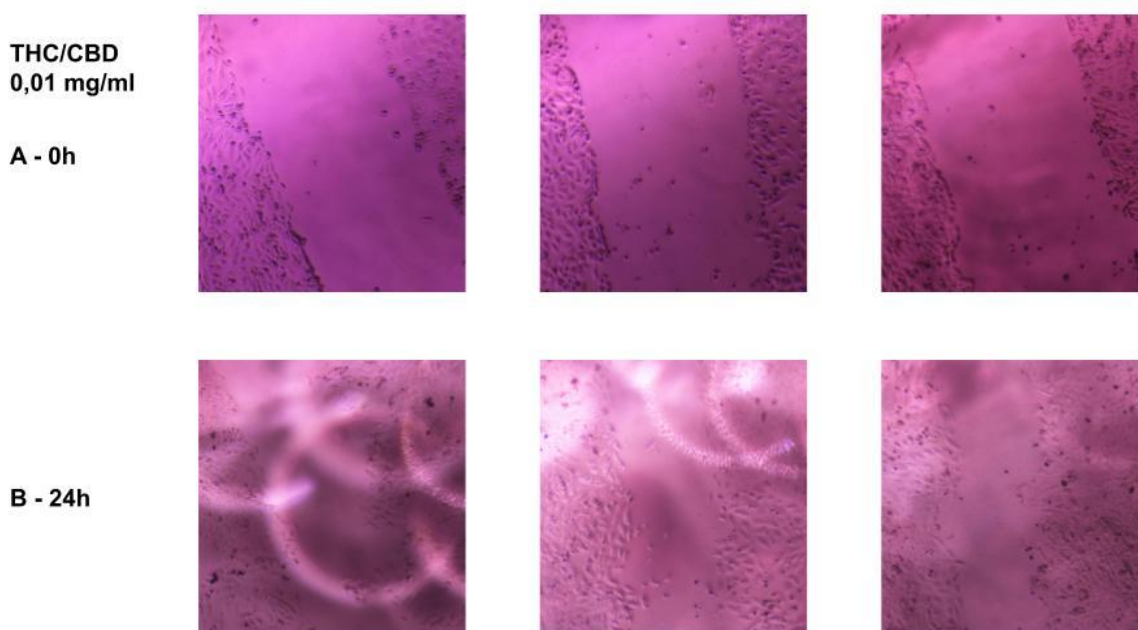
Al pasar los intervalos de tiempo, se observó que las células proliferaron en el espacio creado al hacer la cicatriz. Las imágenes tomadas con el microscopio invertido pasadas 24 horas se muestran en las **Figuras 9, 10 y 11**. Las imágenes tomadas pasadas 48 horas se muestran en las **Figuras 12, 13 y 14**.

Figura 9 - Fotografías de las células control (sin tratamiento) en el ensayo de migración celular.



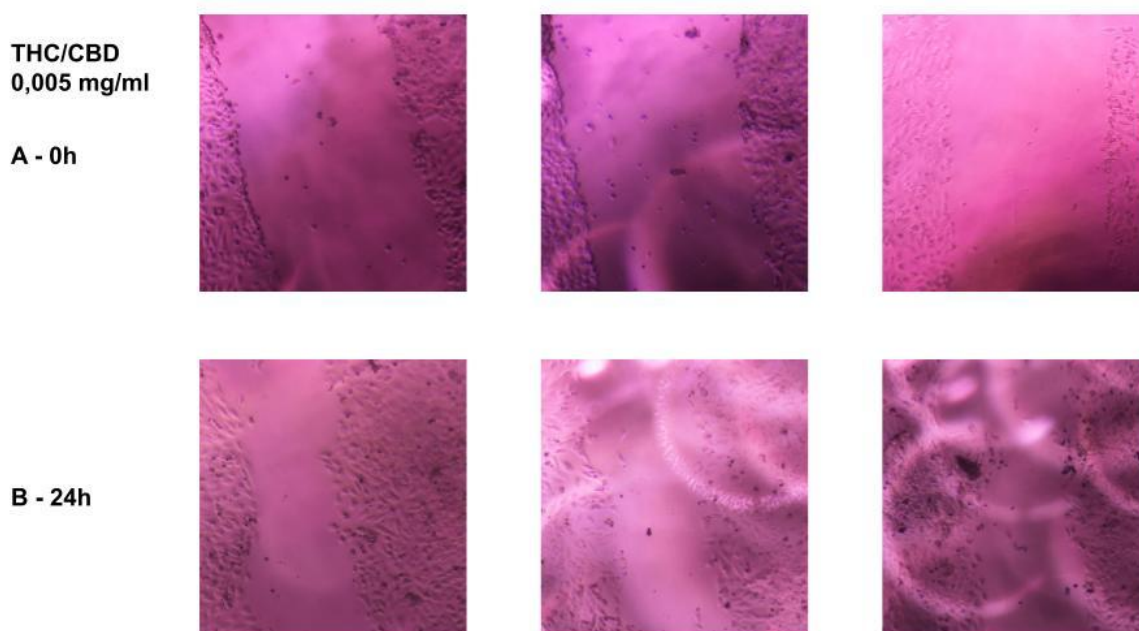
Nota: Grupo A corresponde a la triplicata a las 0 horas y el grupo B a la triplicata a las 24 horas.

Figura 10 - Fotografías de las células tratadas con THC/CBD a 0,01 mg/ml, en el ensayo de migración celular.



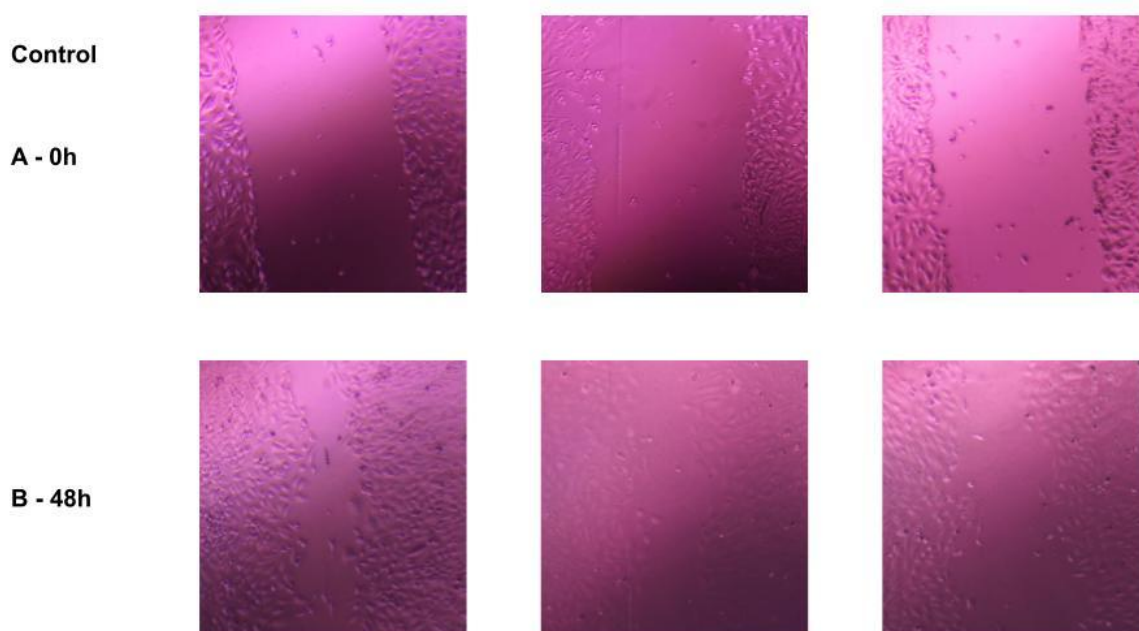
Nota: Grupo A corresponde a la triplicata a las 0 horas y el grupo B a la triplicata a las 24 horas. Es posible observar las burbujas de aceite del tratamiento en las imágenes del grupo B.

Figura 11 - Fotografías de las células tratadas con THC/CBD a 0,005 mg/ml, en el ensayo de migración celular.



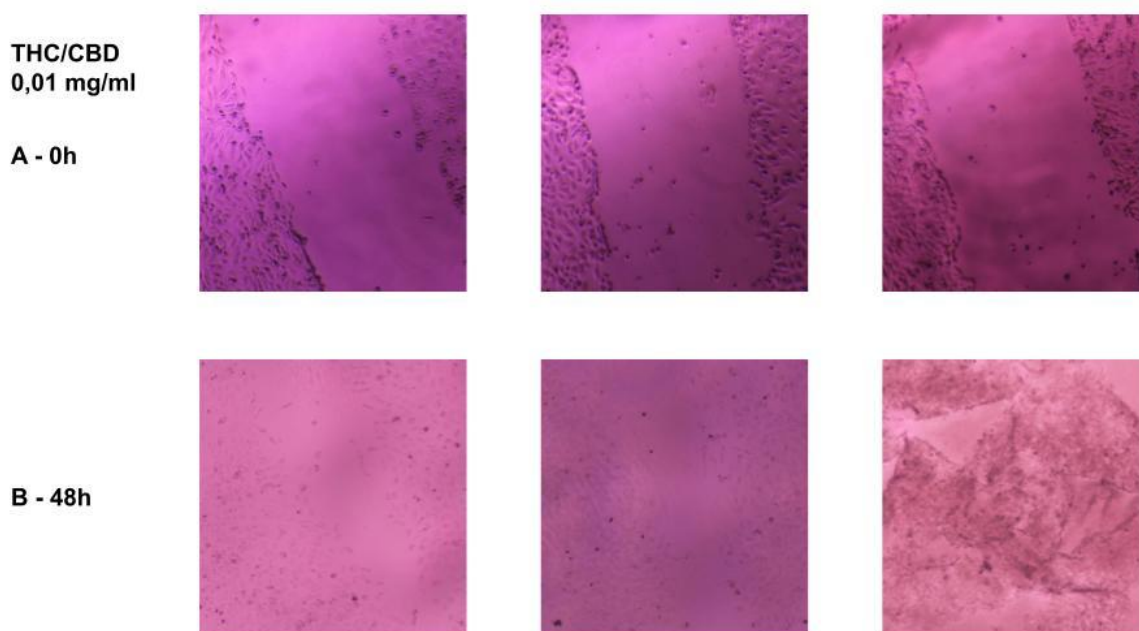
Nota: Grupo A corresponde a la triplicata a las 0 horas y el grupo B a la triplicata a las 24 horas. Es posible observar las burbujas de aceite del tratamiento en las imágenes del grupo B.

Figura 12 - Fotografías de las células control (sin tratamiento) en el ensayo de migración celular.



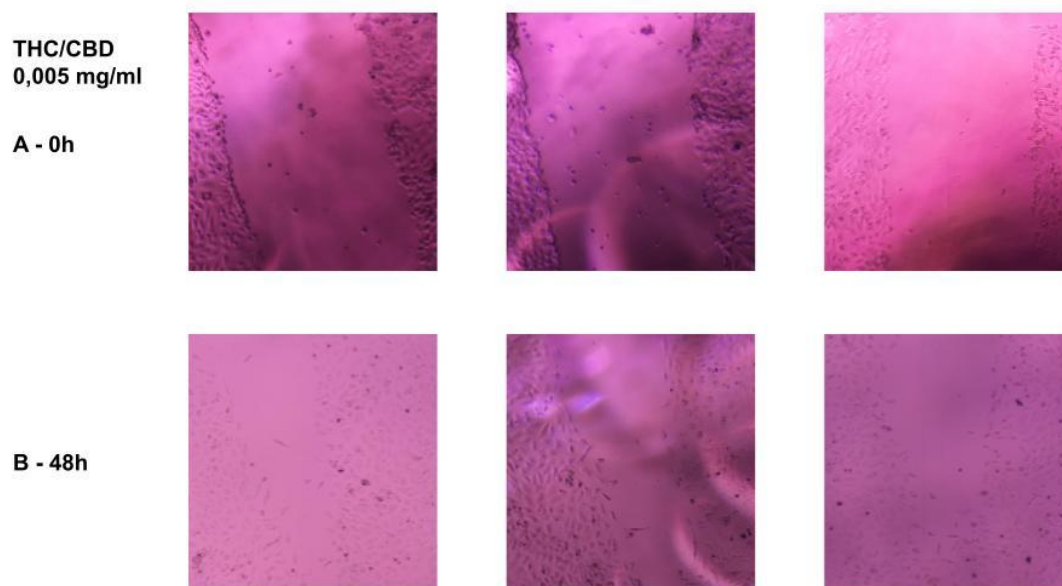
Nota: Grupo A corresponde a la triplicata a las 0 horas y el grupo B a la triplicata a las 48 horas.

Figura 13 - Fotografías de las células tratadas con THC/CBD a 0,01 mg/ml, en el ensayo de migración celular.



Nota: Grupo A corresponde a la triplicata a las 0 horas y el grupo B a la triplicata a las 48 horas. En la tercera imagen del grupo B, se observan las células desprendidas.

Figura 14 - Fotografías de las células tratadas con THC/CBD a 0,005 mg/ml, en el ensayo de migración celular.



Nota: Grupo A corresponde a la triplicata a las 0 horas y el grupo B a la triplicata a las 48 horas. Es posible observar las burbujas de aceite del tratamiento en la segunda imagen de los grupos A y B.

Usando el programa *Image J*, se analizaron las fotografías y se determinó el área de la cicatriz en cada uno de los pozos. La reducción del área de la cicatriz está registrada en la **Tabla 4**.

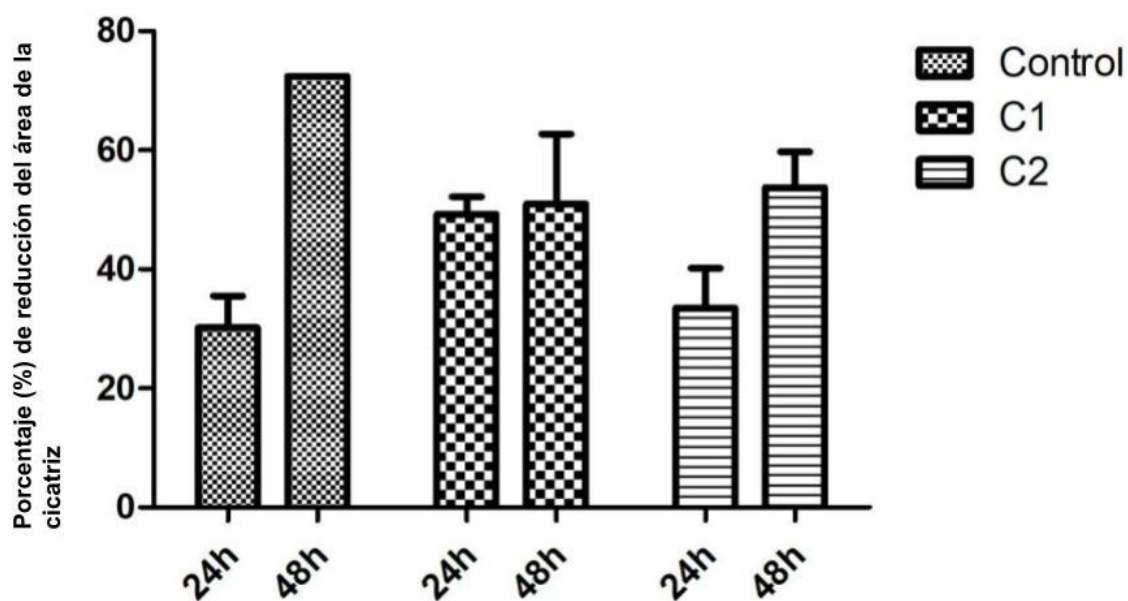
Tabla 4 - Datos de reducción del área de la cicatriz en el ensayo de migración celular. C1 corresponde a THC/CBD a 0,01 mg/ml; C2 corresponde a THC/CBD a 0,005 mg/ml.

Grupo	Área 0h	Área 24h	Reducción de área (%) 24h	Área 48h	Reducción de área (%) 48h
Control 1	1468121	894763	39,05%	404975	72,41%
Control 2	1560393	1237595	20,69%	contaminación	---
Control 3	1421092	983095	30,82%	contaminación	---
Promedio			30,19%		72,41%
C1	1400968	779186	44,38%	522418	62,71%
C1	1419845	726842	48,81%	862758	39,24%
C1	1496562	680227	54,55%	células desprendidas	---
Promedio			49,25%		50,98%
C2	1569082	839194	46,52%	556030	64,56%
C2	1592719	1210383	24,01%	891478	44,02%
C2	1434335	1008180	29,71%	679674	52,61%
Promedio			33,41%		53,73%

Al analizar el promedio de los porcentajes de reducción de área, se puede observar que, pasadas 24 horas, las células tratadas con el extracto de THC/CBD, en ambas concentraciones, tuvieron una tasa de migración mayor en comparación a las células del control. Pasadas 48 horas, las células del control presentan un mayor porcentaje promedio de reducción de área, sin embargo este valor no toma en cuenta el área de los tres pozos ya que dos de ellos sufrieron contaminación y fue imposible calcular las áreas correspondientes. De manera similar, uno de los pozos del tratamiento con la C1 tenía las células desprendidas, por lo que también fue imposible calcular el área y el porcentaje promedio de reducción de área toma en cuenta solamente el área de dos pozos.

Tomando estos datos, se realizó el análisis estadístico y no se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de reducción de área de los grupos estudiados (**Figura 15**).

Figura 15 - Promedio de los porcentajes de reducción del área de la cicatriz. **Control** (sin tratamiento), **C1** (THC/CBD 0,01 mg/ml) y **C2** (THC/CBD 0,005 mg/ml). Sin diferencias significativas entre los grupos.



7. Discusión

La cicatrización es uno de los procesos más importantes en el cuerpo humano y su correcto funcionamiento puede ser vital para la integridad del organismo, especialmente cuando se da de forma cutánea. Mantener la integridad de la piel y poseer una capacidad de cicatrización decente son prerequisites clave para una vida saludable. Alteraciones en cualquiera de las fases de la cicatrización pueden promover el desarrollo de heridas crónicas e impedir la curación de la herida, conduciendo a complicaciones con el potencial de ser de vida o muerte (ALMADANI *et al.*, 2021).

Las plantas han sido una fuente confiable para la obtención de nuevos compuestos para el desarrollo de terapias de diversos tipos desde antes de la farmacología moderna, tanto así que el 11% de las drogas consideradas esenciales por la OMS provienen, exclusivamente, de plantas (VEERESHAM, 2012). A pesar de su estatus legal, la planta de *Cannabis sativa* L. ha probado ser un interesante aliado en el campo de la medicina debido a la gran cantidad de efectos terapéuticos que sus principales moléculas, los cannabinoides, tienen en el organismo (BRIDGEMAN *et al.*, 2017).

Parte de lo que impulsó la investigación con cannabis fue el descubrimiento del sistema endocannabinoide en el cuerpo humano; un sistema con un rol aparentemente vital en la regulación de diversos procesos fisiológicos y que tiene sus receptores (CB1 y CB2) distribuidos abundantemente en muchos tipos de células del cuerpo (ZOU *et al.*, 2018). Es gracias a la amplia distribución de estos receptores que los fitocannabinoides, como el THC y el CBD, tienen el potencial de estimular alguna respuesta en las células que expresan receptores endocannabinoides.

Los fibroblastos son fundamentales en el proceso de la cicatrización y estimular su proliferación con compuestos provenientes de plantas es una buena forma de aumentar la velocidad de cicatrización (ADDIS *et al.*, 2020). Los efectos que los fitocannabinoides tienen en fibroblastos ha sido poco estudiado, por lo que el presente trabajo tenía como objetivo analizar el efecto que el extracto de THC y CBD tienen en fibroblastos MRC-5.

En el ensayo de citotoxicidad por medio de MTT, se descubrió que el extracto de THC/CBD estimula la proliferación de los fibroblastos conforme la concentración del compuesto aumenta. Además, no ocurrió muerte celular con ninguna de las 8 concentraciones estudiadas,

por lo que también se demostró que el extracto de THC/CBD, en esas concentraciones, no es tóxico para los fibroblastos MRC-5.

Es importante mencionar que el ensayo de MTT es el estándar por excelencia de los ensayos de citotoxicidad y análisis de proliferación celular por ser rápido, fácil de llevar a cabo y con resultados generalmente consistentes. Sin embargo, avances tecnológicos y nuevos estudios han revelado las limitaciones de dicho ensayo, como por ejemplo, que alteraciones en la estructura celular pueden interactuar con el tetrazolio y, consecuentemente, alterar los resultados (VAN TONDER *et al.*, 2015). Esto podría explicar por qué las células tratadas con la concentración de 0,01 mg/ml de THC/CBD mostraron una menor viabilidad en comparación a las tratadas con 0,005 mg/ml, generando inconsistencia en la curva obtenida en la que, de otra manera, la viabilidad de los fibroblastos aumenta conforme la concentración del extracto aumenta.

Por su naturaleza aceitosa, el extracto de THC/CBD demostró ser complicado de homogeneizar completamente cuando se diluyó en el medio de cultivo, pues ambas sustancias tendían a separarse en dos fases. Cada vez que se usaba para algún experimento, era necesario agitar la solución en el vórtex para que ambas fases se homogeneizaran momentáneamente y fuera posible aplicarlo en las células. Aún así, pasado un determinado tiempo en contacto con los cultivos, el extracto solía formar burbujas de aceite. Debido a que las concentraciones más altas analizadas en el ensayo de MTT (0,1 y 0,05 mg/ml) tenían una mayor cantidad del aceite, su uso en experimentos dificultaba el análisis de las células, por lo que se decidió utilizar la concentración de 0,01 mg/ml como base para el resto de los ensayos.

En el experimento de la curva de crecimiento, fue estudiada la concentración del tratamiento mencionada anteriormente. Analizando el conteo de las células a lo largo de los 4 días, el extracto a 0,01 mg/ml parece inducir la proliferación de los fibroblastos MRC-5; sin embargo, al realizar el análisis estadístico comparando la curva de crecimiento de las células bajo el tratamiento con las células control (sin tratamiento), se descubrió que no hay diferencias significativas entre las tasas de crecimiento celular.

De manera similar, en el ensayo de migración celular no se encontraron diferencias significativas entre la disminución del tamaño de la cicatriz de los grupos tratados con el extracto de THC/CBD en relación al grupo control, aún cuando el porcentaje de reducción de la

cicatriz fue mayor al usar ambas concentraciones del tratamiento. Es importante mencionar que las burbujas de aceite formadas por el extracto en el medio de cultivo dificultaron el análisis de las imágenes, por lo que la determinación del área de la cicatriz se vio alterada en algunas ocasiones. Para evitar este problema, lo ideal hubiera sido retirar el medio de cultivo conteniendo el extracto, lavar los pozos con PBS y luego tomar las fotografías.

Al hacer el análisis de las células pasadas 48 horas, un factor que afectó el cálculo del porcentaje de reducción de la cicatriz fue la contaminación de dos pozos en el grupo control: la contaminación micótica impide que se pueda considerar el resultado en esos pozos. Finalmente, las células desprendidas en un pozo del grupo tratado con 0,01 mg/ml también evitaron que se pudiera considerar el resultado de dicho pozo, pues la cicatriz era imposible de visualizar.

Los resultados indican que, con las concentraciones utilizadas, el extracto de THC/CBD no induce una proliferación significativa en fibroblastos MRC-5. Sin embargo, en todos los experimentos realizados, particularmente en el ensayo de MTT, las células tratadas con el extracto siempre tuvieron una proliferación un poco mayor en comparación a aquellas sin tratamiento. Esto podría indicar que usar concentraciones mayores del extracto para análisis *in vitro* puede resultar en una proliferación estadísticamente mayor. Esto estaría de acuerdo con el estudio realizado por Gerasymchuk *et al.*, donde se descubrió que ambos cannabinoides estimulan la proliferación significativamente en fibroblastos dérmicos CCD-1064Sk y CCD-1135Sk (GERASYMCHUK *et al.*, 2022).

Es relevante recordar que el extracto disponibilizado para este trabajo es comercializado para el consumo humano, de manera oral, en tratamientos clínicos y no para ser aplicado como tratamiento en ensayos *in vitro*. Para facilitar la realización de los experimentos y validar más los resultados del trabajo, lo ideal sería utilizar soluciones de cannabinoides aislados, especializadas para experimentación *in vitro*.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son limitados y estudios adicionales, en condiciones más estandarizadas, se vuelven necesarios para comprobar los efectos del extracto de THC/CBD en fibroblastos MRC-5. Por ejemplo, es importante tener en cuenta que es difícil asegurar que tanto los cultivos de control como los grupos tratados con el extracto fueron realizados en condiciones equivalentes de confluencia celular, lo que puede afectar las tasas de proliferación. Hay que considerar la variabilidad de los resultados del ensayo de

migración celular, pues las cicatrices fueron hechas manualmente y el tamaño inicial de las mismas no es constante, por lo que hay que ser cautelosos al interpretar los resultados.

Como en muchas investigaciones relacionadas con cultivos celulares, la contaminación bacteriana o micótica es un problema mayor que afecta el flujo de los experimentos y este trabajo no fue ajeno a dichas interferencias. Independientemente de dónde provenga dicha contaminación, el objetivo es llevar a cabo los ensayos de la manera más eficiente posible, por lo que se recomienda realizar los experimentos con el mayor cuidado, respetando las técnicas de asepsia y esterilización estandarizadas de laboratorios de cultivo celular, para así evitar los contratiempos ocasionados por la contaminación.

Finalmente, es oportuno no dejar de exponer las limitaciones de trabajar con cannabis. Dentro de Brasil, se vuelve complicado realizar investigaciones con la planta y sus compuestos debido a la cantidad de permisos que hay que obtener, sin mencionar la falta de accesibilidad que hay a dichos materiales. Además, el elevado precio de extractos de cannabis convierte estas investigaciones en trabajos que requieren de un amplio financiamiento.

8. Conclusión

Se puede concluir que los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que el extracto de cannabis, en las concentraciones estudiadas, no estimula una proliferación significativa en fibroblastos MRC-5 *in vitro*. El extracto tampoco presenta citotoxicidad en los mismos; factor importante para el uso de estos compuestos como agentes terapéuticos. En todos los ensayos llevados a cabo, los fibroblastos presentaron un pequeño incremento en la tasa de proliferación al ser tratados con THC/CBD, por lo que se recomienda realizar más estudios con extractos especializados en el tratamiento *in vitro* y en concentraciones mayores para comprobar si tienen el potencial de inducir una proliferación significativa en las células.

Referencias

Addis, R., Cruciani, S., Santaniello, S., Bellu, E., Sarais, G., Ventura, C., Maioli, M., & Pintore, G. (2020). Fibroblast Proliferation and Migration in Wound Healing by Phytochemicals: Evidence for a Novel Synergic Outcome. *International journal of medical sciences*, 17(8), 1030–1042. <https://doi.org/10.7150/ijms.43986>

Almadani, Y. H., Vorstenbosch, J., Davison, P. G., & Murphy, A. M. (2021). Wound Healing: A Comprehensive Review. *Seminars in plastic surgery*, 35(3), 141–144. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1731791>

Atoyan, R., Shander, D., & Botchkareva, N. V. (2009). Non-neuronal expression of transient receptor potential type A1 (TRPA1) in human skin. *The Journal of investigative dermatology*, 129(9), 2312–2315. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.58>

Banister, S. D., Arnold, J. C., Connor, M., Glass, M., & McGregor, I. S. (2019). Dark Classics in Chemical Neuroscience: Δ 9-Tetrahydrocannabinol. *ACS chemical neuroscience*, 10(5), 2160–2175. <https://doi.org/10.1021/acscemneuro.8b00651>

Booth, M. (2015). *Cannabis: A History*. St. Martin's Press.

Bridgeman, M. B., & Abazia, D. T. (2017). Medicinal Cannabis: History, Pharmacology, And Implications for the Acute Care Setting. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management*, 42(3), 180–188.

Butrica, James L. (2002). The medical use of cannabis among the Greeks and Romans. *Journal of Cannabis Therapeutics*, Volume 2, Issue 2. https://doi.org/10.1300/J175v02n02_04

CBD Structure. (2023). Wikipedia contributors. Cannabidiol. En Wikipedia, La Enciclopedia Libre. Accedido en Junio 3, 2023, disponible en: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Cannabidiol&oldid=1156527416>

Chanda, D., Neumann, D., & Glatz, J. (2019). The endocannabinoid system: Overview of an emerging multi-faceted therapeutic target. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, 140, 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2018.11.016>

Correia-Sá, I. B., Carvalho, C. M., Serrão, P. V., Loureiro, A. I., Fernandes-Lopes, C., Marques, M., & Vieira-Coelho, M. A. (2020). A new role for anandamide: defective link between the systemic and skin endocannabinoid systems in hypertrophic human wound healing. *Scientific reports*, 10(1), 11134. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68058-3>

Dick MK, Miao JH, Limaiem F. Histology, Fibroblast. (2022). In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541065/>

Elsohly MA, Slade D. (2005) Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sciences*.78(5):539-548. DOI: 10.1016/j.lfs.2005.09.011

Ezzili, C., Otrubova, K., & Boger, D. L. (2010). Fatty acid amide signaling molecules. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 20(20), 5959–5968. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.08.048>

Fibroblast. (2014) Genetics Home Reference. U.S. National Library of Medicine.

Filipiuc, L. E., Ababei, D. C., Alexa-Stratulat, T., Pricope, C. V., Bild, V., Stefanescu, R., Stanciu, G. D., & Tamba, B. I. (2021). Major Phytocannabinoids and Their Related Compounds: Should We Only Search for Drugs That Act on Cannabinoid Receptors?. *Pharmaceutics*, 13(11), 1823. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111823>

Flores-Sanchez, I.J., Verpoorte, R. (2008). Secondary metabolism in cannabis. *Phytochem Rev* 7, 615–639. <https://doi.org/10.1007/s11101-008-9094-4>

Galve-Roperh, I., Rueda, D., Gómez del Pulgar, T., Velasco, G., & Guzmán, M. (2002). Mechanism of extracellular signal-regulated kinase activation by the CB(1) cannabinoid receptor. *Molecular pharmacology*, 62(6), 1385–1392. <https://doi.org/10.1124/mol.62.6.1385>

Garcia-Gonzalez, E., Selvi, E., Balistreri, E., Lorenzini, S., Maggio, R., Natale, M. R., Capecchi, P. L., Lazerini, P. E., Bardelli, M., Laghi-Pasini, F., & Galeazzi, M. (2009). Cannabinoids inhibit fibrogenesis in diffuse systemic sclerosis fibroblasts. *Rheumatology (Oxford, England)*, 48(9), 1050–1056. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kep189>

Gerasymchuk, M., Robinson, G. I., Groves, A., Haselhorst, L., Nandakumar, S., Stahl, C., Kovalchuk, O., & Kovalchuk, I. (2022). Phytocannabinoids Stimulate Rejuvenation and Prevent Cellular Senescence in Human Dermal Fibroblasts. *Cells*, 11(23), 3939. <https://doi.org/10.3390/cells11233939>

Grotenhermen F. (2003). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clinical pharmacokinetics*, 42(4), 327–360. <https://doi.org/10.2165/00003088-200342040-00003>
Huestis MA (August 2007). "Human cannabinoid pharmacokinetics". *Chemistry & Biodiversity*. 4 (8): 1770–804. doi:10.1002/cbdv.200790152

Gülck, T., & Møller, B. L. (2020). Phytocannabinoids: Origins and Biosynthesis. *Trends in plant science*, 25(10), 985–1004. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.05.005>

Guo, S., & Dipietro, L. A. (2010). Factors affecting wound healing. *Journal of dental research*, 89(3), 219–229. <https://doi.org/10.1177/0022034509359125>

Hanuš, L. O., Meyer, S. M., Muñoz, E., Tagliatela-Scafati, O., & Appendino, G. (2016). Phytocannabinoids: a unified critical inventory. *Natural product reports*, 33(12), 1357–1392. <https://doi.org/10.1039/c6np00074f>

Harvard (2020). Cell assay, fix and stain (DAPI, Phalloidin) Protocol. Disponible en: <https://fgr.hms.harvard.edu/fly-cell-staining-dapi-and-phalloidin>

Johnson, R. (2019). *Defining Hemp: A Fact Sheet*. Washington, D.C: Congressional Research Service.

Jonkman, J. E., Cathcart, J. A., Xu, F., Bartolini, M. E., Amon, J. E., Stevens, K. M., & Colarusso, P. (2014). An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. *Cell adhesion & migration*, 8(5), 440–451. <https://doi.org/10.4161/cam.36224>

Kendall, R. T., & Feghali-Bostwick, C. A. (2014). Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Frontiers in pharmacology*, 5, 123. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00123>

Keylock, K. T., Vieira, V. J., Wallig, M. A., DiPietro, L. A., Schrementi, M., & Woods, J. A. (2008). Exercise accelerates cutaneous wound healing and decreases wound inflammation in aged mice. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 294(1), R179–R184. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00177.2007>

Krafts K. P. (2010). Tissue repair: The hidden drama. *Organogenesis*, 6(4), 225–233. <https://doi.org/10.4161/org.6.4.12555>

Kubrusly, R., Günter, A., Sampaio, L., Martins, R. S., Schitine, C. S., Trindade, P., Fernandes, A., Borelli-Torres, R., Miya-Coreixas, V. S., Rego Costa, A. C., Freitas, H. R., Gardino, P. F., de Mello, F. G., Calaza, K. C., & Reis, R. (2018). Neuro-glial cannabinoid receptors modulate signaling in the embryonic avian retina. *Neurochemistry international*, 112, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.10.016>

Mechoulam, R. (2014). Looking ahead after 50 years of cannabis research. *Cannabinoids*, Chapter 1, p.6-8. <https://doi.org/10.1002/9781118451281.ch1>

Mackie K. (2005). Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handbook of experimental pharmacology*, (168), 299–325. https://doi.org/10.1007/3-540-26573-2_10

Muller, C., Morales, P., & Reggio, P. H. (2019). Cannabinoid Ligands Targeting TRP Channels. *Frontiers in molecular neuroscience*, 11, 487. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00487>

Murnion B. (2015). Medicinal cannabis. *Australian prescriber*, 38(6), 212–215. <https://doi.org/10.18773/austprescr.2015.072>

Ozgek Kangal, M. K., & Regan, J. P. (2022). Wound Healing. En StatPearls. StatPearls Publishing.

Pate DW (1983). "Possible role of ultraviolet radiation in evolution of Cannabis chemotypes". *Economic Botany*. 37 (4): 396–405. doi:10.1007/BF02904200. S2CID 35727682

Pate DW (1994). "Chemical ecology of Cannabis". *Journal of the International Hemp Association*. 2 (29): 32–37.

Petrovito, L., Iozzo, M., Bacci, M., Giannoni, E., & Chiarugi, P. (2020). Treatment with Cannabinoids as a Promising Approach for Impairing Fibroblast Activation and Prostate Cancer Progression. *International journal of molecular sciences*, 21(3), 787. <https://doi.org/10.3390/ijms21030787>

Proksch, E., Brandner, J. M., & Jensen, J. M. (2008). The skin: an indispensable barrier. *Experimental dermatology*, 17(12), 1063–1072. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x>

Reisenberg, M., Singh, P. K., Williams, G., & Doherty, P. (2012). The diacylglycerol lipases: structure, regulation and roles in and beyond endocannabinoid signaling. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 367(1607), 3264–3275. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0387>

Release the strains. (2015). *Nature medicine*, 21(9), 963. <https://doi.org/10.1038/nm.3946>

Ren, G., Zhang, X., Li, Y., Ridout, K., Serrano-Serrano, M. L., Yang, Y., Liu, A., Ravikanth, G., Nawaz, M. A., Mumtaz, A. S., Salamin, N., & Fumagalli, L. (2021). Large-scale whole-genome resequencing unravels the domestication history of *Cannabis sativa*. *Science advances*, 7(29), eabg2286. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abg2286>

Río, C. D., Millán, E., García, V., Appendino, G., DeMesa, J., & Muñoz, E. (2018). The endocannabinoid system of the skin. A potential approach for the treatment of skin disorders. *Biochemical pharmacology*, 157, 122–133. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.08.022>

Robert, C., & Clarke, Mark, D. (2013). *Cannabis: Evolution and Ethnobotany*. Univ of California Press (τ. 27). Univ of California Press.

Rubin, V. (1975). *Cannabis and Culture*. ISBN 978-3-11-081206.

Russo E. B. (2007). History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet. *Chemistry & biodiversity*, 4(8), 1614–1648. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200790144>

Salmerón-Manzano, E., Garrido-Cardenas, J. A., & Manzano-Agugliaro, F. (2020). Worldwide Research Trends on Medicinal Plants. *International journal of environmental research and public health*, 17(10), 3376. <https://doi.org/10.3390/ijerph17103376>

Sen C. K. (2019). Human Wounds and Its Burden: An Updated Compendium of Estimates. *Advances in wound care*, 8(2), 39–48. <https://doi.org/10.1089/wound.2019.0946>

Sim-Selley L. J. (2003). Regulation of cannabinoid CB1 receptors in the central nervous system by chronic cannabinoids. *Critical reviews in neurobiology*, 15(2), 91–119. <https://doi.org/10.1615/critrevneurobiol.v15.i2.10>

Spampinato, S. F., Caruso, G. I., De Pasquale, R., Sortino, M. A., & Merlo, S. (2020). The Treatment of Impaired Wound Healing in Diabetes: Looking among Old Drugs. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 13(4), 60. <https://doi.org/10.3390/ph13040060>

Téot, L., Mustoe, T.A., Middelkoop, E., Gauglitz, G.G. (2020). Psychological Impact of Living with Scars Following Burn Injury. Van Loey, N.E.E. En: *Textbook on Scar Management*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-44766-3_48

THC Structure. (2023). Wikimedia Commons. Accedido en Junio 3, 2023. Disponible en: https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:THC_structure.svg&oldid=731638942

Van Tonder, A., Joubert, A. M., & Cromarty, A. D. (2015). Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC research notes*, 8, 47. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1000-8>

Veeresham C. (2012). Natural products derived from plants as a source of drugs. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 3(4), 200–201. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.104709>

Wallace H.A., Basehore B.M., Zito P.M. (2023). Wound Healing Phases. [Actualizado en 2023 Mar 7]. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470443/>

Wernick B., Nahirniak P., Stawicki S.P. (2022). Impaired Wound Healing. En: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482254/>

Wilkinson, H. N., & Hardman, M. J. (2020). Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open biology*, 10(9), 200223. <https://doi.org/10.1098/rsob.200223>

Wynn, T. A., & Ramalingam, T. R. (2012). Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nature medicine*, 18(7), 1028–1040. <https://doi.org/10.1038/nm.2807>

Yousef, H.; Alhaji, M.; Sharma, S. (2021). Anatomy, Skin (Integument), Epidermis.

Zou, S., & Kumar, U. (2018). Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. *International journal of molecular sciences*, 19(3), 833. <https://doi.org/10.3390/ijms19030833>