



FACULTAD DE FARMACIA
ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE INNOVACIÓN TERAPÉUTICA Y DIAGNÓSTICO MOLECULAR

**EFFECTO DE FITOCANNABINOIDES SOBRE FUNCIONES REGENERATIVAS DE
FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS *IN VITRO***

Unidad de Investigación II para optar al
Título de Químico Farmacéutico

ISABEL ANDREA LIZANA MORALES

**DIRECTOR: Dr. RICARDO CERIANI
CO-DIRECTOR: Dr. RODRIGO DIAZ**

Noviembre 2025

*A mi madre a quien debo todo lo que soy y seré,
gracias por enseñarme a vivir y amar.*

Agradecimientos:

Cuando pienso en qué y a quién debo agradecer, no puedo evitar pensar en mis papás, quienes siempre trabajaron para darme más de lo que ellos alguna vez pudieron soñar. Sin duda, todo lo que soy es gracias a su amor y apoyo incondicional.

A mi hermana menor, Paz, gracias por esperarme con un abrazo cada vez que volvía a casa y por desearme éxito cada vez que me iba; siempre me entregaste las fuerzas para seguir. A mi hermano mayor, Daniel, quien siempre estuvo dispuesto a ayudar y a quien siempre agradeceré por haber dejado sus metas de lado para ayudarme a cumplir las mías; mis logros siempre serán tuyos.

A mis queridas madrinas, Alejandra y Marcela, gracias por siempre creer en mí. Desde muy pequeña he sentido su apoyo y amor incondicional; han sido pilares fundamentales en mi vida.

A mis amigas Valentina, Carla y Bárbara, quienes siempre han estado en mis peores y mejores momentos, gracias por comprender, aceptar y abrazar cada parte de mí; gracias por jamás dejarme sola.

A mi amiga Fernanda, la universidad me regaló muchos aprendizajes, personas y recuerdos; todos en los que estás tú son, sin duda, los mejores.

A Sebastián, quien me acompañó incondicionalmente cada vez que necesité apoyo, amor o ayuda; gracias por todas las noches en las que me acompañaste a estudiar. Sin duda hiciste mi proceso universitario mucho más llevadero en los últimos años.

A mi profesor guía, Ricardo, quien siempre estuvo dispuesto a explicarme y enseñarme con respeto; agradezco la paciencia y el compromiso que me entregó estos últimos dos años.

A todos los miembros del laboratorio en el que trabajé este último año, gracias por su disposición a ayudar y explicar; hicieron mi trabajo más ameno.

Y finalmente, gracias a todo aquel que de alguna forma fue parte de mi proceso universitario. Muchos de ustedes fueron fuente de inspiración y admiración estos años, gracias.

Resumen

Las heridas crónicas representan un desafío importante para la salud pública debido a su alta prevalencia, evolución prolongada y resistencia a los tratamientos convencionales, lo que resalta la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que favorezcan su cicatrización. En la búsqueda de nuevas terapias para este tipo de heridas, los cannabinoides han demostrado un prometedor potencial terapéutico, principalmente por su actividad antiinflamatoria. Además, su efecto en la piel está escasamente estudiado.

El presente estudio tiene como objetivo evaluar el efecto de tres cannabinoides de origen vegetal — Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC), cannabinol (CBN) y ácido tetrahidrocannabinólico (THCA)— sobre funciones esenciales de fibroblastos dérmicos humanos, como la proliferación y migración celular, la expresión de citoquinas inflamatorias y la síntesis de componentes de la matriz extracelular.

La metodología contempló el cultivo de fibroblastos derivados de prepucio neonatal, tratados con extractos de cannabis purificados. Se evaluó la viabilidad y proliferación celular mediante ensayos de fluorescencia, la migración utilizando un modelo *in vitro* de herida controlada y la expresión génica mediante PCR en tiempo real.

Los resultados mostraron que ninguno de los fitocannabinoides evaluados modificó la viabilidad ni la proliferación de los fibroblastos. En cuanto a la migración, se observaron tendencias dependientes del compuesto. En el análisis de expresión génica mediante qRT-PCR, tanto los cannabinoides aislados como el extracto completo no mostraron diferencias significativas en comparación al control. En conclusión, los hallazgos sugieren que los fitocannabinoides presentan un perfil de seguridad celular inicial al no afectar la viabilidad ni la proliferación de los fibroblastos, y podrían modular de manera diferenciada procesos como la migración celular. Si bien los efectos observados no fueron significativos, el estudio aporta evidencia preliminar sobre el potencial rol de los fitocannabinoides.

Abstract

Chronic wounds represent a significant public health challenge due to their high prevalence, prolonged progression, and resistance to conventional treatments. This highlights the urgent need to develop new therapeutic strategies that promote wound healing. In the search for novel therapies for these types of wounds, cannabinoids have shown promising therapeutic potential, mainly due to their anti-inflammatory properties. Moreover, their effects on the skin remain poorly studied.

This study aims to evaluate the effects of three plant-derived cannabinoids—tetrahydrocannabinol (THC), cannabinal (CBN), and tetrahydrocannabinolic acid (THCA)—on key functions of human dermal fibroblasts, including cell proliferation and migration, the expression of inflammatory cytokines, and the synthesis of extracellular matrix components.

The methodology involves culturing fibroblasts isolated from neonatal foreskin and treating them with purified cannabis extracts. Cell viability and proliferation were assessed using fluorescence-based assays, migration was evaluated through an *in vitro* scratch wound model, and gene expression was analyzed by real-time PCR.

The results showed that none of the evaluated phytocannabinoids modified fibroblast viability or proliferation. Regarding migration, compound-dependent trends were observed. In the gene expression analysis by qRT-PCR, both the isolated cannabinoids and the complete extract showed no significant differences compared to the control.

In conclusion, the findings suggest that phytocannabinoids present an initial cellular safety profile by not affecting fibroblast viability or proliferation, and may differentially modulate processes such as cell migration. Although the observed effects were not significant, the study provides preliminary evidence of the potential role of phytocannabinoids.

Glosario de términos:

Cicatrización: Proceso de reparación de tejidos lesionados, compuesto por varias fases: hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación.

Colágeno: Proteína estructural que constituye la matriz extracelular y proporciona soporte a tejidos como la piel, los huesos y los cartílagos. Los tipos I y III son fundamentales en la cicatrización de heridas.

Dermis: Capa intermedia de la piel que contiene tejido conectivo, vasos sanguíneos, nervios, glándulas y células como fibroblastos, responsables de la producción de colágeno y otros componentes de la matriz extracelular.

Fibroblastos: Células del tejido conectivo que sintetizan colágeno y otros componentes de la matriz extracelular, desempeñando un papel clave en la cicatrización y reparación de tejidos.

PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR): Técnica molecular utilizada para cuantificar niveles de ácidos nucleicos, como ARN mensajero (mRNA), en tiempo real.

Proliferación celular: Proceso mediante el cual las células se dividen para aumentar su número, esencial en la reparación de tejidos.

Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC): El principal agente psicoactivo de la planta Cannabis sativa. Actúa como agonista parcial de los receptores CB1 y CB2, con efectos como analgesia y antiemesis.

Ácido Tetrahidrocannabinólico (THCA): Precursor ácido del THC, que se encuentra en altas concentraciones en la planta fresca y no posee efectos psicoactivos. Presenta propiedades antiinflamatorias y neuroprotectoras.

Cannabinol (CBN): Un derivado oxidativo del THC con actividad psicoactiva leve. Muestra afinidad moderada por el receptor CB2, lo que sugiere potenciales propiedades sedantes e inmunomoduladoras.

Endocannabinoides: Ligandos endógenos (producidos por las células) del Sistema Endocannabinoide.

Fitocannabinoides: Compuestos naturales del Cannabis que tienen la capacidad de actuar sobre el sistema endocannabinoide del cuerpo.

Epidermis: Capa más externa de la piel, formada principalmente por queratinocitos organizados en estratos, que actúa como barrera física.

Heridas Crónicas: Heridas en las que el proceso de cicatrización se ve comprometido, caracterizadas por un estado inflamatorio excesivo, prolongado y autosostenido, asociado a la degradación de factores de crecimiento y matriz extracelular.

Matriz Extracelular (MEC): Red de moléculas sintetizadas por fibroblastos (como fibronectina, ácido hialurónico y colágeno) que forma el tejido de granulación y proporciona soporte estructural a la piel.

Receptor CB1: Receptor del Sistema Endocannabinoide descrito principalmente en el sistema nervioso, pero también presente en células cutáneas (queratinocitos, melanocitos, fibroblastos). Regula la proliferación, diferenciación y respuesta inflamatoria en la piel.

Receptor CB2: Receptor del Sistema Endocannabinoide que se encuentra principalmente en el sistema inmunológico y en tejidos periféricos como la piel. Su función principal es la modulación de la inflamación.

Sistema Endocannabinoide (ECS): Red biológica presente en casi todos los tejidos del cuerpo, compuesta por receptores (CB1, CB2), ligandos endógenos y enzimas. Su función principal es mantener la homeostasis, modulando el dolor y la inflamación.

Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF): Factor de crecimiento clave que induce la angiogénesis (formación de vasos) durante la fase de proliferación de la cicatrización.

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium): Medio de cultivo celular utilizado para mantener y nutrir los fibroblastos en condiciones de laboratorio.

Matriz extracelular (MEC): Red tridimensional compuesta de colágeno, proteoglicanos, glicoproteínas y otras moléculas que proporcionan soporte estructural y regulan funciones celulares.

Abreviaciones:

MEC: Matriz extracelular

α -SMA: Alfa actina del músculo liso

IL-1: Interleucina 1

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

IL-10: Interleucina 10

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

MMP: Metaloproteinasas de matriz

FAAH: Hidrolasa de amidas de ácidos grasos

MAGL: Monoacilglicerol lipasa

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

MAPK/ERK: Proteína quinasa activada por mitógenos / quinasa regulada por señales extracelulares

NF- κ B: Factor nuclear kappa B

PI3K/Akt: Fosfatidilinositol 3 quinasa / proteína quinasa B

ECS: Sistema endocannabinoide

CB1: Receptor cannabinoide tipo 1

CB2: Receptor cannabinoide tipo 2

AEA: Anandamida

2-AG: 2 araquidonoilglicerol

THC / Δ^9 -THC: Delta 9 tetrahidrocannabinol

CBD: Cannabidiol

CBN: Cannabinol

THCA: Ácido tetrahidrocannabinólico

EE.UU: Estados Unidos

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

SBF: Suero bovino fetal

CO₂: Dióxido de carbono

mRNA: ARN mensajero

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

Col I: Colágeno tipo I

Col III: Colágeno tipo III

FN: Fibronectina

SMA: Alfa actina del músculo liso

GAPDH: Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa

DMSO: Dimetilsulfóxido

UI/mL: Unidades internacionales por mililitro

µg/mL: Microgramos por mililitro

qRT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción en tiempo real

cDNA: ADN complementario

EC: Extracto completo

SYBR: Colorante fluorescente para amplificación de ácidos nucleicos

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

TGF-β: Factor de crecimiento transformante beta

RNA: Ácido ribonucleico

UV: Luz ultravioleta

ATP: Adenosín trifosfato

Índice	pág.
1. Introducción.....	1
1.1 Piel.....	1
1.2 Proceso de cicatrización cutánea	1
1.3 Heridas crónicas.....	2
1.4 El sistema endocannabinoide.....	3
1.5 Tratamiento de heridas mediante el uso de fitocannabinoides.....	4
2. Hipótesis.....	6
3. Objetivo general	6
3.1. Objetivos específicos.....	6
4. Metodología.....	7
4.1. Cultivo celular.....	7
4.2. Extracto de Cannabis.....	8
4.3. Tratamiento con extractos de Cannabis.....	8
4.4. Ensayo de viabilidad por Resazurina.....	8
4.5. Estudio de proliferación.....	8
4.6. Estudio de migración.....	9
4.7. PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).....	9
4.8. Análisis estadístico.....	10
5. Resultados.....	11
5.1. Viabilidad.....	11
5.2. Proliferación.....	11
5.3. Migración.....	12
5.4. PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).....	15
6. Discusión.....	17
7. Conclusión.....	20
8. Bibliografía.....	21
9. Anexos.....	27

1.- Introducción

1.1 Piel

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano y cumple funciones vitales como la protección frente a agresiones externas, la regulación térmica y la percepción sensorial. Está compuesta por tres capas principales: la epidermis, la dermis y la hipodermis, cada una con estructuras y funciones especializadas. La epidermis actúa como barrera física y está formada principalmente por queratinocitos organizados en estratos; la dermis proporciona soporte mecánico gracias a su matriz rica en colágeno y elastina; y la hipodermis, también llamada tejido subcutáneo, participa en la amortiguación y el aislamiento térmico. Además, en la piel se encuentran anexos como folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas, que contribuyen a sus funciones fisiológicas y de comunicación con el entorno (Palmeira et al., 2006; Miot et al., 2011).

1.2 Proceso de cicatrización cutánea

Las heridas cutáneas son una constante a lo largo de la vida de cualquier ser humano, presentándose en forma aguda o crónica. El proceso de cicatrización de las heridas cutáneas es sumamente complejo y depende de una serie de factores altamente regulados para que se lleve a cabo de manera adecuada y permita la restauración de la barrera cutánea. El proceso fisiológico de cicatrización de las heridas se desarrolla a través de una secuencia altamente regulada de eventos celulares y moleculares, que tradicionalmente se dividen en cuatro fases: hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación (Arenas, 2003; Healy et al., 2023a). La fase inicial de hemostasia, que puede durar hasta 15 minutos, tiene como objetivo principal detener la hemorragia mediante la formación de un tapón plaquetario y un coágulo sanguíneo (Velnar et al., 2009); lo cual no solo previene la pérdida de fluidos, sino que también activa la cascada de coagulación y promueve la liberación de señales químicas que desencadenan la respuesta inflamatoria subsecuente (Janis et al., 2010). Durante esta fase inflamatoria, las células inmunes, como neutrófilos y macrófagos, migran hacia el sitio de la herida, favorecidas por la activación del sistema del complemento (Ricklin et al., 2010). Estas células eliminan patógenos y tejido dañado, mientras liberan una amplia gama de citocinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10) y factores de crecimiento como Factor de crecimiento derivado de Plaquetas (PDGF), Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β) y Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- α), fundamentales para la transición a la siguiente etapa del proceso (Broughton et al., 2006).

Posteriormente, se inicia la fase de proliferación, que generalmente comienza alrededor del tercer día posterior a la lesión y puede extenderse por dos o tres semanas (Singer et al., 1999). En esta fase, ocurre un cambio fenotípico de los queratinocitos en los bordes de la herida hacia un estado hiperproliferativo, lo cual impulsa la reepitelización de la epidermis (Healy et al., 2023a; Li et al., 2007). Además, se activa la angiogénesis, inducida por VEGF, y se produce la migración y proliferación de fibroblastos bajo la acción de PDGF y TGF- β (Esteo et al., 2005). Estos fibroblastos sintetizan elementos

clave como fibronectina, ácido hialurónico, proteoglicanos y colágeno tipo III, que forman la matriz extracelular del tejido de granulación (Senet, 2008). Este entorno permite la reconstrucción inicial de la integridad estructural de la piel, coordinado por una red compleja de citocinas, factores de crecimiento, moléculas de matriz extracelular y diferentes tipos celulares que actúan simultáneamente (Gurtner et al., 2008).

La fase final del proceso, conocida como remodelación, puede prolongarse durante meses o incluso hasta dos años, dependiendo de la extensión de la lesión (Witte et al., 1997). Durante esta etapa, se reorganizan las fibras de colágeno y se fortalece la estructura tisular mediante la acción de miofibroblastos, células similares a las del músculo liso que expresan α -actina y contribuyen tanto al cierre de la herida como al aumento de la fuerza tensil del tejido cicatricial (Lawrence W. T., 1998). El colágeno, especialmente el tipo I, sintetizado por los fibroblastos, proporciona integridad y resistencia mecánica, reemplazando progresivamente al colágeno tipo III del tejido de granulación (Volk et al., 2011; Alhajj & Goyal, 2022). Este proceso de sustitución y reorganización es esencial para la restauración funcional y estructural de la piel lesionada.

1.3 Heridas crónicas

Aunque el proceso de cicatrización en heridas agudas suele ser eficiente, existen casos en los que este mecanismo se ve comprometido, dando lugar a heridas crónicas. Estas se caracterizan por un estado inflamatorio excesivo, prolongado y autosostenido, acompañado de una elevada presencia de neutrófilos. El estado inflamatorio crónico está asociado a la degradación de factores de crecimiento y matriz extracelular, la expresión de elevada de citocinas proinflamatorias como TNF- α , TGF- β , IL-1 e IL-6 y una actividad y expresión excesivas de metaloproteinasas de matriz (MMP) (Loots et al., 1998).

Existen diversos procesos patológicos que alteran la cascada de cicatrización provocando que esta sea afectada resultando en heridas crónicas que no cicatrizan generando una incomodidad y angustia al paciente lo que trae grandes gastos al servicio de salud y/o al paciente (Han & Ceilley, 2017). Un ejemplo de lo anterior es la Diabetes Mellitus 2 junto con la obesidad y el envejecimiento que ralentizan el proceso de cicatrización puesto que se ve afectada la re-epitelización de la piel (Burgess et al., 2021).

Se ha estimado que cerca de \$25.000 millones de dólares (valor EE.UU) le cuesta al servicio médico el tratamiento de las heridas crónicas en su total y que al año se ven afectados cerca de 6,5 millones de pacientes al año, valor que podría ir en aumento debido a la alza de la prevalencia de la diabetes en la población, además de otras circunstancias que afectan a las mismas, las que fueron mencionadas anteriormente (Han & Ceilley, 2017). En los países desarrollados, entre un 1-2% de la población presenta heridas crónicas y en los pacientes diabéticos este valor sube a un 25% (úlceras en pie) (Healy et al., 2023a).

Dada la magnitud de este problema de salud nace la necesidad de buscar nuevos enfoques de tratamientos para las heridas que permite utilizarse en las diferentes situaciones que aumentan la probabilidad de generar heridas crónicas. Frente a la necesidad de encontrar un tratamiento, es que un área prometedora de investigación y que podría ir dando respuestas es el sistema endocannabinoide al presentar diversas características que inciden en la cicatrización de heridas.

1.4 El sistema endocannabinoide

El Sistema Endocannabinoide (ECS) es una red biológica presente en casi todos los tejidos del cuerpo, cuya función principal es mantener la homeostasis (Healy et al., 2023). Este sistema participa en procesos clave como la modulación del dolor, la inflamación, el estado de ánimo y el metabolismo energético. Está compuesto por los receptores CB1 y CB2, ligandos endógenos como la anandamida, y enzimas responsables de su síntesis y degradación (Turcotte et al., 2015).

En cuanto a los receptores, si bien el CB1 ha sido descrito principalmente en el sistema nervioso central y periférico, también se ha observado su expresión en una amplia variedad de células y estructuras cutáneas, incluidos queratinocitos, melanocitos, fibroblastos, células sebáceas y diversos linajes celulares del folículo piloso (Ständer et al., 2005). Este receptor participa en la regulación de procesos clave como la proliferación celular, la diferenciación y la respuesta inflamatoria en la piel (Tóth et al., 2011). Desde el punto de vista molecular, el receptor CB1 se acopla principalmente a proteínas Gi/o, lo que conlleva a la inhibición de la adenilil ciclasa, disminución de los niveles de AMPc, y modulación de canales iónicos (principalmente de calcio y potasio). También puede activar vías MAPK/ERK que participan en proliferación y apoptosis celular (Ibsen et al., 2017).

En cuanto al receptor CB2, se encuentra principalmente en el sistema inmunológico, donde está presente en células como los macrófagos y linfocitos (Turcotte et al., 2015). También se ha descrito en tejidos periféricos como lo es la piel (Correia-Sá et al., 2020). Su función principal es la modulación de la inflamación, regulando la liberación de citoquinas y controlando la respuesta inmune para evitar reacciones excesivas o autoinmunes. Además, el receptor CB2 participa en el alivio del dolor crónico (Shang & Tang, 2017). Al igual que el CB1, el CB2 activa proteínas Gi/o, inhibiendo la adenilil ciclasa, pero también regula directamente la activación de factores de transcripción como NF- κ B y promueve rutas antiinflamatorias mediante la modulación de MAPKs y PI3K/Akt, favoreciendo así la supervivencia celular y la regeneración tisular (Ibsen et al., 2017).

Los cannabinoides se pueden dividir en tres categorías: fitocannabinoides, endocannabinoides y cannabinoides sintéticos. Los fitocannabinoides son de origen vegetal, derivados de la planta *Cannabis sativa* L. (Wiley et al., 2018), entre los cuales destacan el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC), el cannabidiol (CBD), el cannabinol (CBN) y el ácido tetrahidrocannabinólico (THCA). El Δ^9 -THC es el principal agente psicoactivo de la planta, actuando como agonista parcial de los receptores CB1 y CB2

del sistema endocannabinoide, y ejerce efectos como analgesia, antiemesis y estimulación del apetito (Pertwee, 2008). En contraste, el CBD no produce efectos psicoactivos, pero presenta propiedades ansiolíticas, antiinflamatorias y neuroprotectoras, interactuando de forma indirecta con los receptores cannabinoides, así como con sistemas moleculares como el serotoninérgico o el canal iónico TRPV1 (Izzo et al., 2009). Por su parte, el CBN es un derivado oxidativo del Δ^9 -THC con actividad psicoactiva leve; sin embargo, muestra afinidad moderada por el receptor CB2, lo que sugiere potenciales propiedades sedantes e inmunomoduladoras (ElSohly & Gul, 2014). El THCA, precursor ácido del Δ^9 -THC, se encuentra en altas concentraciones en la planta fresca y no posee efectos psicoactivos; sin embargo, presenta propiedades antiinflamatorias, neuroprotectoras y antieméticas, lo cual ha despertado un creciente interés en su potencial terapéutico (Rock et al., 2013; Russo, 2011).

Los endocannabinoides son producidos por las células y regulan funciones fisiológicas. Los más importantes son la anandamida (AEA) y el 2-arachidonoylglycerol (2-AG). AEA actúa como un agonista parcial de alta afinidad del receptor CB1 y tiene baja afinidad en el receptor CB2, mientras que 2-AG es un agonista completo en los receptores CB1 y CB2, con afinidad baja a moderada (Tsuboi et al., 2018). Los cannabinoides sintéticos son un grupo químicamente diverso de nuevas sustancias psicoactivas que se dirigen al sistema endocannabinoide (Río et al., 2018; Roque-Bravo et al., 2024). Las enzimas FAAH y MAGL son responsables de degradar estos endocannabinoides para mantener el equilibrio en su actividad (Soria-Lara et al., 2019).

En conclusión, el Sistema Endocannabinoide (ECS) desempeña un papel crucial en la regulación de la homeostasis, lo que lo convierte en un objetivo prometedor para el manejo de heridas crónicas. La activación del receptor CB2 puede contribuir a controlar la inflamación excesiva y favorecer la regeneración tisular, mientras que los cannabinoides, al modular el dolor, podrían mejorar la calidad de vida de los pacientes.

1.5 Tratamiento de heridas mediante el uso de cannabinoides

Actualmente, los estudios sobre el uso terapéutico de los cannabinoides en heridas crónicas son limitados. No obstante, los estudios disponibles en heridas simples, tanto *in vitro* como *in vivo*, indican que los cannabinoides parecen mejorar la cicatrización de estas a través de diversos mecanismos, en particular a través del receptor CB2 (Healy et al., 2023b).

Los cannabinoides parecen influir favorablemente en diversos procesos clave de la cicatrización, como la reducción de la inflamación, la modulación del estrés oxidativo y la promoción de la reepitelización y remodelación del tejido favoreciendo un cierre más rápido de la herida y una menor formación de cicatrices. Estos efectos parecen estar relacionados con la regulación del equilibrio inflamatorio, donde el CB2 desempeña un papel crucial al inhibir macrófagos proinflamatorios y promover un entorno antiinflamatorio más adecuado para la regeneración tisular. Estos efectos han sido evidentes en modelos preclínicos y en estudios humanos (Ständer et al., 2005), (Chelliah et al., 2018), (Zhao et al., 2021). Por otro lado, en heridas importantes, como úlceras

complejas, se ha observado una respuesta positiva al uso tópico de cannabinoides combinados con terpenos y flavonoides. Estos tratamientos han mostrado no solo mejorar la reparación del tejido, sino también aliviar síntomas asociados, como el dolor o la inflamación crónica. Sin embargo, estos hallazgos, aunque alentadores, están mayoritariamente basados en estudios de casos individuales o análisis retrospectivos, limitando su generalización (Maida et al., 2020), (Maida et al., 2021).

En la actualidad los estudios del uso terapéutico de heridas crónicas son realmente escasos, si bien los cannabinoides parecen mejorar la cicatrización de heridas cutáneas simples a través de diversos mecanismos, en particular a través del receptor CB2, se necesitan estudios adicionales, más sólidos tanto *in vitro*, como *in vivo* para definir mejor estos mecanismos, así como para examinar el papel de los cannabinoides en la cicatrización de heridas crónicas en humanos.

Dado que los cannabinoides pueden tener un potencial terapéutico en el tratamiento de heridas, y considerando que el fibroblasto es una célula clave en el proceso de cicatrización de heridas, se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál es el efecto de los fitocannabinoides (Extracto completo, THC, CBN y THCA) sobre la viabilidad, capacidad proliferativa, migratoria, y expresión de transcritos relacionados con la matriz extracelular de los fibroblastos dérmicos humanos?

2.- Hipótesis:

La exposición de fibroblastos dérmicos humanos a fitocannabinoides (Extracto completo, THC, CBN y THCA) mejora su capacidad proliferativa y migratoria, reduce la respuesta inflamatoria, y favorece la formación de matriz extracelular.

3.- Objetivo General:

Evaluar el efecto de los fitocannabinoides (Extracto completo, THC, CBN y THCA) sobre las funciones biológicas clave de los fibroblastos dérmicos humanos, incluyendo la proliferación, migración, respuesta inflamatoria y síntesis de matriz extracelular.

3.1 Objetivo específicos:

1 Analizar el efecto de los fitocannabinoides (Extracto completo, THC, CBN y THCA) sobre la viabilidad y capacidad proliferativa de los fibroblastos dérmicos humanos

2 Determinar la influencia de los fitocannabinoides (Extracto completo, THC, CBN y THCA) en la migración celular de fibroblastos dérmicos.

3 Evaluar el impacto de los fitocannabinoides (Extracto completo, THC, CBN y THCA) en la expresión de genes de citoquinas y componentes de la matriz extracelular generadas por fibroblastos dérmicos.

4.- Metodología

En la **figura 1** se esquematiza el diseño experimental. Se realizaron cultivos de fibroblastos los cuales fueron posteriormente tratados con diferentes concentraciones de THC, CBN, THCA y un extracto completo, con el fin de evaluar el efecto sobre su proliferación, viabilidad, migración y expresión mRNA de VEGF, y colágenos tipo I y III.

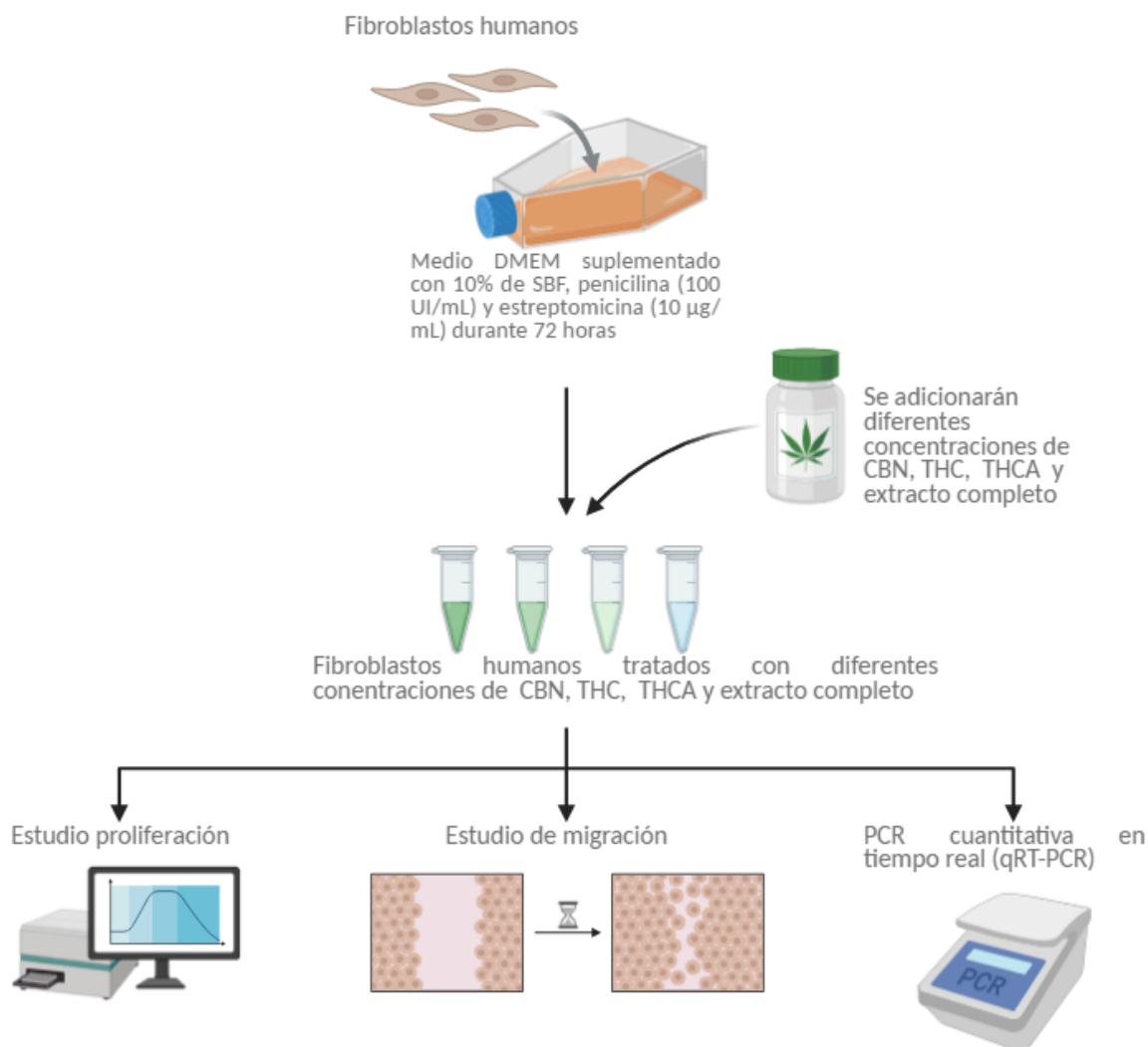


Figura 1. Diseño experimental del proyecto. Imagen confeccionada en BioRender.

4.1 Cultivo celular

Para este estudio se emplearon fibroblastos dérmicos de prepucio de neonato humano, adquiridos comercialmente (GIBCO). Las células fueron cultivadas en medio DMEM enriquecido con 10% de suero bovino fetal (SBF) (Cytiva), penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (10 µg/mL) (Thermo Scientific Inc®) y Glutamax 2 mM (Thermo Scientific Inc®). Los cultivos celulares se mantuvieron en un incubador Memmert, en un ambiente húmedo a 37 °C con una atmósfera controlada de 5% de CO₂ (Cases-Perera et al., 2022).

4.2 Extracto de Cannabis

Se utilizaron extractos y metabolitos previamente obtenidos a partir de la planta *Cannabis sativa* L., empleando como disolventes orgánicos hexano y acetato de etilo, seleccionados por su capacidad diferencial para extraer fitocannabinoides de interés. El hexano para ácido tetrahidrocannabinólico (THCA) y el extracto completo, mientras que el acetato de etilo para Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) y cannabinal (CBN) (Tapia-Tapia et al., 2024). Estos extractos fueron entregados por el Dr. Rodrigo Díaz, académico de la Universidad de Valparaíso, quien mediante la resolución 5.544 entregada por el Instituto de Salud Pública de Chile, puede hacer uso de hierba *Cannabis sativa* L. para fines científicos y de investigaciones dentro de esta casa de estudio (Anexo 1).

4.3 Tratamiento con soluciones de extractos de Cannabis

Para estudiar el efecto del extracto y metabolitos de Cannabis en fibroblastos, se prepararon diluciones seriadas en DMSO de los compuestos THC, THCA y un extracto completo a concentraciones de 10, 5, 2,5 y 1,25 $\mu\text{g/mL}$, mientras que CBN se preparó a 4,2, 2,1, 1,05 y 0,5 $\mu\text{g/mL}$. (Tapia-Tapia et al., 2024), con el objetivo de evaluar su impacto en los procesos de viabilidad, migración, proliferación celular y expresión génica. Todas las soluciones eran hidroalcohólicas, conteniendo 0,5%, 0,25%, 0,125% y 0,06% de etanol.

4.4 Ensayo de viabilidad por Resazurina

El ensayo de resazurina se utilizó para evaluar la viabilidad de fibroblastos humanos tras 72 horas de exposición a distintos fitocannabinoides, basado en la reducción del colorante resazurina no fluorescente a resorufina fluorescente por la actividad metabólica mitocondrial de células viables (Zhang et al., 2004). Para ello, los fibroblastos se sembraron en placas de 96 pocillos con 200 μL de medio DMEM suplementado con 10% de SBF, penicilina (100 UI/mL) y estreptomycin (10 $\mu\text{g/mL}$), y posteriormente fueron tratados con THC, THCA y un extracto completo a concentraciones de 10, 5, 2,5 y 1,25 $\mu\text{g/mL}$, mientras que el CBN se administró a 4,2, 2,1, 1,05 y 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Además, se incluyeron un control vehículo con el porcentaje equivalente de etanol presente en los extractos y un control blanco solo con medio. Finalizado el periodo de exposición, se añadieron 100 μL de solución de resazurina a cada pocillo y se incubó durante 2 horas a 37°C, midiendo posteriormente la fluorescencia en un lector Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific) para determinar la viabilidad relativa en función de la actividad metabólica de las células tratadas respecto a los controles.

4.5 Estudio de proliferación

La proliferación celular fue evaluada utilizando el kit de proliferación CyQUANT™ (Invitrogen), el cual cuantifica la cantidad de ADN mediante una sonda fluorescente cuya

intensidad es proporcional al número de células presentes (Jones et al., 2001). Los fibroblastos se sembraron en placas de 96 pocillos con 200 μ L de medio DMEM suplementado con 10% de SBF, penicilina (100 UI/mL) y estreptomicina (10 μ g/mL), y posteriormente fueron tratados durante 72 horas con los mismos fitocannabinoides y concentraciones utilizadas en el ensayo de viabilidad. Específicamente, el THC, THCA y el extracto completo se administraron a 10, 5, 2,5 y 1,25 μ g/mL, mientras que el CBN se aplicó a 4,2, 2,1, 1,05 y 0,5 μ g/mL. Además, se incluyeron un control vehículo con el porcentaje equivalente de etanol presente en los extractos y un control blanco solo con medio. Finalizado el periodo de exposición, se procedió a la lisis celular y posterior incubación con el reactivo según el protocolo del fabricante, midiendo la fluorescencia en un lector de placas Varioskan (Thermo Scientific Inc®) con una longitud de onda de excitación de 520 nm y una de emisión de 480 nm para determinar la proliferación relativa respecto a los controles.

4.6 Estudio de migración

La migración celular se evaluó mediante el ensayo de herida (Scratch Wound), una técnica *in vitro* ampliamente utilizada para analizar el desplazamiento celular bajo condiciones controladas (Flores et al., 2021). Para ello, se generó una herida lineal sobre monocapas confluentes de fibroblastos utilizando una punta P-1000, tras lo cual las células fueron tratadas con los extractos de Cannabis en sus concentraciones máximas correspondientes (10 μ g/mL para THC, THCA y extracto completo, y 4,2 μ g/mL para CBN), utilizando medio DMEM suplementado con 1% de SBF. Las imágenes se registraron a las 0, 6 y 24 horas con el fin de cuantificar el cierre de la herida en el tiempo. El análisis morfométrico se realizó mediante el software ImageJ (versión 1.49v; NIH, MD, EE. UU.).

4.7 PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

Para cuantificar la expresión génica relacionada con el proceso de cicatrización, se llevó a cabo una qRT-PCR. Los fibroblastos fueron tratados durante 72 horas con los extractos de Cannabis (10 μ g/mL para THC, THCA y extracto completo, y 4,2 μ g/mL para CBN) en medio DMEM suplementado con 10% de SBF, penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (10 μ g/mL) y Glutamax 2 mM. Posteriormente, se extrajo el RNA total utilizando el kit E.Z.N.A Total RNA (Omega Bio-Tek), y se sintetizó el cDNA mediante el kit M-MLV Reverse Transcriptase (Bioneer).

Se evaluó la expresión de los genes fibronectina (FN), Actina de músculo liso α (SMA), VEGF, Colágeno I y III mediante qRT-PCR utilizando el kit SYBR Green Supermix (BIO-RAD) en un termociclador QuantStudio3 Real-Time PCR (Applied Biosystems), utilizando GAPDH como gen constitutivo.

Gen	Primer sentido (Forward)	Primer antisentido (Reverse)
-----	--------------------------	------------------------------

Col I	5'-GAGGGCCAAGACGAAGACATC-3'	5'-CAGATCACGTCATCGCACAAC-3'(Juhl et al., 2020)
Col III	5'-CTGGACCCCAGGGTCTATTT-3'	5'-CTGTTTCCCACTCCAGGTTC-3'(Juhl et al., 2020)
FN	5'-GGACCAGGACCAACAAAAAC-3'	5'-AGACACTAACCACATACTCCAC-3'
SMA	5'-GCTGTTTTCCCATCCATTGTG-3'	5'-CCTCTTTTGCTCTGTGCTTC-3'
VEGF	5'-AGGGCAGAATCATCACGAAGT-3'	5'-AGGGTCTCGATTGGATGGCA-3'(Diezmos et al., 2013)
GAPDH	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'(Chung et al., 2014)

Tabla 1. Primers utilizados.

4.8 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se presentaron como promedios acompañados de su error estándar en

gráficos. La organización de los datos recolectados se llevó a cabo mediante tablas elaboradas con el programa Microsoft Excel. Los análisis estadísticos y la generación de gráficos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism (versión 6, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EE. UU.). Para estudiar significancia estadística, se utilizó ANOVA seguido del test Tukey's post hoc, para la comparación de diferentes condiciones, mientras que para comparar dos condiciones se utilizó el test T de Student. Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$.

5.- Resultados:

5.1 Viabilidad celular

Con el fin de estudiar la viabilidad celular se realizó un ensayo de resazurina, no se observaron diferencias significativas luego de tratar fibroblastos humanos durante 72 horas con THC, THCA, CBN o el extracto completo a las concentraciones estudiadas. Tanto el control vehículo como el control blanco se mantuvieron como referencia (Figura 2 A,B,C,D), indicando que ninguno de los fitocannabinoides evaluados ejerció efectos citotóxicos bajo estas condiciones experimentales.

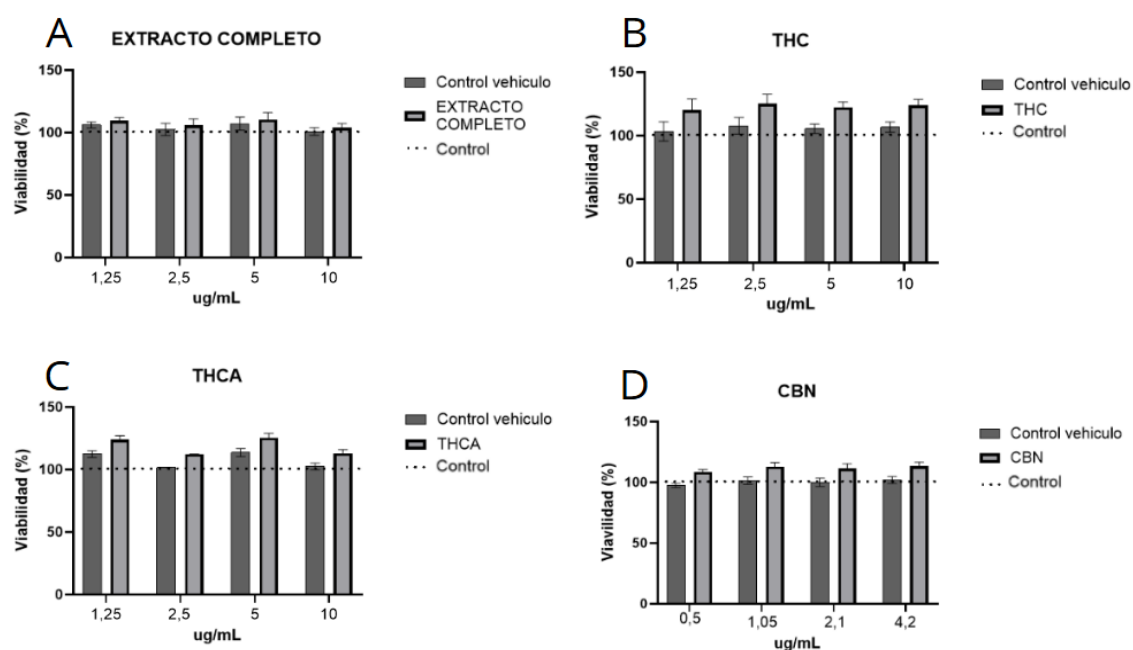


Figura 2. Evaluación de la viabilidad celular en fibroblastos humanos tras 72 horas de tratamiento con (A) extracto completo, (B) THC, (C) THCA y (D) CBN. Los resultados muestran que ninguno de los compuestos evaluados alteró significativamente la viabilidad celular en comparación con el control vehículo. Pruebas estadísticas utilizadas ANOVA seguido del test Tukey's post hoc y el test *t* de Student.

5.2 Proliferación celular

Para evaluar la proliferación celular se utilizó el kit de proliferación CyQUANT™ (Invitrogen), mediante el cual no se detectaron variaciones relevantes frente a las concentraciones estudiadas (Figura 3 A,B,C,D), observándose niveles comparables a los controles. Esto sugiere que la exposición a estos compuestos no modificó la densidad celular ni el crecimiento de la población de fibroblastos.

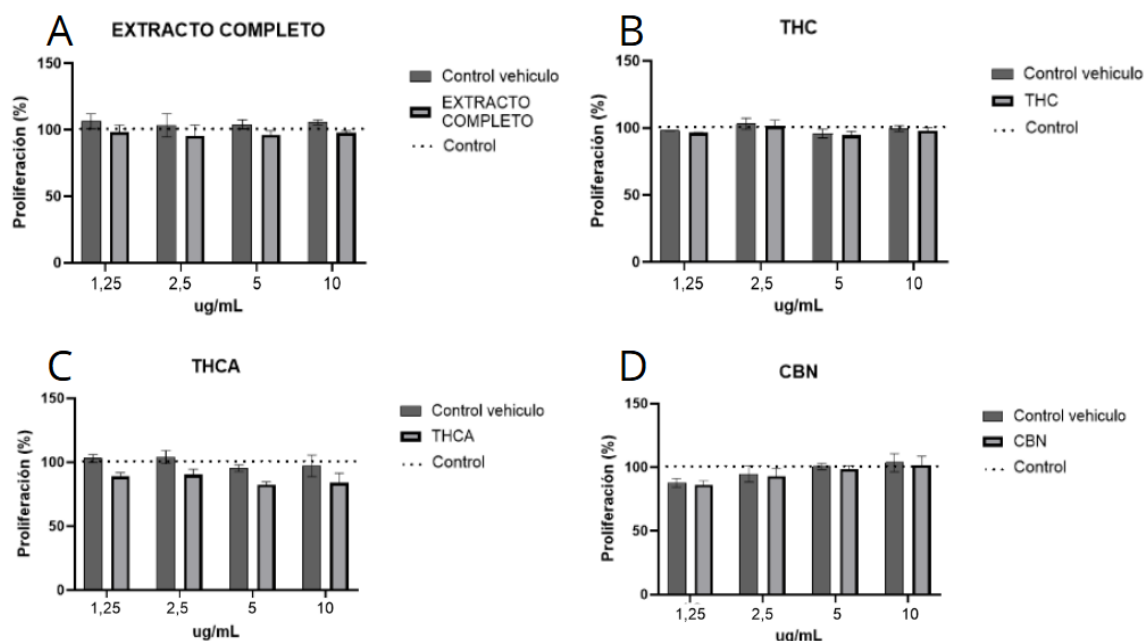
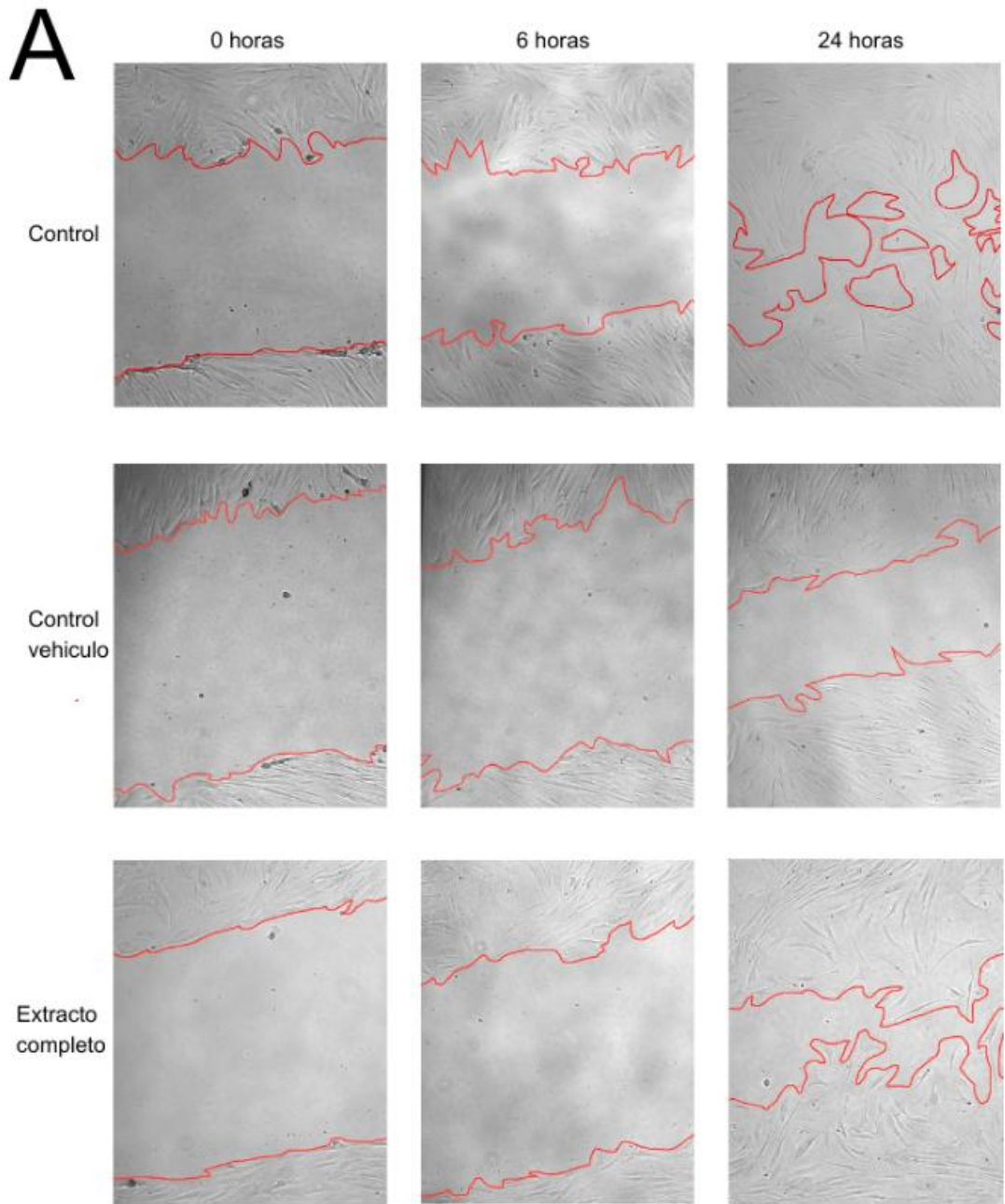
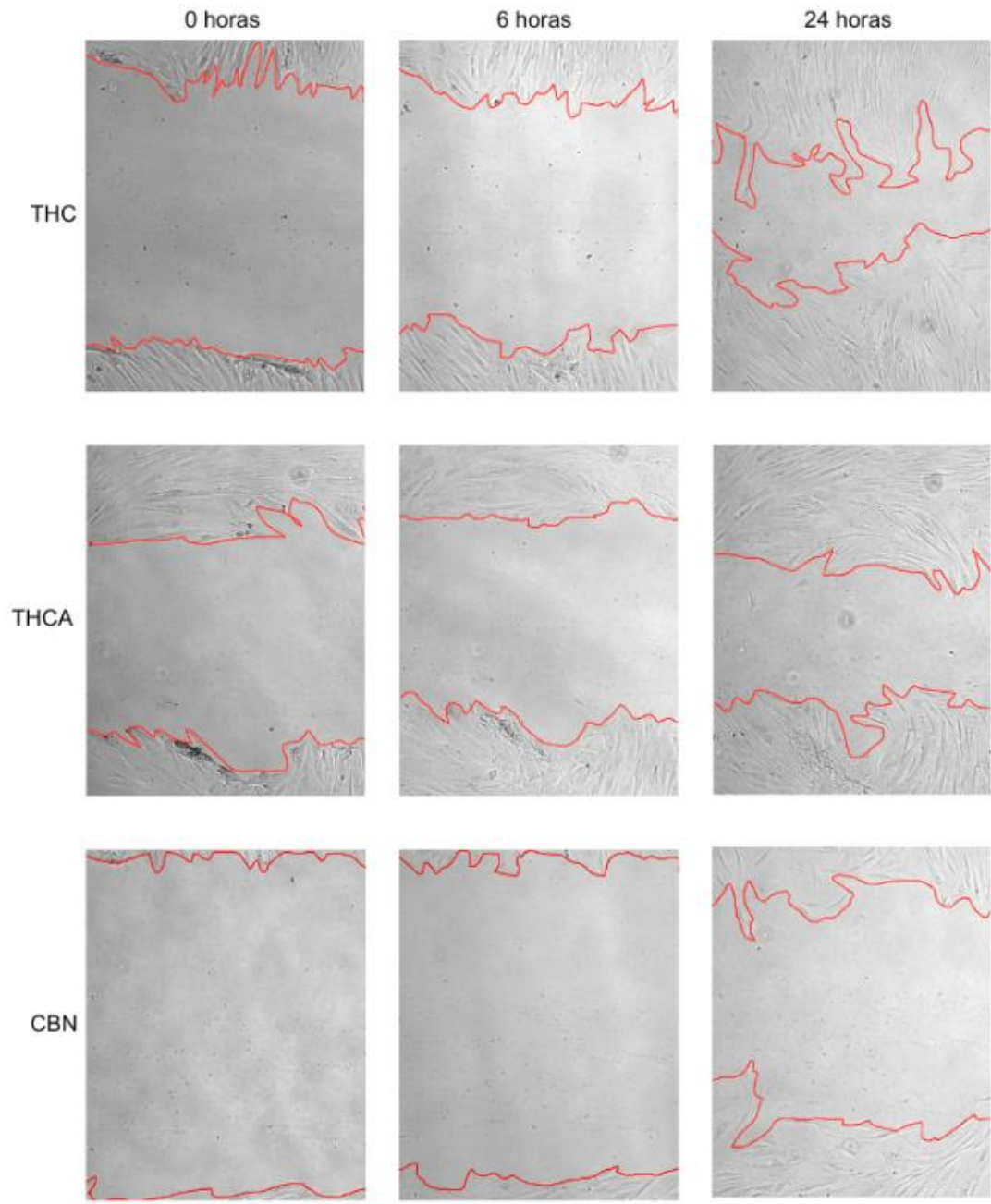


Figura 3. Proliferación de fibroblastos humanos tras 72 horas de exposición a (A) extracto completo, (B) THC, (C) THCA y (D) CBN. Los resultados muestran que ninguno de los tratamientos evaluados produjo cambios significativos en la proliferación celular respecto al control vehículo. En todas las concentraciones analizadas, los valores de proliferación se mantuvieron similares a los controles blanco y vehículo, indicando que el extracto completo y los fitocannabinoides individuales no alteraron la tasa de crecimiento ni la densidad celular bajo las condiciones experimentales utilizadas. Prueba estadística utilizada ANOVA seguido del test Tukey's post hoc y el test T de Student.

5.3 Migración

Para evaluar la migración celular se realizó un ensayo de herida (Scratch Wound). A las 6 horas no se evidenciaron diferencias ni tendencias relevantes entre los grupos experimentales (Figura 4 A,B). En cambio, a las 24 horas el control mostró un cierre aproximado del 80%, constituyéndose como el valor más alto registrado. En contraste, el control vehículo alcanzó aproximadamente un 48% de migración, por lo que este último fue utilizado como referencia para la comparación de los tratamientos (Figura 4 A,C). El extracto completo mostró una migración cercana al 66%, mientras que el THC alcanzó aproximadamente un 57%, ambos muestran una tendencia pero no son significativamente superiores al control vehículo. Por el contrario, el THCA y el CBN evidenciaron una disminución en la capacidad migratoria, con valores de aproximadamente 43% y 41%, respectivamente, inferiores a los obtenidos con el control vehículo (Figura 4 A,C).





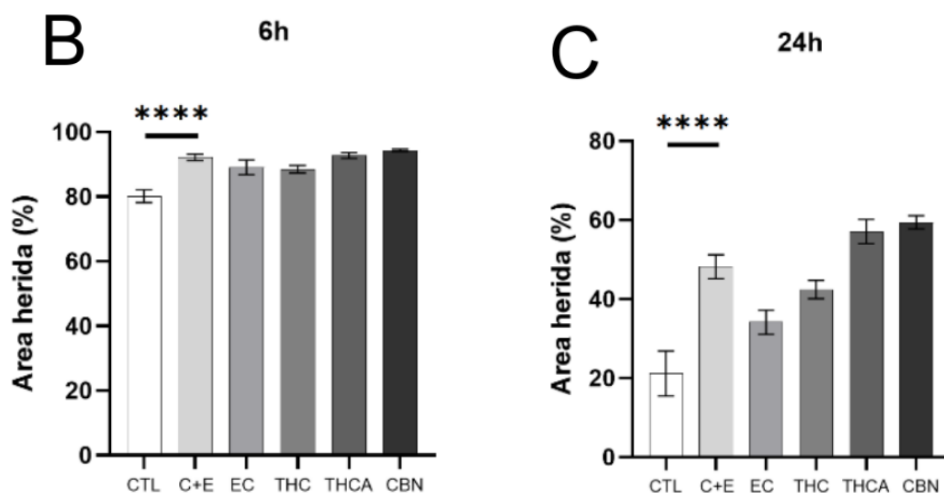


Figura 4. Efecto del extracto completo, THC, THCA y CBN sobre la migración de fibroblastos humanos evaluada mediante ensayo de herida a las (A) 6 y (B) 24 horas. A las 6 horas, el control blanco mostró el mayor cierre de la herida, mientras que el control vehículo presentó una reducción más moderada, siendo utilizado como referencia para el análisis comparativo. Tras 24 horas, el extracto completo y THC mostraron una tendencia a incrementar la migración, aunque sin diferencias significativas respecto al control vehículo. En contraste, el THCA y el CBN exhibieron una reducción en la capacidad migratoria en comparación al control vehículo. Prueba estadísticas utilizadas ANOVA seguido del test Tukey's post hoc. **** $p < 0.0001$.

5.4 PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

Para evaluar la expresión génica se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). La expresión de Col I mostró un incremento en el grupo control con etanol (C+E), alcanzando valores cercanos a 1.6 en comparación con el control (CTL). En contraste, los tratamientos con extracto completo (EC), THC, THCA y CBN se mantuvieron próximos al nivel basal (≈ 1.0) (Figura 5A). En el caso de Col III, no se observaron variaciones relevantes entre los distintos tratamientos, ya que todos los valores permanecieron cercanos al control (Figura 5B).

En FN, C+E presentó el mayor incremento (≈ 1.3 veces el CTL), seguido de EC (≈ 0.8), mientras que THC, THCA y CBN mostraron valores reducidos (≈ 0.5) (Figura 5 C). La expresión de SMA evidenció cambios discretos, con C+E levemente superior al control (≈ 1.2), y el resto de las condiciones entre ≈ 1.0 – 1.1 (Figura 5 D).

Finalmente, VEGF presentó su mayor expresión en C+E (≈ 1.7) y en menor magnitud en EC (≈ 1.3), mientras que THC y CBN mostraron valores inferiores al control (≈ 0.7 – 0.6), y THCA se mantuvo cercana al nivel basal (≈ 1.1) (Figura 5 E).

Dado que el ensayo se realizó con $n = 1$, no se efectuó análisis estadístico; por lo tanto, los resultados no permiten establecer diferencias significativas. Sin embargo, se observa una tendencia consistente a un aumento en los marcadores evaluados bajo la condición C+E y, en menor grado, con EC, mientras que los fitocannabinoides aislados no evidencian cambios relevantes respecto al control.

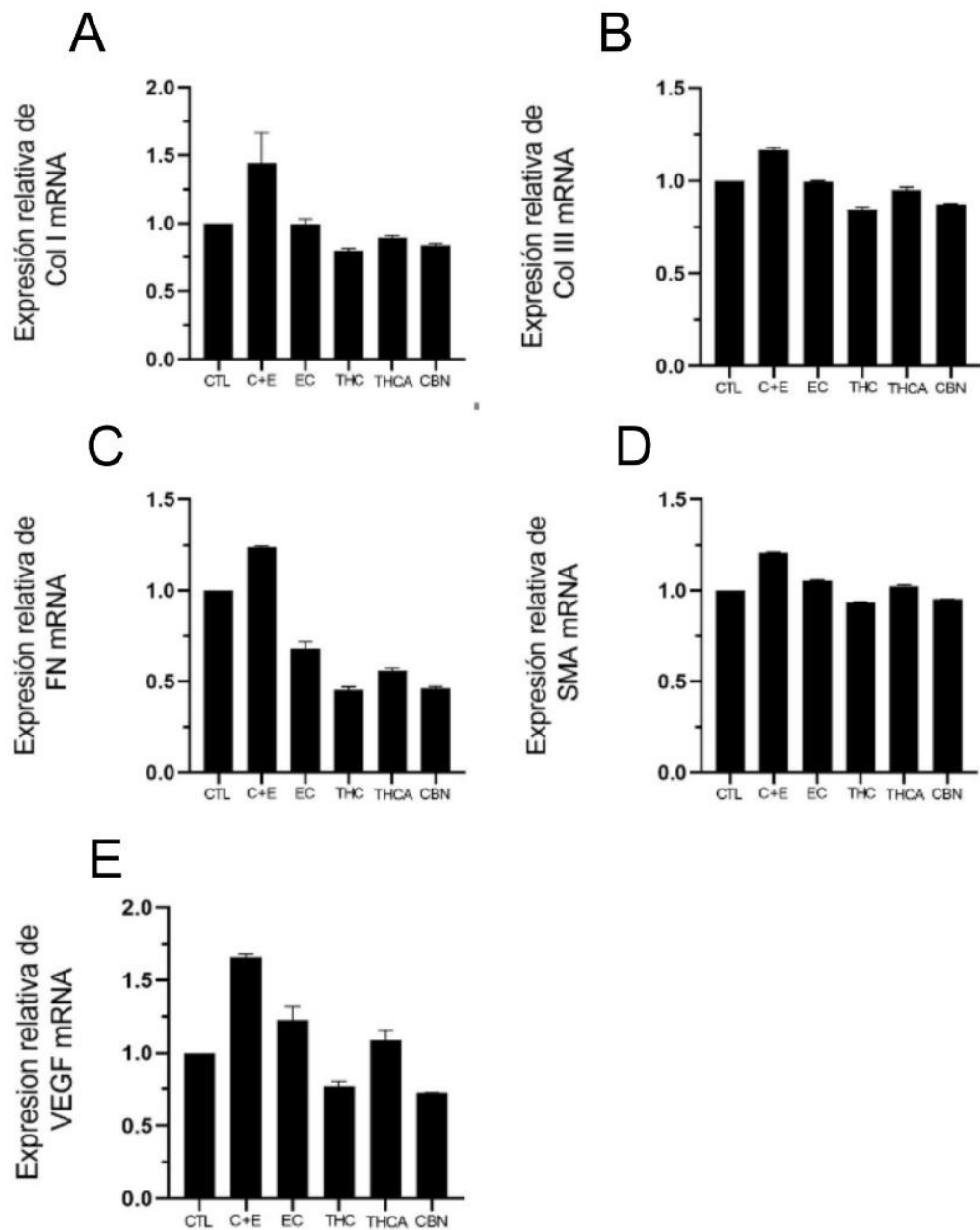


Figura 5. Expresión relativa de genes asociados a matriz extracelular y reparación tisular (A) Col I, (B) Col II, (C) FN, (D) SMA y (E) VEGF en fibroblastos humanos tratados con extracto completo, THC, THCA y CBN. Los análisis de qRT-PCR mostraron que el grupo control con etanol (C+E) presentó el mayor incremento en la expresión de Col I, FN, SMA y VEGF, con valores superiores al control basal. El extracto completo (EC) evidenció un aumento moderado en FN y VEGF, manteniéndose cercano al control en los demás marcadores. En contraste, los fitocannabinoides individuales (THC, THCA y CBN) no mostraron variaciones relevantes, situándose en la mayoría de los casos alrededor o por debajo del nivel basal. La expresión de Col III se mantuvo estable entre todos los tratamientos. Debido a que el ensayo se realizó con $n=1$, no se efectuó análisis estadístico; por lo tanto, los resultados representan únicamente tendencias observadas.

6.- Discusión:

En el presente estudio se evaluó el efecto de los fitocannabinoides sobre la proliferación, viabilidad, migración y expresión génica en fibroblastos dérmicos humanos, con el propósito de explorar su potencial influencia en procesos celulares asociados a la cicatrización. Los resultados mostraron que los extractos derivados de Cannabis no modificaron significativamente la proliferación celular, lo que indica que los fitocannabinoides utilizados no generaron un estímulo proliferativo directo bajo las condiciones experimentales empleadas. De manera concordante, la viabilidad celular permaneció estable en todas las concentraciones evaluadas, evidenciando que los compuestos presentes en los extractos no ejercieron efectos citotóxicos ni comprometieron la integridad metabólica de los fibroblastos. Esto sugiere que los fitocannabinoides podrían actuar como moduladores funcionales sin afectar la supervivencia celular.

En cuanto a la migración, los efectos observados dependieron del tipo de muestra analizada. El extracto completo produjo un aumento significativo de la migración respecto del control vehículo, mientras que el THC individual también mostró un incremento, aunque sin alcanzar significancia estadística. En contraste, el THCA y el CBN generaron una disminución significativa en la capacidad migratoria de los fibroblastos, y el blanco evidenció una migración superior a todas las muestras, incluso por sobre el control vehículo.

La interpretación de estos hallazgos requiere considerar el rol central de los fibroblastos en la reparación tisular. Estas células participan activamente en la síntesis y remodelación de la matriz extracelular, contribuyendo al soporte estructural necesario para la regeneración del tejido. Durante la fase proliferativa, los fibroblastos migran al sitio de la herida, donde se diferencian en miofibroblastos, favoreciendo la contracción del tejido lesionado y la deposición de colágeno tipo I y III (Gurtner et al., 2008). Asimismo, secretan factores de crecimiento como TGF- β , FGF y VEGF, fundamentales para la angiogénesis y la restauración tisular (Bainbridge, 2013). Una actividad fibroblástica adecuada es indispensable, dado que su alteración puede conducir a respuestas reparativas patológicas, como fibrosis o heridas crónicas (Darby et al., 2014; Tracy et al., 2016).

Viabilidad

Los resultados muestran que en las concentraciones evaluadas, el tratamiento con THC, THCA, CBN y el extracto completo no produjo disminución de la viabilidad de los fibroblastos tras 72 horas, indicando ausencia de citotoxicidad bajo estas condiciones específicas. La similitud con el control vehículo confirma que el solvente no influyó en la viabilidad celular, mientras que el control blanco se mantuvo dentro de parámetros normales. Es importante señalar que estos hallazgos no descartan posibles efectos a mayores concentraciones o tiempos de exposición, por lo que se requieren estudios adicionales para determinar si este perfil de seguridad se mantiene fuera del rango experimental utilizado. Lo anterior concuerda con estudios previos en los que se

emplearon otras formas farmacéuticas, pero utilizando la misma concentración evaluada en el presente trabajo (Lapmanee et al., 2024).

Proliferación

En este estudio, la proliferación de los fibroblastos se mantuvo sin cambios frente a la exposición a THC, THCA, CBN y al extracto completo, únicamente en las concentraciones evaluadas, mostrando niveles comparables tanto al control vehículo como al control blanco. Esto indica que, bajo estas condiciones experimentales, los fitocannabinoides no alteraron el crecimiento celular ni la dinámica poblacional durante las 72 horas de tratamiento, estos hallazgos no excluyen la posibilidad de efectos moduladores fuera de las condiciones aplicadas. Estudios previos han demostrado que algunos cannabinoides pueden modificar la proliferación, lo que refuerza la necesidad de evaluar rangos más amplios de concentración, puntos temporales adicionales y marcadores específicos del ciclo celular (Gerasymchuk et al., 2022; Lapmanee et al., 2024).

Migración celular

En los resultados obtenidos en el ensayo de migración se encontraron diferencias relevantes entre las condiciones control, lo que resulta fundamental para interpretar el efecto de los fitocannabinoides evaluados. El control blanco mostró un cierre cercano al 80%, constituyendo la migración más elevada del estudio. Este comportamiento puede explicarse por la ausencia de interferencias externas, ya que el blanco representa un sistema en el que los fibroblastos no están expuestos ni al solvente ni a los compuestos bioactivos. Bajo estas condiciones, las células mantienen su capacidad migratoria basal y sus vías de señalización asociadas al movimiento celular permanecen intactas, lo que favorece un cierre más rápido de la herida.

En contraste, el control vehículo presentó una migración notablemente menor ($\approx 48\%$), lo que sugiere que el etanol utilizado como solvente puede ejercer un efecto modulador o levemente inhibitorio sobre la dinámica celular, afectando procesos como el reordenamiento del citoesqueleto o la interacción célula-matriz (Kar, Gupta, & Bellare, 2021). Por ello, el control vehículo constituye el punto de comparación más adecuado. En este contexto, el extracto completo y el THC mostraron una tendencia a aumentar la migración respecto del control vehículo, lo que sugiere un posible efecto modulador positivo sobre los mecanismos de desplazamiento celular. Este comportamiento podría estar relacionado con la acción sinérgica de múltiples fitocomponentes en el caso del extracto (Russo, 2011), o con una posible modulación de vías de señalización asociadas a la reparación tisular en el caso del THC. Por el contrario, el THCA y el CBN redujeron la migración por debajo del control vehículo, lo que podría indicar que no necesariamente todos los fitocannabinoides ejercen efectos equivalentes sobre los fibroblastos y que sus acciones podrían depender de la estructura química, metabolismo, afinidad por receptores o interacción con mediadores locales (Pertwee, 2008; Kogan & Mechoulam, 2007). Es de suma importancia destacar que esto es una tendencia ya que no se encontraron diferencias significativas en el experimento realizado.

PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

Los fitocannabinoides aislados (THC, THCA y CBN) mostraron niveles cercanos al control en todos los marcadores evaluados, lo que sugiere una ausencia de efecto relevante sobre la expresión de componentes de matriz extracelular y de factores proangiogénicos en las condiciones ensayadas. El extracto completo (EC), por su parte, presentó valores ligeramente superiores al control en fibronectina y VEGF, lo que podría indicar un efecto moderado atribuible a la acción combinada de múltiples fitocannabinoides y terpenos, aunque de menor magnitud comparado con C+E.

Es importante destacar que, debido a que el ensayo se realizó con $n = 1$, no fue posible aplicar análisis estadístico; por lo tanto, los resultados no pueden interpretarse como diferencias significativas. No obstante, las tendencias observadas permiten sugerir que los fitocannabinoides, tanto aislados como en extracto, no inducen cambios marcados en los marcadores analizados bajo las condiciones evaluadas. Estas observaciones deberán confirmarse en futuros ensayos con un tamaño muestral adecuado.

7.- Conclusión:

En conjunto, los resultados del presente estudio demuestran que, bajo las condiciones experimentales y concentraciones evaluadas, los fitocannabinoides analizados no modificaron la viabilidad ni la proliferación de los fibroblastos dérmicos humanos, lo que sugiere un perfil de seguridad celular inicial y la ausencia de efectos citotóxicos o proliferativos directos en este modelo *in vitro*. Por otro lado, los ensayos de migración evidenciaron respuestas diferenciadas según el compuesto, si bien no hubieron diferencias significativas, sí se observaron tendencias, en donde hubo un aumento en la migración asociado al extracto completo y, en menor medida, al THC, mientras que el THCA y el CBN redujeron la capacidad migratoria en comparación con el control vehículo. Estos hallazgos indican que los fitocannabinoides no actúan de manera uniforme sobre los procesos funcionales de los fibroblastos y que su efecto podría depender tanto de la composición química como de la interacción con el microambiente celular.

Desde una perspectiva biológica, estos resultados refuerzan la necesidad de considerar el rol central de los fibroblastos en la reparación tisular y sugieren que determinados fitocannabinoides podrían modular etapas específicas del proceso cicatricial sin comprometer la supervivencia celular. No obstante, las observaciones obtenidas se limitan a las condiciones de concentración, tiempo de exposición y tipo de modelo utilizado.

Finalmente, este estudio establece una base para futuras investigaciones orientadas a comprender el papel de los cannabinoides en la cicatrización.

Bibliografía:

Alhajj, M., & Goyal, A. (2022). Physiology, granulation tissue. En StatPearls. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554402/>

Arenas, R. (2003). Dermatología: Atlas, diagnóstico y tratamiento. McGraw-Hill Interamericana.

Bainbridge, P. (2013). Wound healing and the role of fibroblasts. Journal of Wound Care, 22(8), 407–412. <https://doi.org/10.12968/jowc.2013.22.8.407>

Broughton, G., Janis, J. E., & Attinger, C. E. (2006). The basic science of wound healing. Plastic and Reconstructive Surgery, 117(7S), 12S–34S. <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000225430.42531.c2>

Burgess, S. T. G., Moore, L. J., & Potter, M. A. (2021). Impaired wound healing in type 2 diabetes and obesity: The role of keratinocyte function and differentiation. Wound Repair and Regeneration, 29(2), 222–234. <https://doi.org/10.1111/wrr.12860>

Cases-Perera, O., Blanco-Elices, C., Chato-Astrain, J., Miranda-Fernández, C., Campos, F., Crespo, PV, Sánchez-Montesinos, I., Alaminos, M., Martín -Piedra, MA, & Garzón, I. (2022). Desarrollo de estrategias basadas en secretoma para mejorar los protocolos de cultivo celular en ingeniería de tejidos. Informes Científicos , 12 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14115-y>

Chelliah, M. P., Zinn, Z., Khuu, P., & Teng, J. M. C. (2018). Self-initiated use of topical cannabidiol oil for epidermolysis bullosa. Pediatric Dermatology, 35(4), e224–e227. <https://doi.org/10.1111/pde.13545>

Chung, J.-Y., Song, Y., Wang, Y., Magness, R. R., & Zheng, J. (2004). Differential expression of VEGF, EG-VEGF, and VEGF receptors in human placentas from normal and pre-eclamptic pregnancies. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 89(5), 2484–2490. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-031580>

Correia-Sá, I., Paiva, A., Carvalho, C. M., & Vieira-Coelho, M. A. (2020). Cutaneous endocannabinoid system: Does it have a role on skin wound healing bearing fibrosis? Pharmacological Research, 159, 104862. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2020.104862>

Darby, I. A., Laverdet, B., Bonté, F., & Desmoulière, A. (2014). Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology, 7, 301–311. <https://doi.org/10.2147/CCID.S50046>

Diezmos, E. F., Sandow, S. L., Markus, I., Perera, D. S., Lubowski, D. Z., King, D. W., Bertrand, P. P., & Liu, L. (2013). Expression and localization of pannexin-1 hemichannels

in human colon in health and disease. *Neurogastroenterology & Motility*, 25(6), e395-e405.

<https://doi.org/10.1111/nmo.12130>

ElSohly, M. A., & Gul, W. (2014). Constituents of *Cannabis sativa*. In R. G. Pertwee (Ed.), *Handbook of Cannabis* (pp. 3–22). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199662685.003.0001>

Esteo, F. J. G., Castellano, J. M. G., Martínez, J. G., & López, J. M. (2005). Fundamentos de los procesos de reparación tisular: factores de crecimiento. *Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología*, 49(5), 323–333. [https://doi.org/10.1016/S0482-5985\(05\)74461-8](https://doi.org/10.1016/S0482-5985(05)74461-8)

Etemad, L., Karimi, G., Alavi, M. S., & Roohbakhsh, A. (2022). Pharmacological effects of cannabidiol by transient receptor potential channels. *Life Sciences*, 297, 120456. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35483477/>

Flores-Muñoz, C., Maripillán, J., Vásquez-Navarrete, J., Novoa-Molina, J., Ceriani, R., Sánchez, H. A., Abbott, A. C., Weinstein-Opppenheimer, C., Brown, D. I., Cárdenas, A. M., García, I. E., & Martínez, A. D. (2021). Restraint of human skin fibroblast motility, migration, and cell surface actin dynamics, by Pannexin 1 and P2X7 receptor signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1069. <https://doi.org/10.3390/ijms22031069>

Gerasymchuk, M., Robinson, G. I., Groves, A., Haselhorst, L., Tindall, A. J., & Moses, C. (2022). Phytocannabinoids stimulate rejuvenation and prevent cellular senescence in human dermal fibroblasts. *Cells*, 11(23), 3939. <https://doi.org/10.3390/cells11233939>

Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y., & Longaker, M. T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature*, 453(7193), 314–321. <https://doi.org/10.1038/nature07039>

Han, G., & Ceilley, R. (2017). Chronic wound healing: A review of current management and treatments. *Advances in Therapy*, 34(3), 599–610. <https://doi.org/10.1007/s12325-017-0478-y>

Healy, D., Rizvi, S. A., Chen, J., & Kirsner, R. (2023a). A systematic review of phases in wound healing and their biological markers. *Wound Repair and Regeneration*, 31(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2023.115714>

Healy, D., Rizvi, S. A., Zhang, Q., & Kirsner, R. (2023b). Cannabinoid receptor modulation in skin: A potential therapeutic target in wound healing. *Journal of Investigative Dermatology*, 143(3), 522–532. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2023.115714>

Hu, Z., Qin, Z., Xie, J., Qu, Y., & Yin, L. (2024). Cannabidiol and its application in the treatment of oral diseases: Therapeutic potentials, routes of administration and

prospects. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 171, 115252.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332224001525>

Ibsen, M. S., Connor, M., & Glass, M. (2017). Cannabinoid CB1 and CB2 receptor signaling and bias. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 2(1), 48–60.
<https://doi.org/10.1089/can.2016.0037>

Izzo, A. A., Borrelli, F., Capasso, R., Di Marzo, V., & Mechoulam, R. (2009). Non-psychoactive plant cannabinoids: New therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(10), 515–527.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.07.006>

Janis, J. E., & Harrison, B. (2010). Wound healing: Part I. Basic science. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 126(2), 38e–48e.
<https://doi.org/10.1097/prs.0000000000002773>

Jones, L. J., Gray, M., Yue, S. T., Haugland, R. P., & Singer, V. L. (2001). Sensitive determination of cell number using the CyQUANT cell proliferation assay. *Journal of immunological methods*, 254(1-2), 85–98. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(01\)00404-5](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(01)00404-5)

Juhl, P., Bondesen, S., Hawkins, C. L., Karsdal, M. A., Bay-Jensen, A.-C., Davies, M. J., & Siebuhr, A. S. (2020). Dermal fibroblasts have different extracellular matrix profiles induced by TGF- β , PDGF and IL-6 in a model for skin fibrosis. *Scientific Reports*, 10(1), 17300.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-74179-6>

Kar, N., Gupta, D., & Bellare, J. (2021). Ethanol affects fibroblast behavior differentially at low and high doses: A comprehensive, dose-response evaluation. *Toxicology reports*, 8, 1054–1066. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.05.007>

Kogan, N. M., & Mechoulam, R. (2007). Cannabinoids in health and disease. *Dialogues in clinical neuroscience*, 9(4), 413–430. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2007.9.4/nkogan>

Lapmanee, S., Bhubhanil, S., Charoenphon, N., Inchan, A., & Pongkulapa, T. (2024). Lipid nanoparticles incorporated in polyvinyl alcohol and sodium alginate hydrogel scaffold for enhancing cell migration and accelerating wound healing. *Gels*, 10(12), 843.
<https://doi.org/10.3390/gels10120843>

Lawrence, W. T. (1998). Physiology of the acute wound. *Clinics in Plastic Surgery*, 25(3), 321–340. PMID: 9696896

Li, J., Chen, J., & Kirsner, R. (2007). Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology*, 25(1), 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2006.09.007>

Lisignoli, G., Toneguzzi, S., Pozzi, C., Piacentini, A., Della Casa, G., Grassi, F., Facchini, A., & Ferruzzi, A. (1999). Proinflammatory cytokines and chemokine production and expression by human osteoblasts isolated from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *The Journal of Rheumatology*, 26(9), 1993–2001. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10229398/>

Loots, M. A. M., Lamme, E. N., Zeegelaar, J., Mekkes, J. R., Bos, J. D., & Middelkoop, E. (1998). Differences in cellular infiltrate and extracellular matrix of chronic diabetic and venous ulcers versus acute wounds. *Journal of Investigative Dermatology*, 111(5), 850–857. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1998.00381.x>

Maida, V., & Corban, J. (2020). Topical medical cannabis: A new treatment for wound pain—Three cases of pyoderma gangrenosum. *Journal of Pain and Symptom Management*, 59(2), e5–e9. <https://doi.org/10.1111/iwj.13484>

Maida, V., Daeninck, P., & Zagaria, M. (2021). The effective use of cannabinoids in the management of chronic wounds. *Pain Management Nursing*, 22(3), 294–297.

Martins, A. M., et al. (2022). Cannabis-based products for the treatment of skin inflammatory diseases: A timely review. *Pharmaceuticals*, 15(2), 210. <https://doi.org/10.1111/exd.14395>

Miot, H. A., Miot, L. D. B., & Marques, M. E. A. (2011). Estrutura e função da pele normal. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 86(3), 279–289. <https://www.anaisdedermatologia.org.br/en-aspectos-ultraestruturais-da-pele-na-articulo-S2666275221002186>

Palmeira, M. H. D., Silva, F. H. D., & Franco, T. R. (2006). Estrutura e função da pele: Uma revisão. *Revista Brasileira de Medicina*, 63(6), 281–285.

Pertwee, R. G. (2008). The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabivarin. *British Journal of Pharmacology*, 153(2), 199–215. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707442>

Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., & Lambris, J. D. (2010). Complement: A key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature Immunology*, 11(9), 785–797. <https://doi.org/10.1038/ni.1923>

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>

Rock, E. M., Bolognini, D., Limebeer, C. L., Cascio, M. G., Anavi-Goffer, S., Fletcher, P. J., ... & Parker, L. A. (2013). Cannabinoid acid inhibition of nausea and vomiting via 5-

HT1A receptors. British Journal of Pharmacology, 168(6), 1456–1470. <https://doi.org/10.1111/bph.12043>

Roque-Bravo, A., Guimarães, M., & Costa, J. (2024). Synthetic cannabinoids and wound healing: Molecular evidence and toxicological impact. Frontiers in Pharmacology, 15, 1234567. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-031122-113758>

Russo, E. B. (2011). Taming THC: Potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. British Journal of Pharmacology, 163(7), 1344–1364. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01238.x>

Senet, P. (2008). Fisiología de la cicatrización cutánea. EMC - Dermatología, 41(3), 1–17. [https://doi.org/10.1016/S1761-2896\(08\)70356-X](https://doi.org/10.1016/S1761-2896(08)70356-X)

Shang, Y., & Tang, Y. (2017). The central cannabinoid receptor type-2 (CB2) and chronic pain. The International journal of neuroscience, 127(9), 812–823. <https://doi.org/10.1080/00207454.2016.1257992>

Singer, A. J., & Clark, R. A. F. (1999). Cutaneous wound healing. New England Journal of Medicine, 341(10), 738–746. <https://doi.org/10.1056/NEJM199909023411006>

Soria-Lara, D. M., Gaitán-Vélez, B. V., Jiménez-Islas, H., & Miranda-López, R. (2019). El Sistema de Endocannabinoides como regulador de la lipogénesis y su posible modulación por la mangiferina. Revista biomédica, 30(2). <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v30i2.638>

Ständer, S., Schmelz, M., Metze, D., Luger, T., & Rukwied, R. (2005). Distribution of cannabinoid receptor 1 (CB1) and 2 (CB2) on sensory nerve fibers and adnexal structures in human skin. Journal of dermatological science, 38(3), 177–188. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2005.01.007>

Tapia-Tapia, E., Aránguiz, P., Diaz, R. et al. Effect of *Cannabis sativa* L. extracts, phytocannabinoids and their acetylated derivatives on the SHSY-5Y neuroblastoma cells' viability and caspases 3/7 activation. Biol Res 57, 33 (2024). <https://doi.org/10.1186/s40659-024-00506-0>

Tóth, B. I., Dobrosi, N., Dajnoki, A., Czifra, G., Oláh, A., Szöllosi, A. G., Juhász, I., Sugawara, K., Paus, R., & Bíró, T. (2011). Endocannabinoids modulate human epidermal keratinocyte proliferation and survival via the sequential engagement of cannabinoid receptor-1 and transient receptor potential vanilloid-1. The Journal of investigative dermatology, 131(5), 1095–1104. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.421>

Tsuboi, K., Uyama, T., Okamoto, Y., & Ueda, N. (2018). Endocannabinoids and related N-acylethanolamines: Biological activities and metabolism Makoto Murakami. In Inflammation and Regeneration (Vol. 38, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s41232-018-0086-5>

Turcotte, C., Chouinard, F., Lefebvre, J. S., & Flamand, N. (2015). Regulation of inflammation by cannabinoids and endocannabinoids. *Journal of Leukocyte Biology*, 97(6), 1049–1070. <https://doi.org/10.1189/jlb.3RU0115-021R>

Velnar, T., Bailey, T., & Smrkolj, V. (2009). The wound healing process: An overview of the cellular and molecular mechanisms. *Journal of International Medical Research*, 37(5), 1528–1542. <https://doi.org/10.1177/147323000903700531>

Volk, S. W., Wang, Y., Mauldin, E. A., Liechty, K. W., & Adams, S. L. (2011). Diminished type III collagen promotes myofibroblast differentiation and increases scar deposition in cutaneous wound healing. *Cells Tissues Organs*, 194(1), 25–37. <https://doi.org/10.1159/000324495>

Wiley, J. L., Marusich, J. A., & Huffman, J. W. (2014). Moving around the molecule: relationship between chemical structure and *in vivo* activity of synthetic cannabinoids. *Life sciences*, 97(1), 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.09.011>

Witte, M. B., & Barbul, A. (1997). General principles of wound healing. *The Surgical clinics of North America*, 77(3), 509–528. [https://doi.org/10.1016/s0039-6109\(05\)70566-1](https://doi.org/10.1016/s0039-6109(05)70566-1)

Zagórska-Dziok, M., et al. (2021). Positive effect of *Cannabis sativa* L. herb extracts on skin cells and assessment of cannabinoid-based hydrogels properties. *Molecules*, 26(4), 802. <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/4/802>

Zhang, HX, Du, GH y Zhang, JT (2004). Ensayo de funciones mitocondriales mediante resazurina *in vitro*. *Acta farmacológica Sinica* , 25 (3), 385–389.

Zhao, C., Dong, Y., Liu, J., Cai, H., Li, Z., Sun, X., Yin, W., Ma, J., Liu, H., & Li, S. (2021). An enzyme-responsive Gp1a-hydrogel for skin wound healing. *Journal of Biomaterials Applications*, 36(4), 714–721. <https://doi.org/10.1177/08853282211012870>

ANEXOS

(1) Resolución de autorización de uso de *Cannabis Sativa* L. para investigación



Ref.: 12529/18
VBE/apa

5514 08.10.2018

SANTIAGO,

VISTO ESTOS ANTECEDENTES: la solicitud del Q. F. Héctor Rojas Campusano, Director Técnico de Knop Laboratorios S.A., por la que solicita autorización para trasladar desde Knop Laboratorios S.A., ubicado en Av. Industrial N° 1198, Quilpué, Región de Valparaíso, hasta la Universidad de Valparaíso (QUIFAC), ubicada en Av. Gran Bretaña N° 1093, Playa Ancha, Valparaíso, la muestra de **Hierba Cannabis Sativa** indicada en la parte resolutive; y

CONSIDERANDO: que la muestra será trasladada a la Universidad de Valparaíso (QUIFAC), para proyecto de investigación; y

TENIENDO PRESENTE: lo dispuesto en el Código Sanitario, Decreto con Fuerza de Ley N° 725 de 1968, los Reglamentos de Estupefacientes y de Productos Psicotrópicos; aprobados por los Decretos Supremos N° 404/83 y N° 405/83, del Ministerio de Salud; los artículos 59° letra b) y 61° letra b) del DFL N° 1 de 2005 y las facultades delegadas por la Resolución N° 977 de 19/03/2015 de la Dirección del Instituto de Salud Pública de Chile, dicto lo siguiente:

RESOLUCIÓN

1.- **AUTORIZASE** a Knop Laboratorios S.A., para trasladar a la Universidad de Valparaíso (QUIFAC) la muestra de droga estupefaciente que a continuación se señala:

Droga a trasladar	Cantidad	Desde	Hasta
Hierba Cannabis Sativa	5230 gramos	Knop Laboratorios S.A. Av. Industrial N° 1198, Quilpué, Región de Valparaíso	Universidad de Valparaíso (QUIFAC) Av. Gran Bretaña N° 1093, Playa Ancha, Valparaíso

2.- **DÉJESE ESTABLECIDO** que el Q.F. Rodrigo Díaz V., Director Técnico de la Universidad de Valparaíso (QUIFAC), será responsable de la tenencia y almacenamiento del producto en las nuevas dependencias.

ANÓTESE Y COMUNÍQUESE

AGENCIA NACIONAL DE MEDICAMENTOS
Subdepartamento Control de Comercio Exterior,
Estupefacientes y Psicotrópicos
INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA DE CHILE



Q.F. CARLOS BRAVO GOLDSMITH
JEFE SUBDEPARTAMENTO CONTROL COMERCIO EXTERIOR,
ESTUPEFACIENTES Y PSICOTRÓPICOS
DEPARTAMENTO AGENCIA NACIONAL DE MEDICAMENTOS
INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA DE CHILE

DISTRIBUCIÓN:
- Area Laboratorios S.A.
- Universidad de Valparaíso (QUIFAC)
- Gestión de Trámites



Av. Marconi, 2.000, Reñosa, Santiago
 Correo 44 (Cero cuarenta y cuatro) - Código Postal 7700000
 Línea Central: (56-2)275 11 01
 Informaciones: (56-2)275 52 00
www.isp.chile