

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Evaluación de la presencia y actividad de
receptores cannabinoides en pulpa dental y
odontoblastos humanos**

Laura Marcela Navarro Saiz

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Odontología, Maestría en Odontología
Bogotá, Colombia
2022

Evaluación de la presencia y actividad de receptores cannabinoides en pulpa dental y odontoblastos humanos

Laura Marcela Navarro Saiz

Documento resultado de tesis, presentado como requisito parcial para optar al título de: **Magíster en Odontología**

Director:

Jaime E. Castellanos MSc, PhD

Profesor Titular, Departamento de Ciencias Básicas y Medicina Oral.

Facultad de Odontología Universidad Nacional de Colombia

Codirectora:

Lilia Jadith Bernal Cepeda MSc

Profesor Asociado, Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

Grupo de Investigación:

Investigación Básica y Aplicada en Odontología (IBAPO)

Declaración de obra original

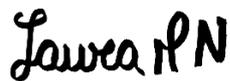
Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Laura Marcela Navarro

Fecha 5/07/22

Resumen

Evaluación de la presencia y actividad de receptores cannabinoides en pulpa dental y odontoblastos humanos

La inflamación, la sensibilidad y el dolor dental continúan siendo un reto en la práctica odontológica, es por esa razón que la búsqueda de alternativas farmacológicas para su control es una necesidad. En ese sentido los receptores cannabinoides CB1 y CB2 resultan una alternativa para ser utilizados como nuevos blancos terapéuticos. Dado que no se encontró evidencia en la literatura de su presencia en la pulpa dental y en odontoblastos en condiciones de inflamación, este trabajo de tesis tuvo como objetivo evaluar su expresión y funcionalidad en esas condiciones. Este trabajo está dividido en 4 capítulos: en el Capítulo 1 se realizó una revisión bibliográfica en la que se exploró la fisiología de los cannabinoides y de ambos receptores. Dado que no se encontró evidencia de la validación de genes de referencia en odontoblastos humanos en contexto inflamatorio, en el Capítulo 2 se describió una estrategia metodológica para la elección de los genes de referencia más adecuados para la realización de la cuantificación relativa de los receptores cannabinoides por medio de RT-qPCR. En el siguiente Capítulo, se comparó la presencia y actividad de receptores cannabinoides en odontoblastos humanos y en fibroblastos gingivales ya que ambas células tienen un papel importante en la modulación de la inflamación y el dolor en pulpitis y periodontitis. Finalmente, en el Capítulo 4 se evalúa la presencia de CB1 y CB2 en pulpas dentales y la presencia y actividad en cultivo de odontoblastos humanos en condiciones de inflamación. Esto permitió aportar luces sobre el papel de los receptores cannabinoides en el dolor e inflamación en odontología, y además de comprobar su expresión y modulación en células y tejidos dentales, abriendo paso a nuevas investigaciones que usen agonistas de ambos receptores para el control del dolor y la inflamación en encía y pulpa dental.

Palabras clave: Odontoblastos; Dolor dental; Receptor cannabinoide 1 (CB1); Receptor cannabinoide 2 (CB2); Pulpa dental.

Abstract

Evaluation of the presence and activity of cannabinoid receptors in dental pulp and human odontoblasts.

Inflammation, sensitivity and dental pain continue to be a challenge in dental practice, which is why the search for pharmacological alternatives for their control is a necessity.

In this sense, CB1 and CB2 cannabinoid receptors are an alternative to be used as new therapeutic targets. Since no evidence was found in the literature of their presence in dental pulp and odontoblasts under inflammatory conditions, the aim of this thesis was to evaluate their expression and functionality under these conditions. This work is divided into 4 chapters: in Chapter 1, a literature review was conducted in which the physiology of cannabinoids and both receptors was explored. Since no evidence was found for the validation of reference genes in human odontoblasts in an inflammatory context, Chapter 2 described a methodological strategy for the choice of the most suitable reference genes for the relative quantification of cannabinoid receptors by RT-qPCR. In the next chapter, the presence and activity of cannabinoid receptors in human odontoblasts and gingival fibroblasts were compared as both cells play an important role in the modulation of inflammation and pain in pulpitis and periodontitis. Finally, Chapter 4 evaluates the presence of CB1 and CB2 in dental pulps and the presence and activity in cultured human odontoblasts under inflammatory conditions. This allowed us to shed light on the role of cannabinoid receptors in pain and inflammation in dentistry, and also to verify their expression and modulation in dental cells and tissues, opening the way to new research using agonists of both receptors for the control of pain and inflammation in gingiva and dental pulp.

Keywords: Odontoblasts; Dental pain; Cannabinoid receptor 1 (CB1); Cannabinoid receptor 2 (CB2); Dental pulp.

TABLA DE CONTENIDO

Introducción	8
CAPÍTULO 1	9
Fisiología y modulación farmacológica de los receptores cannabinoides CB1 y CB2	9
Introducción	10
Metodología	10
Resultados	11
Odontoblastos	11
Sistema endocannabinoide	12
Receptores cannabinoides	12
Regulación de la expresión de CB1 y CB2 en condiciones patológicas	35
Señalización de los receptores cannabinoides	35
Ligandos de CB1 y CB2	35
Agonismo sesgado	35

Agonismo del cannabis de espectro completo	35
Efecto antiinflamatorio y antinociceptivo de los agonistas CB1 y CB2	35
Conclusiones	35
Referencias	35
CAPÍTULO 2	35
Validación de genes de referencia para la cuantificación relativa de la expresión de receptores cannabinoides en odontoblastos humanos mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa	35
Introducción	36
Diseño de primers	38
Cultivo celular	39
Validación de genes	39
Análisis de datos	40
Resultados	40
Discusión	41
Conclusiones	43
Declaración de conflicto de intereses	44
Financiación	44
Agradecimientos	44
Referencias	44
CAPÍTULO 3	46
Los desafíos inmunológicos regulan la expresión de los receptores cannabinoides en cultivos de odontoblastos y fibroblastos gingivales humanos	46
Resumen	46
Introducción	47
Materiales y métodos	48
Cultivo celular	48
Transcripción de CB1 y CB2 por RT-qPCR multiplex en OLC y HGF	49
Transcripción de CB1 y CB2 durante los estímulos inflamatorios en OLC	49
Detección de las proteínas CB1 y CB2 en OLC y HGF	50
Agonistas, antagonistas y medición del Ca ²⁺ intracelular	50
Análisis de los datos	51
Resultados	51
Los odontoblastos y los fibroblastos gingivales expresan CB1 y CB2, y están sobreexpresados en entorno inflamatorio	51
Los odontoblastos y los fibroblastos gingivales expresan proteínas CB1 y CB2	51
El CBD aumenta las concentraciones de calcio intracelular en los odontoblastos y los fibroblastos gingivales	1
Conclusiones	3

Agradecimientos	3
Declaración de conflicto de intereses	4
Financiación	4
Referencias	4
CAPÍTULO 4	7
Evaluación de la presencia y actividad de receptores cannabinoides en pulpa dental y odontoblastos humanos	7
Resumen	7
Metodología	9
Cultivo celular y cortes histológicos	9
Cuantificación de transcritos	10
Detección y cuantificación de receptores cannabinoides	10
Evaluación de la actividad de cannabinoides sobre los receptores	11
Análisis de datos	11
Resultados	12
Odontoblastos humanos en condiciones de inflamación sobre-expresan receptores cannabinoides.	12
En pulpa dental humana se expresan receptores cannabinoides, se encuentran sobre-expresados en tejido inflamado	12
Los receptores cannabinoides CB1 y CB2 son regulados fisiológicamente en ambiente inflamatorio	12
Discusión	13
Conclusiones	17
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	20
ASPECTOS ÉTICOS	21
AGRADECIMIENTOS	21
FINANCIACIÓN	21
PRODUCTOS	21
ANEXOS	23

Introducción

La inflamación, la sensibilidad y el dolor dental continúan siendo un reto en la práctica odontológica, es por esa razón que la búsqueda de alternativas farmacológicas para su control es una necesidad. En ese sentido los receptores cannabinoides CB1 y CB2 resultan una alternativa para ser utilizados como nuevos blancos terapéuticos. Dado que no se encontró evidencia en la literatura de su presencia en la pulpa dental y en odontoblastos en condiciones de inflamación, este trabajo de tesis tuvo como objetivo evaluar su expresión y funcionalidad en esas condiciones. Este trabajo está dividido en 4 capítulos: en el Capítulo 1 se realizó una revisión bibliográfica en la que se exploró la fisiología de los cannabinoides y de ambos receptores. Dado que no se

encontró evidencia de la validación de genes de referencia en odontoblastos humanos en contexto inflamatorio, en el Capítulo 2 se describió una estrategia metodológica para la elección de los genes de referencia más adecuados para la realización de la cuantificación relativa de los receptores cannabinoides por medio de RT-qPCR. En el siguiente Capítulo, se comparó la presencia y actividad de receptores cannabinoides en odontoblastos humanos y en fibroblastos gingivales ya que ambas células tienen un papel importante en la modulación de la inflamación y el dolor en pulpitis y periodontitis. Finalmente, en el Capítulo 4 se evalúa la presencia de CB1 y CB2 en pulpas dentales y la presencia y actividad en cultivo de odontoblastos humanos en condiciones de inflamación. Esto permitió aportar luces sobre el papel de los receptores cannabinoides en el dolor e inflamación en odontología, y además de comprobar su expresión y modulación en células y tejidos dentales, abriendo paso a nuevas investigaciones que usen agonistas de ambos receptores para el control del dolor y la inflamación en encía y pulpa dental.

CAPÍTULO 1

Fisiología y modulación farmacológica de los receptores cannabinoides CB1 y CB2

Laura M. Navarro-Saiz, Lilia J. Bernal-Cepeda, Jaime E. Castellanos.

Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Odontología, Departamento de Ciencias Básicas y Medicina Oral, Grupo de Investigaciones Básicas y Aplicadas en Odontología-IBAPO, Bogotá, Colombia.

Palabras clave: Cannabinoid receptors, signaling pathways, biased agonism, GPCR

Introducción

La pulpa dental es un tejido altamente innervado, irrigado y contenido en una cavidad rígida, lo que hace que su inflamación conduzca a dolor casi siempre severo. Las terminaciones nerviosas encontradas en la pulpa son las fibras A delta y C, las cuales parten del ganglio trigeminal y del ganglio cervical superior (1-3).

La vía somatosensorial del trigémino es la que transporta el dolor dental, el proceso inicia cuando un estímulo activa los nociceptores los cuales son activados por algógenos como potasio, serotonina, bradicinina, histamina, ATP, prostaglandinas y leucotrienos. Los diferentes estímulos son transducidos a señales eléctricas, que viajan al ganglio y desde allí son llevadas al SNC, primero al tallo cerebral en el caso del trigémino y a la médula, las del ganglio cervical a las astas posteriores donde hacen la primera sinapsis, luego neuronas de segundo orden llevan el impulso al tallo cerebral y al tálamo donde es direccionada a la corteza cerebral al área sensitiva primaria y secundaria que es donde finalmente se integra y percibe el dolor (1,4).

Se han propuesto varias teorías para explicar la sensibilidad dental, la primera es la teoría neural la cual indica que las terminaciones nerviosas dentro del túbulo dentinal directamente responden al estímulo. La segunda es la teoría hidrodinámica que establece que el movimiento del fluido dentinal provocado por cambios térmicos y osmóticos es detectado por las terminaciones nerviosas cerca de la dentina. Por último, se ha propuesto la teoría de la transducción odontoblástica la cual plantea que el odontoblasto por sí mismo puede actuar como transductor nociceptivo, pues expresa diferentes receptores capaces de detectar señales mecánicas, térmicas y químicas (5). En muchos trabajos se sugiere que podría existir una combinación de estos mecanismos, los que no deberían considerarse por separado ya que representan un sistema sensorial polimodal responsable de la sensibilidad dentinal (6). En ese sentido, el objetivo de esta revisión fue presentar la evidencia que permita hacer una mejor comprensión de la fisiología y modulación de los receptores cannabinoides.

Metodología

Se realizó una búsqueda bibliográfica en las bases de datos PubMed (MeSH), Scopus y SciELO de artículos publicados en inglés y español desde 2001 hasta la fecha. Los términos de búsqueda incluyeron: "Odontoblast" "Cannabinoid receptors" y "molecular anatomy"; "Cannabinoid receptors" y "expression"; "Cannabinoid receptors" y "signaling pathways"; "GPCR" y "biased agonism"; "GPCR" y "selective agonism"; "Cannabinoid receptors" y "pain", "Cannabinoids" y "antinociception"; "Cannabinoids" y "antiinflammatory". Se excluyeron los estudios duplicados de los artículos recuperados. En el primer paso, se examinaron los títulos y los resúmenes para confirmar la relevancia, seguido de una revisión del texto completo de los artículos

seleccionados. Finalmente, se incluyeron 55 estudios y la información extraída se organizó en una hoja de cálculo (Excel, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) para facilitar el análisis. En la figura 1.1 se presenta un diagrama de flujo del método de búsqueda.

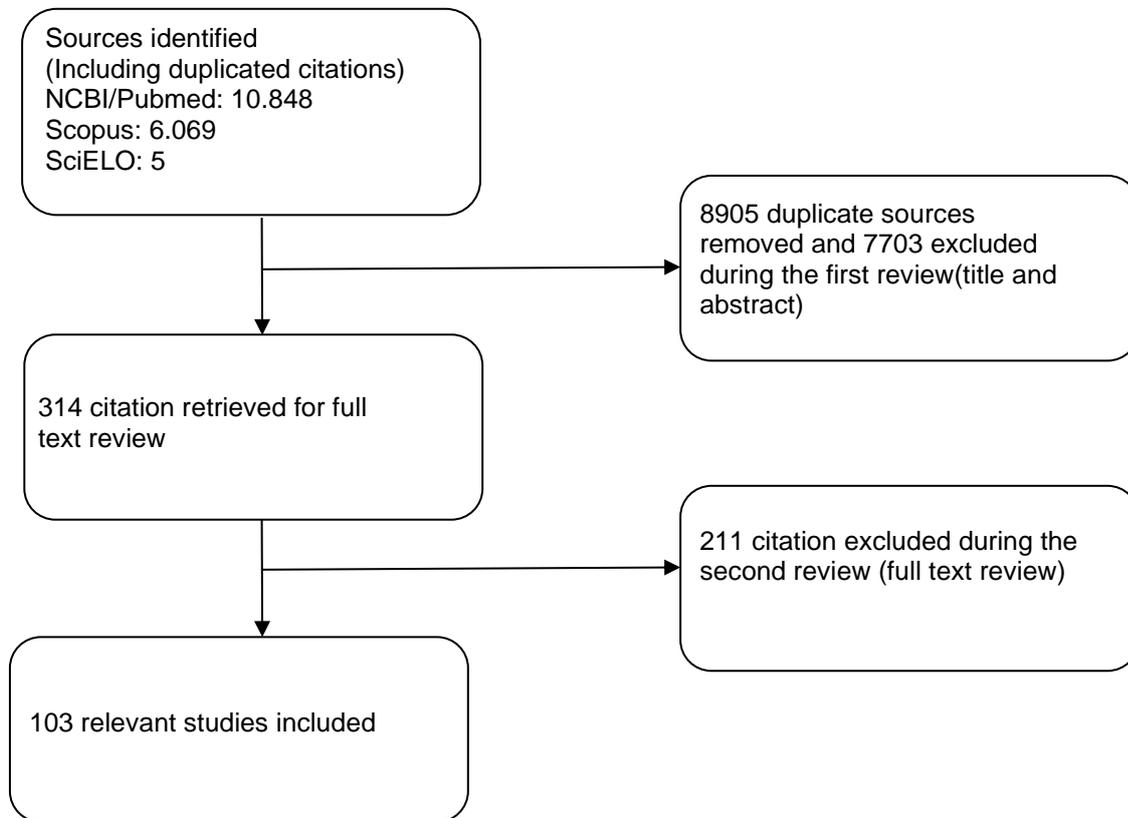


Figura 1.1. Diagrama de flujo de la búsqueda bibliográfica y de los estudios incluidos

Resultados

Odontoblastos

Son células diferenciadas que se encuentran en la pulpa dental en disposición de empalizada alrededor de la cámara pulpar; presentan una prolongación que se extiende dentro de los túbulos dentinales lo que hace que sean las primeras células en responder a estímulos exógenos o materiales dentales (6). Son las células encargadas de producir las proteínas que se encuentran en el componente orgánico de la dentina que forman la matriz extracelular, pudiendo ser proteínas colágenas o no colágenas (7).

Los odontoblastos tienen un papel fundamental en la nocicepción dental. Se ha demostrado que expresan canales de sodio dependientes de voltaje los cuales les confieren excitabilidad y los hace capaces de generar potenciales de acción (8), También se han encontrado la presencia de proteínas mecanorreceptoras (9) como TRP lo que sugiere que podrían funcionar además como célula mecano sensorial y

también se ha reportado la expresión de diferentes canales de sodio y calcio como ENaC, ASIC, PIEZO 2, Ca⁺ tipo L (1,10).

Existe una estrecha relación entre los odontoblastos y las terminaciones nerviosas de la pulpa, aun así, no se han encontrado sinapsis entre ellos ni uniones estrechas o desmosomas (3,6). Los odontoblastos liberan mediadores como óxido nítrico, glutamato y en especial purinas y pirimidinas bioactivas las cuales median respuestas celulares a través de los respectivos receptores (6). Se ha encontrado que tanto los odontoblastos como las terminaciones nerviosas de la pulpa expresan receptores purinérgicos de la familia P2X y P2Y lo que sugiere que el ATP liberado por odontoblastos después de un estímulo podría regular la entrada de calcio a los odontoblastos y generar su despolarización (3,11).

Sistema endocannabinoide

El sistema endocannabinoide comprende receptores, moléculas endocannabinoides, enzimas de degradación y proteínas transportadoras. Se expresa en la mayoría de las vías del dolor, desde las terminaciones nerviosas hasta la corteza cerebral (12). Los endocannabinoides son un conjunto de moléculas lipídicas paracrinas sintetizadas a partir de fosfolípidos que se unen a los receptores cannabinoides y los activan (13).

La anandamida (N-araquidonoiletanolamina, AEA) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG) son los principales endocannabinoides, que se sintetizan principalmente por la elevación de las concentraciones intracelulares de calcio (14,15). Además, los endocannabinoides pueden actuar como inhibidores de la entrada de calcio disminuyendo la sensibilidad central (12).

La AEA se sintetiza a partir de la N -acil-fosfatidiletanolamina (NAPE) por la fosfolipasa D específica de la NAPE (NAPE-PLD), mientras que el 2-AG se produce a partir del diacilglicerol (DAG) por la α - o β -DAG lipasa (DAGL) (16).

Receptores cannabinoides

Los dos tipos de receptores cannabinoides (CB1 y CB2) pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) (13,16,17). Ambos receptores poseen un dominio amino-terminal extracelular glicosilado y un dominio carboxi-terminal intracelular, conectados por siete dominios transmembrana, tres bucles extracelulares y tres bucles intracelulares (18).

En los humanos, CB1 y CB2 están codificados por los genes *cnr1* y *cnr2* (19). El *cnr1* está localizado en el cromosoma 6q15, mientras que el *cnr2* está localizado en el cromosoma 1p32.11 (19,20). La proteína CB1 consta de 472 aminoácidos y el peso

de las dos isoformas es de 52,9 y 49,1 kDa. La proteína del receptor CB2 tiene 360 aminoácidos y un peso molecular de 39,7 kDa (16).

El receptor CB1 se encuentra principalmente en el sistema nervioso central (SNC) pero también en el sistema nervioso periférico (SNP), donde media la inhibición o la activación de diferentes neurotransmisores. El receptor CB1 tiene múltiples sitios activos a los que se unen los ligandos para inducir cambios alostéricos (13), y para participar en varios procesos como la cognición, la memoria, el control de la función motora y la analgesia. Además, en los tejidos periféricos, el CB1 participa en la analgesia y en la regulación de eventos antiinflamatorios e inmunitarios (21,22). Anteriormente, se ha informado que las tres variantes de CB1 se expresan en el cerebro humano (23). Su expresión se reporta en los núcleos de los ganglios basales, el hipocampo, la corteza y el cerebelo (24), contribuyendo al control de la función motora, la cognición, la memoria y la analgesia (23), además de los reportes existentes de efectos ansiolítico, analgésico, neuroprotector y antiemético (17).

Además, el CB1 se ha encontrado en diferentes tejidos periféricos, como la glándula suprarrenal, el corazón, el pulmón, la próstata, el hígado, el útero, el ovario, los testículos, los conductos deferentes, la médula ósea, el timo y las amígdalas (24). Debido a esta amplia expresión, la regulación farmacológica del CB1 se ha propuesto como una estrategia terapéutica prometedora para diferentes trastornos, incluyendo el dolor, la inflamación, la obesidad, los trastornos neurodegenerativos y el cáncer (18).

Por otro lado, los receptores CB2 se localizan principalmente en las células y tejidos inmunitarios, incluidos los macrófagos, el bazo, las amígdalas, el timo, los leucocitos, el pulmón y los testículos (24), tejidos en donde modulan la migración de las células inmunitarias y la liberación de citoquinas (13). Por lo tanto, se ha propuesto profundizar en los receptores CB2 como enfoque terapéutico para la inmunomodulación, el tratamiento del dolor, la osteoporosis y las enfermedades hepáticas (18).

Regulación de la expresión de CB1 y CB2 en condiciones patológicas

En varias condiciones patológicas, la expresión génica de los receptores cannabinoides se regula para mantener la homeostasis y los procesos fisiológicos (25). En el dolor neuropático, el CB1 se sobreexpresa para inhibir la liberación de neurotransmisores y disminuir la hiperexcitabilidad de las vías sensoriales, y el CB2 para inhibir la inflamación (26). En los modelos de dolor neuropático en ratas el CB1 se sobreexpresa en la médula espinal, mediado por tirosina quinasas, MAPK y receptores de glucocorticoides. Además, los factores neurotróficos y los corticosteroides liberados durante el daño nervioso contribuyen al control de la expresión de CB1.

En condiciones de neuroinflamación como la esclerosis lateral amiotrófica y la encefalitis autoinmune, el CB2 se sobreexpresa en los macrófagos y la microglía de los pacientes para contribuir a la reducción de la inflamación (25). En condiciones de inflamación, se descubrió en células Jurkat que los cannabinoides inducen la expresión de CB1 por mecanismos dependientes de IL-4 y CB2. Aunque el CB1 se expresa a niveles bajos en los LT quiescentes, cuando se induce se observa que tiene efectos antiinflamatorios.

Estos estudios mostraron un mecanismo de retroalimentación en las células T, donde los cannabinoides inducen la expresión del antiinflamatorio IL-4, vía CB2, y a su vez, la IL-4 aumenta la transcripción del CB1, mostrando que este receptor se sobreexpresa en respuesta a los cannabinoides y que la secreción de IL-4 es necesaria para que esto ocurra (27).

Otros estudios muestran que la IL-4 aumenta directamente la expresión de CB1 en LT a través de la activación/fosforilación de STAT6 (28), lo que evidencia que los receptores cannabinoides son potentes inmunomoduladores. También se ha encontrado que en la microglía de ratón, tanto el IFN-gamma como el factor estimulante de colonias de macrófagos inducen la expresión de transcritos CB2 (25).

Se han encontrado altos niveles de expresión de ambos receptores cannabinoides en cánceres humanos, lo cual puede explicar los efectos antitumorales de los cannabinoides. Por ejemplo, los agonistas no selectivos inhiben el crecimiento de las células de cáncer de próstata donde los receptores CB1 y CB2 están sobreexpresados. Por el contrario, el THC estimula el crecimiento de células de cáncer de mama con baja expresión de receptores (29), lo que sugiere que aumentar la expresión de los receptores allí donde se han perdido podría ser una opción terapéutica (19). Por otro lado, también se ha informado de la disminución de la expresión del receptor CB1 en tumores colorrectales humanos, debido a la metilación del gen, que se relaciona con la proliferación del tumor (30).

Las terminaciones nerviosas entéricas muestran una sobreexpresión de los receptores cannabinoides en modelos de diarrea y colitis en ratones, en los que también se produce una reducción de la motilidad intestinal y del dolor visceral y se promueve la curación (31). Además, el hígado cirrótico presenta una sobreexpresión de receptores CB1 y CB2 (32), mientras que el estímulo fibrogénico favorece la lipogénesis y la expresión de CB1 (33). La activación de CB2 por agonistas específicos conduce a la apoptosis de las células pro fibrogénicas y de los miofibroblastos, reduciendo la proliferación de las células fibrogénicas (33). Una dieta rica en grasas y la ingestión frecuente de alcohol modulan positivamente la expresión del receptor CB1 (34).

El CB1 se sobreexpresa en modelos de obesidad en ratas y en ratones con dietas altas en grasas. Se ha informado de que el CB1 estimula la lipogénesis e inhibe la oxidación en los adipocitos y aumenta la liberación de insulina del páncreas (35). Así,

el aumento de la expresión de CB1 en los adipocitos podría aumentar la eficacia de los antagonistas de CB1 para reducir el peso en los tratamientos de la obesidad (36). La liberación de ácido retinoico por parte de las células estrelladas hepáticas promueve la transcripción del gen CB1 y la lipogénesis (34).

En ratones knock-out para el factor de transcripción SF-1 se evidencia una pérdida de expresión del receptor CB1 en el hipotálamo ventromedial, que está involucrado en el control del apetito (37). Estos ratones mostraron que los agonistas CB1 no estimularon el apetito, lo que confirma la relación entre el aumento de la ingesta de alimentos y la regulación de los cannabinoides (37). Por otra parte, el CB1 está sobreexpresado en el miocardio y la aorta en modelos de ratas con hipertensión, por lo que los agonistas del CB1 reducen la presión arterial al disminuir la contractilidad cardíaca y la resistencia vascular (38). Sin embargo, ese efecto sólo se ha observado en animales con presión arterial normal, lo que sugiere que el receptor CB1 en el corazón y los vasos sanguíneos puede ser necesario para entender el efecto de los agonistas en la hipertensión (38). También se ha descubierto que el CB2 está sobreexpresado en células inmunitarias humanas y en modelos de placas ateroscleróticas en ratón (39). La estimulación del CB2 indujo un enlentecimiento de la progresión de la placa, posiblemente al reducir la infiltración de células inmunitarias y la liberación de citoquinas (39).

Los pacientes de psiquiatría (víctimas de suicidio y esquizofrenia) muestran una sobreexpresión de receptores CB1 en la corteza prefrontal (40), donde tiene efectos tanto excitatorios como inhibitorios en la transmisión sináptica (41). Aunque todavía faltan más estudios en el área psiquiátrica, se sugiere que la intervención del sistema endocannabinoide podría ser una importante diana terapéutica para estos trastornos (25).

La expresión de ambos receptores puede estar regulada epigenéticamente por la metilación y también se demostró que la expresión de CB1 puede variar según el genotipo de cada individuo (42). Por ejemplo, se demostró que la activación de la histona metiltransferasa G9a disminuye la expresión de CB1 en las neuronas sensoriales primarias durante el dolor neuropático, y los inhibidores de G9a restauran la expresión de CB1 en las neuronas lesionadas, potenciando el efecto analgésico de los cannabinoides aplicados periféricamente (43).

Todas estas evidencias demuestran que las células llevan a cabo un proceso esencial de regulación de la expresión de los genes CB1 y CB2 en función del fenotipo y del contexto biológico, que es importante en el desarrollo y control de diferentes afecciones, lo que lleva a proponer la manipulación de la expresión de ambos receptores para ser utilizada como tratamiento en múltiples enfermedades.

Señalización de los receptores cannabinoides

Los receptores tipo GPCR, como el CB1 y el CB2, pueden ser activados por la interacción del ligando en diferentes dominios del receptor y así generar diferentes respuestas. Por ejemplo, se pueden generar segundos mensajeros citoplasmáticos y activar cascadas de proteína quinasa que modulan la expresión génica, pero también hay señalización que no es dependiente de la proteína G, como la vía de la β -arrestina que genera la desensibilización e internalización del receptor, y también regula la señalización actuando como adaptador, lo que contribuye al control de la expresión génica frecuentemente a través de MAPK (44). Otros componentes de la señalización independiente de la proteína G son la tirosina quinasas JAK, Src, PyK2 y treonina quinasas como la GRK. Así, la unión del ligando a CB1 y CB2 puede activar cualquiera de estas vías de señalización controladas por tres familias de proteínas: Las proteínas G, GPCR quinasas y las β -arrestinas (44).

Tras la estimulación de los receptores cannabinoides, se activan las proteínas G heterotriméricas. Clásicamente la unión de un agonista genera un cambio conformacional en el receptor, que funciona como factor de intercambio de guanina (GEF), lo que conduce al intercambio de GTP por GDP en la subunidad $G\alpha$, y provocando la disociación del trímero liberando las subunidades $G\beta\gamma$. Las subunidades disociadas activan diferentes efectores implicados en la formación de segundos mensajeros como AMPc, IP3 y DAG, así como la modulación de otros receptores y canales (45).

Por otro lado, se sabe que existe una retroalimentación negativa que desactiva la señalización sostenida de segundos mensajeros para mantener la homeostasis. Tras la unión del ligando y la activación de la proteína G, el receptor se fosforila en sus bucles citoplasmáticos y en el C-terminal, mediado por las GRKs (46). Estas fosforilaciones potencian la unión de la β -arrestina al receptor e interrumpen la señalización, provocando la internalización de los receptores para su reutilización o degradación proteosomal (46).

Las β -arrestinas reclutadas también funcionan como adaptadores de diferentes mediadores de señalización como MAPK, AKT, SRC, $NF\kappa B$ o PI3K. Incluso se ha visto que algunos receptores que transducen a través de β -arrestinas mantienen la actividad GEF en los endosomas continuando la señalización de la proteína G después de la endocitosis (45). Las β -arrestinas regulan casi todos los aspectos de la actividad de los receptores ya que participan en la desensibilización, la regulación negativa, el tráfico de receptores e incluso, la señalización positiva.

Se requieren tres componentes para iniciar la señalización: un ligando, el receptor y los transductores de señales. Todos ellos interactúan de forma alostérica entre sí. Por ejemplo, un ligando puede aumentar la afinidad de un receptor por un transductor. A su vez, los efectores unidos a los dominios intracelulares del receptor pueden estabilizarlo y aumentar así la afinidad del receptor por un ligando específico.

La vía canónica involucra una señalización inhibitoria mediada por las β -arrestinas. El receptor CB1 se acopla a la proteína G_i , lo que genera la inhibición de la adenil ciclasa y la disminución de las concentraciones de AMPc, además la inhibición de varios canales de calcio y activación de canales de potasio a través de la subunidad β y (24,47). Luego se da el reclutamiento de las β -arrestinas 1 y 2, que desempeñan un papel en la señalización e internalización del receptor (48-50). Se ha demostrado que las quinasas del GPCR junto con la β -arrestina 2 desencadenan la desensibilización del receptor, la internalización y la finalización de la señalización de la proteína G (48,50-52). En cambio, el reclutamiento de la β -arrestina 1 participa en la activación de las MAPK y en la regulación de la expresión génica, aunque ambas β -arrestinas han sido involucradas en la activación de ERK1/2 (48,53).

Hay pruebas de que varias MAPKs como ERK 1/2 , P38 y JNK se activan en respuesta a los agonistas de CB1 en varios tipos de células (53,54). También se ha demostrado que el CB1 activa la vía PI3K/AKT que regula la supervivencia neuronal (48,55).

La activación de estas vías, se ha relacionado con la activación de varios factores de transcripción como Krox-24, CReBH y BDNF(48,53,55,56). Al igual que el CB1, el CB2 también se acopla a la proteína G inhibitoria, se ha reportado que la estimulación del CB2 activa las MAPKs y la subsiguiente inducción de Krox-24 , factor de transcripción importante en diferenciación celular y mitogénesis (57). La activación de CB2 también resulta en el reclutamiento de β -arrestina 2 y la activación de MAPK mediada por β -arrestina 1 (58).

Por otro lado, la vía no canónica, se acopla a la señalización de la proteína G estimulante. Aunque el CB1 se acopla preferentemente a las proteínas G inhibitorias, hay algunos cannabinoides endógenos y sintéticos que potencian el acoplamiento del receptor CB1 a las proteínas G estimuladoras, como $G_{\alpha_{q/11}}$ y G_{α_s} (48,59,60). Por ejemplo, se ha informado que el cannabinoide sintético WIN55 aumenta los niveles de calcio a través de la vía CB1- G_{α_q} -fosfolipasa C en células HEK y neuronas (59). Del mismo modo, los endocannabinoides inducen el aumento de calcio y la liberación de glutamato en los astrocitos, por interacción con el receptor CB1 (61). También se observa este fenómeno con algunos agonistas de CB2 (62).

Además, se ha demostrado crosstalk del receptor CB1 con otros GPCRs, por ejemplo, con los receptores dopaminérgicos (D2R), que son coestimulados induciendo una dimerización y colocalización, lo que conduce a un aumento de los niveles de AMPc, sugiriendo un cambio en el perfil de transducción de señales cuando hay coestimulación (48,63). También hay evidencia de la interacción de estos dos receptores en las neuronas, ya que un antagonista del receptor dopaminérgico podría dificultar la fosforilación del CB1, pues a nivel funcional se demostró que el bloqueo del receptor de adenosina atenúa los efectos depresores motores dependientes del CB1, sugiriendo una dependencia entre ambos receptores (64) (36).

También se ha informado del antagonismo funcional entre el CB1 y otros GPCRs (48); por ejemplo, se ha informado de la inhibición recíproca en el hipocampo entre los receptores CB1 y GABA-b (65). Además, este fenómeno también se ha observado entre los receptores CB1 y de angiotensina II en los astrocitos, donde la activación simultánea redujo la activación de las MAPK en comparación con cuando se activó sólo el receptor de angiotensina II (54,66). Este comportamiento se produce tras la estimulación con el agonista HU210, mientras que la activación con el agonista Ang II provocó la activación de ERK1/2, lo que sugiere diferentes rutas de agonismo y crosstalk con otros GPCR (66). Así mismo la heterodimerización entre CB1 y CB2 también se ha demostrado, esto genera un antagonismo cruzado, pues un antagonista de un solo receptor logra bloquear ambos receptores (67)

También se reportan vías de transactivación paracrina y autocrina, que consiste en la movilización de endocannabinoides mediada por el GPCR y la subsiguiente activación del CB1, mostrando que la interacción de los receptores cannabinoides no se limita a la dimerización (68,69).

Por otro lado, se ha demostrado que puede ocurrir desensibilización heteróloga en aquellos GPCRs que activan la PKA como el $G\alpha_{q/11}$, ya que podría fosforilar el receptor CB1 y reducir su actividad en tipos celulares específicos (54). También se ha demostrado que algunos cannabinoides acoplados a $G\alpha_{q/11}$ y $G\alpha_s$ activando eficazmente los canales de calcio.(48).

Además de la actividad en la membrana, se ha informado que receptores cannabinoides funcionales se localizan intracelularmente en el núcleo y las mitocondrias, donde pueden activar la señalización intracelular (70,71). Debido a su lipofiliidad, los endocannabinoides pueden atravesar la membrana plasmática, activar estos receptores, modificando la permeabilidad de los lisosomas e induciendo la liberación de calcio de las reservas internas (48). Asimismo, el CB1 mitocondrial inhibe la respiración celular y la producción de AMPc, señalando el papel del sistema cannabinoide como regulador energético (48).

Por último, se ha demostrado que los cannabinoides desencadenan la inducción del gen CB1 mediante su activación en varios tipos de células, lo que se conoce como autoinducción (72,73). Los GPCRs suelen sufrir una regulación a la baja en respuesta a la activación persistente del receptor por parte de los ligandos, y el receptor CB1 tiene un comportamiento similar (48). La inducción de la tolerancia a los cannabinoides es una consecuencia biológica de la desregulación del CB1 inducida por los cannabinoides exógenos. Por ejemplo, el 2AG aumenta la transcripción del CB1 a través de la activación del receptor del ácido retinoico en los hepatocitos (74). Mientras que la activación del receptor CB1 astrogial por endocannabinoides endógenos liberados por los astrocitos aumentó los niveles de CB1 (75).

Ligandos de CB1 y CB2

Los ligandos para los receptores cannabinoides son muy diversos, pueden ser agonistas cuando generan un efecto positivo, antagonistas cuando tienen un efecto neutro y agonistas inversos cuando tienen un efecto negativo para una determinada vía de señalización. También hay moduladores alostéricos de receptores que pueden ser positivos cuando potencian su actividad o negativos cuando la disminuyen (30).

La Tabla 1 presenta algunos de los ligandos más conocidos de CB1 y CB2.

	Agonistas	Moduladores alostéricos positivos	Antagonistas	Moduladores alostéricos negativos
CB1	ACEA Oleamida RVD-Hp α THC AEA 2AG	Org 27569	AM 251 AM 4113 AM 6545 AVE 1625 CP 945598 MJ 15 NESS 0327 PF 514273	CBD PSNCBAM-1
CB2	CB 65 GP 2a HU 308 JWH 133 MDA 19 PM 226 JWH-015 AM 1241	Ec2la RVD- Hp α	AM 630 COR 170 GP 1a JTE 907 SCH 336 SR144528	

Tabla 1. Ligandos de CB1 y CB2. (13,60,76-83)

Agonismo sesgado

Se ha establecido que diferentes agonistas tienen el potencial de activar selectivamente una cascada de señalización específica sobre otra, esto se denomina agonismo sesgado o selectividad funcional, que desencadena diferentes respuestas fisiológicas, debido a que un receptor puede adoptar una variedad de conformaciones en respuesta a varios ligandos (18,84).

La unión del ligando da lugar a la activación o inhibición de múltiples efectores, de manera que los receptores pueden responder a diferentes moléculas con distintas eficiencias de acoplamiento al transductor; cualquier sitio de la superficie del receptor

que se una a una molécula puede estabilizar una conformación distinta del receptor e inducir una respuesta farmacológica particular (84).

La respuesta celular durante el agonismo sesgado puede regularse a tres niveles: el ligando, el receptor y los transductores (85). El ligando sesgado consiste en el agonismo que es susceptible de inducir una conformación única del receptor haciendo un acoplamiento específico a la cascada de transducción de señales y una respuesta sesgada (86). El segundo agonismo sesgado, regulado por el receptor, se produce cuando el receptor está mutado o existen isoformas de la proteína que afectan a su capacidad para unirse a ambos ligandos o transductores (87). Esto conduce a una alteración en el acoplamiento de la proteína G o de la β -arrestina (88,89). Por último, el sesgo puede ser modulado a través de la expresión diferencial celular o tisular de elementos transductores proximales al receptor, como las β -arrestinas o las GRKs (90). Por tanto, las propiedades de señalización de un receptor dependen del tipo de célula (91); de esta manera, un agonista puede tener efectos diferentes según el tejido en el que se encuentre el receptor, ya que el fenotipo celular influye en la expresión diferencial de los transductores y en la activación de una u otra vía de señalización (84).

Dependiendo del agonista implicado, los receptores pueden generar respuestas diferentes ya que el sesgo del ligando se transmite a los transductores a través del receptor generando un “código de barras” por fosforilaciones diferenciales en el dominio intracelular del receptor. Se ha reportado que diferentes aminoácidos fosforilados por diferentes GRKs generan distintos acoplamientos de la β -arrestina, estableciendo diferentes caminos para el reclutamiento de los transductores y, finalmente, distintas señales (46) .

La activación de los receptores cannabinoides por agonistas sesgados se produce porque las GRKs específicas median la señalización por la β -arrestina, incluso cuando hay varias GRKs presentes en la célula, la señalización está mediada por una sola GRK específica que se activa dependiendo de su expresión y del tipo de ligando (50). Por ejemplo, se informó que el efecto de diferentes agonistas de CB1 y CB2 podían ser modificados por moduladores alostéricos, el CBD reduce la potencia de varios agonistas, confirmando que su efecto es significativo y variado dependiendo del receptor cannabinoide, el tipo de agonista y si ambos receptores se encuentran acoplados como heterodímeros (92).

Agonismo del cannabis de espectro completo

Aunque se han aislado más de 200 moléculas del cannabis, los fitocannabinoides mejor caracterizados de la planta de cannabis son el tetrahidrocannabinol (THC), el cannabidiol (CBD), el cannabigerol (CBG), el cannabinol (CBN) y el cannabicromeno (CBC). Estos cannabinoides existen como ácidos monocarboxílicos inactivos, con baja biodisponibilidad y pobres propiedades de unión a receptores (93).

El THC es el principal componente psicoactivo; tiene efectos eufóricos, antinociceptivos, antiinflamatorios y sedantes. Otros usos reportados son como relajante muscular, antianoréxico, broncodilatador, antiemético, antiespasmódico, neuroprotector y antioxidante (94,95)

El CBD es el principal componente no psicoactivo y se ha informado que tiene efectos sedantes, antiinflamatorios y antipsicóticos (96). Varios de estos efectos parecen estar mediados por mecanismos independientes de los receptores cannabinoides. Por ejemplo, la evidencia apunta a que el CBD inhibe varios receptores como el TRPV1, el GPR55, el NMDAR, los receptores opioides, los receptores de adenosina A1 y los canales de calcio dependientes de voltaje (96). Por otro lado, activa el PPAR- γ , el 5HT1A y el receptor de glicina (97,98). Así, la acción del CBD a través de estas vías puede ser responsable de la supresión de la excitabilidad neuronal y del efecto analgésico. Sin embargo, también hay pruebas de que el CBD inhibe la captación de dopamina, noradrenalina, GABA, serotonina y anandamida en las sinapsis (99), lo que explica sus efectos neuroprotectores y antinociceptivos. El efecto antiinflamatorio podría deberse a que inhibe la COX-2 impidiendo la producción de metabolitos del ácido araquidónico (100,101).

El CBG se encuentra en pequeñas cantidades en los extractos de cannabis, tiene una baja afinidad por el CB1 y el CB2, pero los estudios demuestran que reduce el dolor, el eritema y la inflamación al inhibir la enzima lipooxigenasa y activar el receptor α 2-adrenérgico (99). También se ha informado de que tiene un efecto antidepresivo porque es un potente inhibidor de la captación de anandamida y también es un antagonista del receptor 5-HT1a (102).

Al igual que el CBD, el CBC tiene una baja afinidad por el CB1 y el CB2, aunque se ha informado de que tiene efectos antiinflamatorios y antinociceptivos mediante la inhibición de la COX-2 (101). El CBN tiene una estructura y efectos similares a los del CBD; su efecto fisiológico se atribuye a la modulación de CB2 y también de CB1, pero con menor afinidad (93).

Además de los fitocannabinoides en el cannabis de espectro completo, hay terpenoides, que son hidrocarburos volátiles insaturados responsables del olor y el sabor del cannabis, que han demostrado efectos independientes por sí mismos, modulando los efectos de los cannabinoides (103). Los terpenoides encontrados, con mayor importancia biológica son: β -mirceno, α -pineno, β -cariofileno y D-limoneno.

El β -mirceno es un agonista CB2, frecuentemente utilizado como analgésico, ya que puede potenciar el efecto analgésico del THC y del CBD al estimular la liberación de opioides endógenos mediada por el receptor α 2-adrenérgico. También potencia los efectos antinociceptivos y antiinflamatorios del CBD al inhibir la síntesis de prostaglandina E2 dependiente de la COX-2 (104), como también lo hace el α -pineno, quien potencia los efectos antiinflamatorios y anti nociceptivos periféricos del CBD al inhibir la COX-2 y la síntesis de prostaglandina E2; además, inhibe la actividad de la

acetilcolinesterasa en el cerebro, inhibiendo las sinapsis colinérgicas y los impulsos nerviosos (104).

El β -cariofileno es uno de los terpenoides más abundantes en la planta de cannabis. Está demostrado que sinergiza el efecto antiinflamatorio y analgésico del THC al inhibir la prostaglandina E1 y activar CB2. También inhibe la expresión de citoquinas proinflamatorias inducidas por el lipopolisacárido a través de CB2 (105,106)

El D-limoneno tiene una baja afinidad por los receptores cannabinoides; se ha informado que sinergiza los efectos ansiolíticos y sedantes del CBD porque aumenta la serotonina y la dopamina en la corteza prefrontal y el hipocampo a través del receptor 5-HT1a (93). Estos datos muestran la diversidad de moléculas presentes en el cannabis y sus propiedades que influyen en la actividad antinociceptiva y antiinflamatoria, actuando a través de múltiples vías y receptores y potenciando el efecto de los cannabinoides.

Efecto antiinflamatorio y antinociceptivo de los agonistas CB1 y CB2

El efecto antinociceptivo de CB1 y CB2 se debe a la inhibición de la adenil ciclasa, al bloqueo de varios canales de Ca^{++} dependientes de voltaje y a la activación de varios canales de K^+ , lo que inhibe la liberación de neurotransmisores relacionados con el dolor, y reduciendo la excitabilidad neuronal, así como la inhibición de las vías del dolor (12,26,27,72). Tras la activación y estabilización del receptor, éste se une a la proteína $G\alpha$, o a las β -arrestinas, desencadenando múltiples vías de señalización en paralelo a través de diferentes vías de transducción.

Por otra parte, en otras células puede ocurrir la activación agonista de la proteína $G\alpha_i$, que conduce a la inhibición de la adenilil ciclasa, reduciendo las concentraciones de AMPc, lo que conduce a una inactivación de la PKA, que es esencial para la fosforilación de proteínas. Entre las proteínas afectadas están las que regulan los canales iónicos de la célula: los canales de potasio pueden activarse y los de calcio se desactivan, inhibiendo la despolarización; además, la supresión de la entrada de calcio inhibe la liberación de neurotransmisores.

La inhibición de la adenilil ciclasa también reduce la actividad de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) (18,28). Por otra parte, existen pruebas de que la activación de los receptores cannabinoides inhibe la actividad de la acetilcolina, de la noradrenalina, la dopamina, la 5-hidroxitriptamina (5-HT), el ácido γ -aminobutírico (GABA), el glutamato, el aspartato y la colecistoquinina (12).

Además, se ha comprobado que la amidohidrolasa de ácidos grasos, al catabolizar la anandamida, ejerce un efecto antinociceptivo en ratones, y la monoacilglicerol lipasa (FAAH) cataboliza el 2AG, aumentando su efecto nociceptivo, evaluado con el test de dolor con formalina y ácido acético (12). La migraña inducida en ratones se bloqueó tras la inhibición de la FAAH, lo que sugiere que sus productos median la

antinocicepción a través del CB1 (12). Se ha demostrado en modelos animales con dolor agudo, inflamatorio y neuropático que los agonistas de los receptores cannabinoides logran una eficacia analgésica con una potencia comparable a la de los opioides o los inhibidores de la ciclooxigenasa (12).

En investigaciones anteriores de nuestro grupo, se descubrió que la estimulación crónica con capsaicina, la cual estimula el TRPV1 induce la sobreexpresión de los receptores cannabinoides en las células odontoblásticas humanas, lo que indica que esta interacción podría modular el papel de los cannabinoides en el dolor crónico y la actividad antinociceptiva en el dolor dental.

Por otro lado, se ha demostrado el efecto antiinflamatorio de los cannabinoides a través de CB1 y CB2. La microglía activada en un entorno inflamatorio regula al alza el receptor CB2, al parecer mediado por la producción y secreción de IFN-gamma y GM-CSF (108).

El promotor del gen CB2 contiene una secuencia de elemento de respuesta antioxidante (ARE), que una vez une al factor de transcripción NRF2, modula la expresión de CB2 en la microglía. El NRF2 es un factor de transcripción que regula la homeostasis de la reducción-oxidación y tiene efectos neuroprotectores y antiinflamatorios al aumentar la actividad del NF-KB (109).

Se ha observado que THC puede también tener una actividad antiinflamatoria utilizando una vía diferente de los receptores cannabinoides, ya que en un estudio en ratones que no expresaban receptores CB1 y CB2 también se observó el efecto del THC (110). El estudio reportado por Philpott et al, determinó que el CBD aplicado localmente es antinociceptivo y antiinflamatorio en la osteoartritis y también que la inhibición de la inflamación previene el desarrollo del dolor, y que el efecto es independiente de los receptores cannabinoides (111). Aun así, el uso de otros agonistas cannabinoides mostró la participación de los receptores CB1 y CB2, señalando que el efecto mediado por la activación del receptor depende del tipo de agonista (112).

Se ha demostrado la efectividad de aplicación local de los agonistas cannabinoides, por ejemplo, la administración tópica de un agonista CB1 atenúa las respuestas inflamatorias cutáneas en un modelo de dermatitis atópica inducida por oxazolona en un modelo de ratón, y se descubrió que el tratamiento es eficaz para reducir la inflamación y sus síntomas asociados (107).

Finalmente varios estudios clínicos demuestran la eficacia de los agonistas aplicados localmente para reducir el dolor utilizando capsaicina al 8% (113) o usando tópicamente aceite o crema de cannabidiol (114,115).

Conclusiones

Los receptores cannabinoides se expresan en diferentes tejidos donde tienen funciones fisiológicas críticas. Su expresión está regulada dependiendo del contexto biológico, por lo que se puede encontrar una cantidad diferencial en condiciones patológicas.

Factores externos pueden generar mutaciones o cambios epigenéticos que afectan la expresión de ambos receptores, alterando su función fisiológica o farmacológica modificando los enfoques terapéuticos. Por ejemplo, la sobreexpresión de los receptores, como ocurre en muchos tejidos durante la inflamación, puede utilizarse para potenciar su acción activándolos con agonistas. O, si ocurre lo contrario, se puede buscar una vía farmacológica para aumentar su expresión y conseguir así el efecto deseado en el tratamiento de diversas afecciones y patologías. Se debe profundizar en el estudio de alternativas epigenéticas para lograr la modulación de la expresión de los receptores y así mejorar los efectos analgésicos y antiinflamatorios de los cannabinoides.

Es importante tener en cuenta el tipo de tratamiento farmacológico dirigido a los receptores cannabinoides, ya que, dependiendo del tipo de agonista y del contexto biológico, se pueden activar diferentes vías de señalización canónicas y no canónicas. Este comportamiento ocurre porque se inducen cambios alostéricos en el receptor generando fosforilaciones diferenciales en sus dominios citoplasmáticos, provocando el inicio de diferentes cascadas de señalización.

Además, se ha demostrado que el uso de agonistas aplicados localmente ayuda a controlar el dolor y la inflamación actuando a través de múltiples vías de señalización, evidenciando que su uso es una opción terapéutica en numerosas patologías. De este modo, en esta revisión, se demostró la importancia fisiopatológica de los receptores cannabinoides en diferentes tejidos, su expresión diferencial y cómo la acción de diferentes agonistas y antagonistas puede modular diversas vías de señalización mediante la selectividad funcional. Todo ello abre nuevas perspectivas farmacológicas en las que CB1 y CB2 pueden ser importantes dianas terapéuticas en el tratamiento del dolor y la inflamación.

Referencias

- (1) Sessle BJ. Peripheral and central mechanisms of orofacial inflammatory pain. . Translating Mechanisms Orofacial Neurological Disorder, 2011:179-206.
- (2) Bae YC YA. Morphological fundamentals of pain processing in the dental pulp. J Oral Sci. 2020 2020;62(2):126-130.
- (3) Maurin JC, Couble ML, Thivichon-Prince B, Magloire H. odontoblaste - Un acteur

incontournable de la perception de la douleur dentinaire. *Med Sci* 2013;29(3):293-299.

(4) Lee K, Lee BM, Park CK, Kim YH, Chung G. Ion Channels Involved in Tooth Pain. *Int J Mol Sci* 2019;20(9):2266.

(5) Chung G, Jung SJ, Oh SB. Cellular and molecular mechanisms of dental nociception. *J Dent Res* 2013;92(11):948-55.

(6) Solé-Magdalena A, Martínez-Alonso M, Coronado CA, Junquera LM, Cobo J, Vega JA. Molecular basis of dental sensitivity: The odontoblasts are multisensory cells and express multifunctional ion channels. *Ann Anat.* 2018;215:20-29.

(7) Baldión PA, Velandia-Romero ML, Castellanos JE. Odontoblast-Like Cells Differentiated from Dental Pulp Stem Cells Retain Their Phenotype after Subcultivation. *Int J Cell Biol* 2018 Feb.

(8) Allard B, Magloire H, Couble ML, Maurin JC, Bleicher F. Voltage-gated sodium channels confer excitability to human odontoblasts: possible role in tooth pain transmission. *J Biol Chem.* 2013;281(39):29002-29010.

(9) Solé-Magdalena A, Revuelta EG, Menéñez-Díaz I, Calavia MG, Cobo T, García-Suárez O, et al. Human odontoblasts express transient receptor protein and acid-sensing ion channel mechanosensor proteins. *Microsc Res Tech.* 2011;74(5):457-63.

(10) Bleicher F. Odontoblast physiology. *Exp Cell Res.* 2014;325(2):65-71.

(11) Lee BM, Jo H, Park G, et al. Extracellular ATP Induces Calcium Signaling in Odontoblasts. *J Dent Res.* 2017;96(2):200-207.

(12) Starowicz K FD. Cannabinoids and Pain: Sites and Mechanisms of Action. *Adv Pharmacol.* 2017;80:437-475.

(13) Pertwee RG ea. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. *Pharmacol Rev.* 2010;62:588-631.

(14) Wouters E, Walraed J, Banister SD, Stove CP. Insights into biased signaling at cannabinoid receptors: synthetic cannabinoid receptor agonists. *Biochem Pharmacol* 2019;169:113-623.

(15) Oddi S., Scipioni L, Maccarron M. Endocannabinoid system and adult neurogenesis: a focused review. *Opin Pharmacol.* 2019;18(50):25-32.

(16) Zou S KU. Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. *Int J Mol Sci.* 2018;19(3):833.

(17) Krishna. K, Kaavya et al. Structure of a Signaling Cannabinoid Receptor 1-G

Protein Complex. *Cell* 2019;176(3).

(18) Ye L, Cao Z, Wang W, Zhou N. New Insights in Cannabinoid Receptor Structure and Signaling. *Curr Mol Pharmacol.* 2019;12(3):239-248 2019;12(3):239-248.

(19) Uniprot. UniProtKB-P21554 (CNR1_HUMAN). 2020; Available at: <https://www.uniprot.org/uniprot/P21554>.

(20) Genecards. Genomic location, CNR1 and CNR2 gene. 2021; Available at: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CNR2&keywords=CNR2#genomic_location.

(21) B.S Basavarajappa. Cannabinoid Receptors and Their Signaling Mechanisms. *The Endocannabinoid System* 2017:25-62.

(22) CS Breivogel, G Griffin, V Di Marzo, BR Martin. Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain. *Molecular pharmacology* 2001;60(1):155-163.

(23) Kehua ea. Expression of Cannabinoid Type 1 Receptors in Human Odontoblast Cells. *Journal Of Endodontic* 2017;43(2):283-288.

(24) Howlett AC AM. CB1 and CB2 Receptor Pharmacology. *Adv Pharmacol.* 2017;80:169-206.

(25) Miller LK, Devi LA. The highs and lows of cannabinoid receptor expression in disease: mechanisms and their therapeutic implications. *Pharmacological reviews* 2011 Sep;63(3):461-470.

(26) COSTIGAN M, SCHOLZ J, WOOLF CJ. Neuropathic Pain: A Maladaptive Response of the Nervous System to Damage. *Annual review of neuroscience* 2009;32(1):1-33.

(27) Börner C, Höllt V, Sebald W, Kraus J. Transcriptional regulation of the cannabinoid receptor type 1 gene in T cells by cannabinoids. *Journal of leukocyte biology* 2007 Jan 1,;81(1):336-343.

(28) Boerner C, Bedini A, Hoell V, Kraus J. Analysis of Promoter Regions Regulating Basal and Interleukin-4-Inducible Expression of the Human CB1 Receptor Gene in T Lymphocytes. *Molecular pharmacology* 2008 Mar 1,;73(3):1013-1019.

(29) McKallip RJ, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Delta-9-tetrahydrocannabinol enhances breast cancer growth and metastasis by suppression of the antitumor immune response. *The Journal of immunology (1950)* 2005 Mar 15,;174(6):3281-3289.

(30) Wang D, Wang H, Ning W, Backlund MG, Dey SK, DuBois RN. Loss of

Cannabinoid Receptor 1 Accelerates Intestinal Tumor Growth. *Cancer Research* 2008 Aug 1,;68(15):6468-6476.

(31) Izzo AA, Fezza F, Capasso R, Bisogno T, Pinto L, Iuvone T, et al. Cannabinoid CB1-receptor mediated regulation of gastrointestinal motility in mice in a model of intestinal inflammation. *British journal of pharmacology* 2001 Oct;134(3):563-570.

(32) Julien B, Grenard P, Teixeira-Clerc F, Van Nhieu JT, Li L, Karsak M, et al. Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB2 in the liver. *Gastroenterology* (New York, N.Y. 1943) 2005;128(3):742-755.

(33) Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Batkai S, et al. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *The Journal of clinical investigation* 2005 May;115(5):1298-1305.

(34) Jeong W, Osei-Hyiaman D, Park O, Liu J, Batkai S, Mukhopadhyay P, et al. Paracrine Activation of Hepatic CB1 Receptors by Stellate Cell-Derived Endocannabinoids Mediates Alcoholic Fatty Liver. *Cell Metabolism* 2008 Mar;7(3):227-235.

(35) Kunos G, Osei-Hyiaman D, Liu J, Godlewski G, Batkai S. Endocannabinoids and the Control of Energy Homeostasis. *The Journal of biological chemistry* 2008 Nov 28,;283(48):33021-33025.

(36) Vickers SP, Webster LJ, Wyatt A, Dourish CT, Kennett GA. Preferential effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist, SR 141716, on food intake and body weight gain of obese (fa/fa) compared to lean Zucker rats. *Psychopharmacology* 2003 Apr;167(1):103-111.

(37) Kim KW, Jo Y, Zhao L, Stallings NR, Chua SC, Parker KL. Steroidogenic Factor 1 Regulates Expression of the Cannabinoid Receptor 1 in the Ventromedial Hypothalamic Nucleus. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md.) 2008 Aug;22(8):1950-1961.

(38) Batkai S, Pacher P, Osei-Hyiaman D, Radaeva S, Liu J, Harvey-White J, et al. Endocannabinoids Acting at Cannabinoid-1 Receptors Regulate Cardiovascular Function in Hypertension. *Circulation* 2004 Oct 5,;110(14):1996-2002.

(39) Mach F, Steffens S, Veillard NR, Arnaud C, Pelli G, Burger F, et al. Low dose oral cannabinoid therapy reduces progression of atherosclerosis in mice. *Nature* 2005 Apr 7,;434(7034):782-786.

(40) Hungund BL, Vinod KY, Kassir SA, Basavarajappa BS, Yalamanchili R, Cooper

TB, et al. Upregulation of CB1 receptors and agonist-stimulated [35S]GTPgammaS binding in the prefrontal cortex of depressed suicide victims. *Molecular psychiatry* 2004 Feb;9(2):184-190.

(41) Chiu CQ, Puente N, Grandes P, Castillo PE. Dopaminergic Modulation of Endocannabinoid-Mediated Plasticity at GABAergic Synapses in the Prefrontal Cortex. *The Journal of neuroscience* 2010 May 26;30(21):7236-7248.

(42) Hay EA, Cowie P, Mcewan A, Wilson D, Ross R, Barrett P, et al. Genetic, epigenetic and pharmacological influences modulating tissue specific regulation of the cannabinoid receptor-1 gene (CB1); implications for cannabinoid pharmacogenetics. 2019 Feb 8,.

(43) Luo Y, Zhang J, Chen L, Chen S, Chen H, Zhang G, et al. Histone methyltransferase G9a diminishes expression of cannabinoid CB 1 receptors in primary sensory neurons in neuropathic pain. *The Journal of biological chemistry* 2020 Mar 13;295(11):3553.

(44) Dhopeswarkar A MK. Functional Selectivity of CB2 Cannabinoid Receptor Ligands at a Canonical and Noncanonical Pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 2016;358(2):342-51.

(45) Unal H. Luciferase reporter assay for unlocking ligand-mediated signaling of GPCRs. *Methods in Cell Biology*. doi:10.1016/bs.mcb.2018.08.001 2018;149:19-30.

(46) Nobles KN, Xiao K, Ahn S, Shukla AK, Lam CM, Rajagopal S, et al. Distinct phosphorylation sites on the $\beta(2)$ -adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of β -arrestin. *Sci Signal* 2011;4(185):51.

(47) Mackie K, Lai Y, Westenbroek R, Mitchell R. Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *The Journal of neuroscience* 1995 Oct 1;15(10):6552-6561.

(48) Haspula D, Clark MA. Cannabinoid Receptors: An Update on Cell Signaling, Pathophysiological Roles and Therapeutic Opportunities in Neurological, Cardiovascular, and Inflammatory Diseases. *International journal of molecular sciences* 2020 Oct 17;21(20):7693.

(49) Nogueras-Ortiz C, Yudowski GA. The Multiple Waves of Cannabinoid 1 Receptor Signaling. *Molecular pharmacology* 2016 Nov;90(5):620-626.

(50) Delgado-Peraza F, Ahn KH, Nogueras-Ortiz C, Mungrue IN, Mackie K, Kendall DA, Yudowski GA. Mechanisms of Biased β -Arrestin-Mediated Signaling

Downstream from the Cannabinoid 1 Receptor. Erratum in: *Mol Pharmacol* 2016;90(1):62.

(51) Nguyen PT, Schmid CL, Raehal KM, Selley DE, Bohn LM, Sim-Selley LJ. β -Arrestin2 Regulates Cannabinoid CB1 Receptor Signaling and Adaptation in a Central Nervous System Region–Dependent Manner. *Biological psychiatry* (1969) 2012;71(8):714-724.

(52) Ahn KH, Mahmoud MM, Shim J, Kendall DA. Distinct Roles of β -Arrestin 1 and β -Arrestin 2 in ORG27569-induced Biased Signaling and Internalization of the Cannabinoid Receptor 1 (CB1). *The Journal of biological chemistry* 2013 Apr 5,;288(14):9790-9800.

(53) Graham ES, Ball N, Scotter EL, Narayan P, Dragunow M, Glass M. Induction of Krox-24 by Endogenous Cannabinoid Type 1 Receptors in Neuro2A Cells Is Mediated by the MEK-ERK MAPK Pathway and Is Suppressed by the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway. *The Journal of biological chemistry* 2006 Sep 29,;281(39):29085-29095.

(54) Haspula D, Clark MA. MAPK activation patterns of AT1R and CB1R in SHR versus Wistar astrocytes: Evidence of CB1R hypofunction and crosstalk between AT1R and CB1R. *Cellular signalling* 2017 Dec;40:81-90.

(55) Blázquez C, Chiarlone A, Bellocchio L, Resel E, Pruunsild P, García-Rincón D, et al. The CB₁ cannabinoid receptor signals striatal neuroprotection via a PI3K/Akt/mTORC1/BDNF pathway. *Cell Death and Differentiation* 2015 Oct;22(10):1618-1629.

(56) Chanda D, Kim D, Li T, Kim Y, Koo S, Lee C, et al. Cannabinoid Receptor Type 1 (CB1R) Signaling Regulates Hepatic Gluconeogenesis via Induction of Endoplasmic Reticulum-bound Transcription Factor cAMP-responsive Element-binding Protein H (CREBH) in Primary Hepatocytes. *The Journal of biological chemistry* 2011 Aug 12,;286(32):27971-27979.

(57) Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Marchand J, Canat X, Bourrié B, Rinaldi-Carmona M, et al. Signaling Pathway Associated with Stimulation of CB2 Peripheral Cannabinoid Receptor. Involvement of Both Mitogen-Activated Protein Kinase and Induction of Krox-24 Expression. *European journal of biochemistry* 1996 May 1,;237(3):704-711.

(58) Nogueras-Ortiz C, Roman-Vendrell C, Mateo-Semidey GE, Liao Y, Kendall DA, Yudowski GA. Retromer stops beta-arrestin 1-mediated signaling from internalized

cannabinoid 2 receptors. *Molecular Biology of the Cell* 2017 Nov 15,;28(24):3554-3561.

(59) Lauckner JE, Hille B, Mackie K. The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB1 receptor coupling to Gq/11 G proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS* 2005 Dec 27,;102(52):19144-19149.

(60) Laprairie RB, Bagher AM, Kelly MEM, Dupré DJ, Denovan-Wright EM. Type 1 Cannabinoid Receptor Ligands Display Functional Selectivity in a Cell Culture Model of Striatal Medium Spiny Projection Neurons. *The Journal of biological chemistry* 2014 Sep 5,;289(36):24845-24862.

(61) Navarrete M, Araque A. Endocannabinoids Mediate Neuron-Astrocyte Communication. *Neuron (Cambridge, Mass.)* 2008;57(6):883-893.

(62) Zoratti C, Kipmen-Korgun D, Osibow K, Malli R, Graier WF. Anandamide initiates Ca²⁺ signaling via CB2 receptor linked to phospholipase C in calf pulmonary endothelial cells. *British journal of pharmacology* 2003 Dec;140(8):1351-1362.

(63) Kearns CS, Blake-Palmer K, Daniel E, Mackie K, Glass M. Concurrent Stimulation of Cannabinoid CB1 and Dopamine D2 Receptors Enhances Heterodimer Formation: A Mechanism for Receptor Cross-Talk? *Molecular pharmacology* 2005 May 1,;67(5):1697-1704.

(64) CARRIBA P, ORTIZ O, CASADO V, CANELA EI, LLUIS C, GOLDBERG SR, et al. Striatal Adenosine A2A and Cannabinoid CB1 Receptors Form Functional Heteromeric Complexes that Mediate the Motor Effects of Cannabinoids. *Neuropsychopharmacology (New York, N.Y.)* 2007;32(11):2249-2259.

(65) Cinar R, Freund Tf, Katona I, Mackie K, Szucs M. Reciprocal inhibition of G-protein signaling is induced by CB1 cannabinoid and GABAB receptor interactions in rat hippocampal membranes. *Neurochemistry international* 2008;52(8):1402-1409.

(66) Rozenfeld R, Gupta A, Gagnidze K, Lim MP, Gomes I, Lee-Ramos D, et al. AT1R-CB1R heteromerization reveals a new mechanism for the pathogenic properties of angiotensin II. *The EMBO journal* 2011 Jun 15,;30(12):2350-2363.

(67) Callén L, Moreno E, Barroso-Chinea P, Moreno-Delgado D, Cortés A, Mallol J, et al. Cannabinoid Receptors CB1 and CB2 Form Functional Heteromers in Brain. *The Journal of biological chemistry* 2012 Jun 15,;287(25):20851-20865.

(68) Turu G, Várnai P, Gyombolai P, Szidonya L, Offertaler L, Bagdy G, et al. Paracrine Transactivation of the CB1 Cannabinoid Receptor by AT1 Angiotensin and

- Other Gq/11 Protein-coupled Receptors. *The Journal of biological chemistry* 2009 Jun 19,;284(25):16914-16921.
- (69) Gyombolai P, Pap D, Turu G, Catt KJ, Bagdy G, Hunyady L. Regulation of endocannabinoid release by G proteins: A paracrine mechanism of G protein-coupled receptor action. *Molecular and cellular endocrinology* 2012 Apr 28,;353(1-2):29-36.
- (70) Letierrier C, Bonnard D, Carrel D, Rossier J, Lenkei Z. Constitutive Endocytic Cycle of the CB1 Cannabinoid Receptor. *The Journal of biological chemistry* 2004 Aug 20,;279(34):36013-36021.
- (71) Bénard G., Massa F., Puente N., Lourenço J., Bellocchio L., Soria-Gómez E., Matias I., Delamarre A., Metna-Laurent M., Cannich A., et al. Mitochondrial CB1 receptors regulate neuronal energy metabolism-Supplementary information. *Nat. Neurosci* 2012;15(558–564.).
- (72) Miller LK, Devi LA. The highs and lows of cannabinoid receptor expression in disease: mechanisms and their therapeutic implications. *Pharmacological reviews* 2011 Sep;63(3):461-470.
- (73) Laprairie R, Kelly M, Denovan-Wright E. The dynamic nature of type 1 cannabinoid receptor (CB1) gene transcription. *British journal of pharmacology* 2012 Dec;167(8):1583-1595.
- (74) Mukhopadhyay B, Liu J, Osei-Hyiaman D, Godlewski G, Mukhopadhyay P, Wang L, et al. Transcriptional Regulation of Cannabinoid Receptor-1 Expression in the Liver by Retinoic Acid Acting via Retinoic Acid Receptor- γ . *The Journal of biological chemistry* 2010 Jun 18,;285(25):19002-19011.
- (75) Hegyi Z, Oláh T, Kőszeghy Á, Piscitelli F, Holló K, Pál B, et al. CB1 receptor activation induces intracellular Ca²⁺ mobilization and 2-arachidonoylglycerol release in rodent spinal cord astrocytes. *Scientific Reports* 2018 Jul 12,;8(1):1-16.
- (76) Pertwee. Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. *Life Sci* 2005;76:1307.
- (77) Patel. et al. Cannabinoid CB1 receptor agonists produce cerebellar dysfunction in mice. *J.Pharmacol.Exp.Ther* :297-629.
- (78) Micale et al. The cannabinoid CB1 antagonist TM38837 with limited penetrance to the brain shows reduced fear-promoting effects in mice. *Front.Pharmacol* 2019;10.
- (79) German et al. Diarylureas as allosteric modulators of the cannabinoid CB1 receptor: structure-activity relationship studies on 1-(4-chlorophenyl)-3-{3-[6-

- (pyrrolidin-1-yl)pyridin-2-yl]phenyl}urea (PSNCBAM-1). . J.Med.Chem. 2014;57.
- (80) Laprairie RB, Bagher AM, Kelly ME, Denovan-Wright EM. Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor. Br J Pharmacol. 2015;172(20):4790-4805.
- (81) Manera et al. Design, synthesis, and biological evaluation of new 1,8-naphthyridin-4(1H)-on-3-carboxamide and quinolin-4(1H)-on-3-carboxamide derivatives as CB2 selective agonists. J.Med.Chem ;49:5947.
- (82) Pasquini et al. Investigations on the 4-quinolone-3-carboxylic acid motif. 2. Synthesis and structure-activity relationship of potent and selective cannabinoid-2 receptor agonists endowed with analgesic activity in vivo. J.Med.Chem ;51:5075.
- (83) Gado et al. Identification of the first synthetic allosteric modulator of the CB2 receptors and evidence of its efficacy for neuropathic pain relief. J.Med.Chem 2019;62:276.
- (84) Smith JS, Lefkowitz RJ, Rajagopal S. Biased signalling: from simple switches to allosteric microprocessors. Nat Rev Drug Discov. 2018 Apr;17(4):243-260. . 2018;17(4):243-260.
- (85) Samama P, Cotecchia S, Costa T, Lefkowitz RJ. A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. The Journal of biological chemistry 1993 Mar 5,;268(7):4625-4636.
- (86) Changeux J, Edelstein SJ. Allosteric Mechanisms of Signal Transduction. Science 2005 Jun 3,;308(5727):1424-1428.
- (87) Kjelsberg MA, Cotecchia S, Ostrowski J, Caron MG, Lefkowitz RJ. Constitutive activation of the alpha 1B-adrenergic receptor by all amino acid substitutions at a single site. Evidence for a region which constrains receptor activation. The Journal of biological chemistry 1992 Jan 25,;267(3):1430-1433.
- (88) Chen X, Bai B, Tian Y, Du H, Chen J. Identification of Serine 348 on the Apelin Receptor as a Novel Regulatory Phosphorylation Site in Apelin-13-induced G Protein-independent Biased Signaling. The Journal of biological chemistry 2014 Nov 7,;289(45):31173-31187.
- (89) Wanka L, Babilon S, Burkert K, Mörl K, Gurevich VV, Beck-Sickinger AG. C-terminal motif of human neuropeptide Y4 receptor determines internalization and arrestin recruitment. Cellular signalling 2017 Jan;29:233-239.
- (90) Zidar DA, Violin JD, Whalen EJ, Lefkowitz RJ. Selective Engagement of G Protein Coupled Receptor Kinases (GRKs) Encodes Distinct Functions of Biased

- Ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS* 2009 Jun 16,;106(24):9649-9654.
- (91) Urs NM, Gee SM, Pack TF, McCorvy JD, Evron T, Snyder JC, et al. Distinct cortical and striatal actions of a β -arrestin–biased dopamine D2 receptor ligand reveal unique antipsychotic-like properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS* 2016 Dec 13,;113(50):E8178-E8186.
- (92) Navarro G, Reyes-Resina I, Rivas-Santisteban R, Sánchez de Medina V, Morales P. Cannabidiol skews biased agonism at cannabinoid CB1 and CB2 receptors with smaller effect in CB1-CB2 heteroreceptor complexes. *Biochem Pharmacol* 2018;157:148-158.
- (93) Maayah ZH, Takahara S, Ferdaoussi M, Dyck JRB. The molecular mechanisms that underpin the biological benefits of full-spectrum cannabis extract in the treatment of neuropathic pain and inflammation. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2020;1866(7):165771.
- (94) P. Pacher, S. Batkai, G. Kunos. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol. Rev.* 2006;58:389–462.
- (95) A. Bilkei-Gorzo, O. Albayram, A. Draffehn, K. Michel, A. Piyanova, H. Oppenheimer. A chronic low dose of Delta(9)-tetrahydrocannabinol (THC) restores cognitive function in old mice. *Nat. Med* 2017;23:782–787.
- (96) C. Ibeas Bih, T. Chen, A.V. Nunn, M. Bazelot, M. Dallas, B.J. Whalley. Molecular targets of Cannabidiol in neurological disorders, *Neurotherapeutics. The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2015;12:699–730.
- (97) P. Seeman. Cannabidiol is a partial agonist at dopamine D2High receptors, predicting its antipsychotic clinical dose. *Transl. Psychiatry* 2016;6:920.
- (98) F.V. Gomes, L.B. Resstel, F.S. Guimaraes. The anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the bed nucleus of the stria terminalis are mediated by 5-HT1A receptors. *Psychopharmacology* 2011;213:465–473.
- (99) L. De Petrocellis, A. Ligresti, A.S. Moriello, M. Allara, T. Bisogno, S. Petrosino, C.G. Stott, V. Di Marzo. Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *Pharmacol.* 2011;163:1479–1494.

- (100) Ruhaak LR, Felth J, Karlsson PC, Rafter JJ, Verpoorte R, Bohlin L, 34(5):774-8. Evaluation of the cyclooxygenase inhibiting effects of six major cannabinoids isolated from *Cannabis sativa*. *Biol Pharm Bull.* 2011;34(5):774-8. 2011;34(5):774-778.
- (101) DeLong GT, Wolf CE, Poklis A, Lichtman AH. Pharmacological evaluation of the natural constituent of *Cannabis sativa*, cannabichromene and its modulation by $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol. *Drug and alcohol dependence* 2010 Nov 1,;112(1-2):126-133.
- (102) Cascio MG, Gauson LA, Stevenson LA, Ross RA, Pertwee RG. Evidence that the plant cannabinoid cannabigerol is a highly potent α_2 -adrenoceptor agonist and moderately potent 5HT_{1A} receptor antagonist. *British journal of pharmacology* 2010 Jan;159(1):129-141.
- (103) Comelli F, Giagnoni G, Bettoni I, Colleoni M, Costa B. Antihyperalgesic effect of a *Cannabis sativa* extract in a rat model of neuropathic pain: mechanisms involved. *Phytotherapy research* 2008 Aug;22(8):1017-1024.
- (104) Miyazawa M, Yamafuji C. Inhibition of Acetylcholinesterase Activity by Bicyclic Monoterpenoids. *Journal of agricultural and food chemistry* 2005 Mar 9,;53(5):1765-1768.
- (105) Klauke A-, Racz I, Pradier B, Markert A, Zimmer AM, Gertsch J, et al. The cannabinoid CB₂ receptor-selective phytocannabinoid beta-caryophyllene exerts analgesic effects in mouse models of inflammatory and neuropathic pain. *European neuropsychopharmacology* 2014 Apr 1,;24(4):608.
- (106) Alberti TB, Barbosa WLR, Vieira JLF, Raposo NRB, Dutra RC. (-)- β -Caryophyllene, a CB₂ Receptor-Selective Phytocannabinoid, Suppresses Motor Paralysis and Neuroinflammation in a Murine Model of Multiple Sclerosis. *International journal of molecular sciences* 2017 Apr 1,;18(4):691.
- (107) Kim HJ, Kim B, Park BM, Jeon JE, Lee SH, Mann S, et al. Topical cannabinoid receptor 1 agonist attenuates the cutaneous inflammatory responses in oxazolone-induced atopic dermatitis model. *International journal of dermatology* 2015 Oct;54(10):e401-e408.
- (108) Maresz K, Carrier EJ, Ponomarev ED, Hillard CJ, Dittel BN. Modulation of the cannabinoid CB₂ receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. *Journal of neurochemistry* 2005 Oct;95(2):437-445.
- (109) Galán-Ganga M, del Río R, Jiménez-Moreno N, Díaz-Guerra M, Lastres-

Becker I. Cannabinoid CB2 Receptor Modulation by the Transcription Factor NRF2 is Specific in Microglial Cells. Cellular and molecular neurobiology 2020 Jan 1,;40(1):167-177.

(110) Gaffal E, Cron M, Glodde N, Tüting T. Anti-inflammatory activity of topical THC in DNFB-mediated mouse allergic contact dermatitis independent of CB1 and CB2 receptors. Allergy (Copenhagen) 2013 Aug;68(8):994-1000.

(111) Philpott HT, O'Brien M, McDougall JJ. Attenuation of early phase inflammation by cannabidiol prevents pain and nerve damage in rat osteoarthritis. Pain (Amsterdam) 2017 Dec;158(12):2442-2451.

(112) Schuelert N, McDougall JJ. Cannabinoid-mediated antinociception is enhanced in rat osteoarthritic knees. Arthritis and rheumatism 2008 Jan;58(1):145-153.

(113) Romero V, Lara JR, Otero-Espinar F, Salgado MH, Modolo NSP, Barros, Guilherme Antonio Moreira de. Capsaicin topical cream (8%) for the treatment of myofascial pain syndrome. Revista brasileira de anestesiologia 2019 Sep;69(5):432-438.

(114) Xu DH, Cullen BD, Tang M, Fang Y. The Effectiveness of Topical Cannabidiol Oil in Symptomatic Relief of Peripheral Neuropathy of the Lower Extremities. Current pharmaceutical biotechnology 2020;21(5):390-402.

(115) Nitecka-Buchta A, Nowak-Wachol A, Wachol K, Walczyńska-Dragon K, Olczyk P, Batoryna O, et al. Myorelaxant Effect of Transdermal Cannabidiol Application in Patients with TMD: A Randomized, Double-Blind Trial. Journal of clinical medicine 2019 Nov 6,;8(11):1886.

CAPÍTULO 2

Validación de genes de referencia para la cuantificación relativa de la expresión de receptores cannabinoides en odontoblastos humanos mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

Resumen

La cuantificación relativa del nivel de expresión de un transcrito requiere de un gen de referencia el cual debe ser escogido y validado para cada contexto biológico particular. Las herramientas bioinformáticas permiten seleccionar mejores genes de referencia, para la evaluación más sensible de la expresión génica de moléculas de interés. El

objetivo fue realizar la identificación y validación de genes de referencia en odontoblastos humanos para la cuantificación de transcritos de los receptores cannabinoides. Los genes que se transcriben con mayor estabilidad en células odontoblásticas humanas, se identificaron usando la herramienta RefGenes y se seleccionaron para evaluar su amplificación en PCR en tiempo real. Células odontoblásticas humanas fueron diferenciadas a partir de células madre mesenquimales usando medio de diferenciación y TGF-beta, para la obtención de RNA total. Se realizó evaluación por RT-qPCR y análisis de cuantificación relativa usando el método de Scheffé. El conjunto de datos de expresión relativa se analizó para escoger el gen más estable. El análisis mostró que los genes CRN, LIM y FAM presentaron la menor variabilidad en su expresión (SD: 0.2, 0.17 y 0.16 respectivamente), además de tener un nivel de expresión similar a los genes diana. Se encontraron diferencias significativas en la expresión relativa de los mensajeros para receptores cannabinoides usando los genes seleccionados comparado con Beta actina ($p < 0.05$). La estrategia de búsqueda y verificación de nuevos genes de referencia permitieron describir con mayor exactitud y confiabilidad la expresión de receptores cannabinoides en células odontoblásticas humanas.

Introducción

La evaluación de la expresión génica por RT-qPCR permite, por medio de una cuantificación relativa, describir los cambios en la expresión del gen de interés comparado con sus niveles basales en una muestra sin tratamiento, esa cantidad es expresada como la relación entre la concentración de transcritos del gen de interés y un gen de referencia (1). Por esta razón es importante la elección de un método de cuantificación adecuado y de genes de referencia apropiados para calcular el cambio de la expresión de una manera más exacta y precisa y, de esta manera, tener resultados más confiables y robustos (2).

En 2009 se publicó la guía MIQE donde se dan los lineamientos básicos para la publicación de resultados de qPCR (3). En ésta, se recomienda el empleo de dos o más genes de referencia, que deben validarse para garantizar que tienen una expresión estable entre los grupos de tratamiento para el entorno experimental y el conjunto de muestras dadas.

Debido a que los genes de referencia utilizados para la estandarización son críticos, cualquier evaluación de la validez de un experimento de RT-qPCR debe considerar también la idoneidad de la referencia de cuantificación relativa. Su utilidad debe ser validada experimentalmente para determinados tejidos o tipos de células y diseños experimentales (4,5). Se recalca que no hacerlo puede tener efectos engañosos en los resultados al usar genes de referencia inadecuados para la cuantificación.

Dado que la normalización consiste en calcular las relaciones de las concentraciones de ARNm de los genes de interés con respecto a las de los genes de referencia, estos últimos deben expresarse de forma estable, y su abundancia debe mostrar una fuerte correlación con las cantidades totales de ARNm presente en las muestras (6). Además, los niveles de transcripción entre los genes de interés y los genes de referencia deben ser similares, ya que esto asegura que todas las transcripciones estén sujetas a las mismas interacciones cinéticas durante la qPCR (7).

La normalización con respecto a un único gen de referencia no es aceptable a menos que se presente evidencia robusta que confirme su expresión invariable en las distintas condiciones, por eso se recomienda el empleo de al menos dos genes de referencia y usar la media geométrica de los niveles de expresión para la normalización (2,6,7). Es por esta razón que el número óptimo y la elección de los genes de referencia deben determinarse experimentalmente.

Hruz, et al comprobaron dos hipótesis acerca de los genes de referencia, la primera es la de no generalidad, la cual plantea que ningún gen se expresa de forma estable, ya que todos están regulados hasta cierto punto, así que no existen genes con una expresión universalmente estable en cualquier condición. La segunda, es sobre la especificidad del contexto biológico, argumentando que para cada uno de ellos existe un subconjunto de genes con una menor variación de la expresión (8). En consecuencia, no deben utilizarse genes de referencia sin validación; una revisión sistemática demostró que en menos del 50% de las veces los genes de referencia de uso común como B-act, GAPDH y 18S son seleccionados (7).

En vista de que no se ha reportado una validación de genes de referencia para odontoblastos humanos diferenciados a partir de células madre mesenquimales de pulpa dental, Odontoblast Like Cells (OLC), el objetivo planteado en el presente trabajo fue describir y ejecutar una estrategia metodológica de identificación, elección y validación de genes de referencia para realizar cuantificación relativa de los niveles de expresión de transcritos de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 en odontoblastos humanos.

Materiales y métodos

Elección de genes

Para la elección de los genes más estables se usó la herramienta RefGenes de Genevestigator (<http://www.genevestigator.com/>), donde están recopilados grandes conjuntos de datos de microarrays para una condición específica o para un subconjunto de condiciones. De esta manera se permite la búsqueda de genes que presenten una variación de expresión mínima en un conjunto elegido de matrices que corresponden al contexto biológico específico. En este caso se escogieron las

matrices de datos que corresponden a Osteoblast Like Cells, las cuales son células con un fenotipo mineralizante similar a los OLC, ya que para estos últimos no se encuentra reporte. Adicionalmente, se usaron matrices de pulpa dental. De la lista de 20 genes que arrojó la herramienta, se escogieron 4 genes para OLC y 4 para pulpa dental usando como criterio de elección la desviación estándar y la facilidad de acceso a las secuencias.

Diseño de primers

Para el diseño de primers fue necesario realizar el análisis de los genes candidatos, ya que existen aspectos importantes a tener en cuenta a la hora de escoger los genes a partir del listado generado por Genevestigator.

Como secuencias candidatas para validación se tuvieron en cuenta 4 que correspondían a genes no codificantes para proteínas; estas secuencias pueden ser consideradas pues la PCR detecta transcritos y no proteínas. Se seleccionaron los genes con un nivel de expresión similar al gen diana y poca variación de la expresión, es decir, una baja desviación estándar.

La búsqueda de la información de los genes candidatos se realizó en GeneCards (<https://www.genecards.org>), una base de datos de acceso libre donde se encontró el tamaño de cada gen, el nombre completo y nombres alternativos, la función dentro del organismo y/o células específicas, y la ubicación en el cromosoma; además, permitió el acceso a la secuencia de ADN del gen y a la información de los exones. A través de GeneCards, adicionalmente, se obtuvo acceso a la base de datos GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica, en donde fue obtenida la secuencia de nucleótidos de cada gen y, posteriormente, gracias a las coordenadas genómicas de los genes, se seleccionaron los exones que tuvieran un tamaño adecuado, con información suministrada por el programa GeneLoc, anexo a GeneCards.

En la página de GenBank se buscó la secuencia de interés en formato FASTA, la cual se basa en la representación de nucleótidos asignando códigos de una sola letra; como respuesta, se mostró la secuencia completa y luego se seleccionaron los bases correspondientes al exón seleccionado.

Dado que los primers diseñados deben tener una alta especificidad de amplificación, la secuencia del exón escogido para cada gen de referencia se introdujo en la herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Por medio del programa adjunto "*Nucleotide BLAST*" se buscaron las similitudes con otras secuencias, los resultados se visualizaron en listado, mostrando el nombre de las secuencias con similitudes, la especie de origen, el puntaje de identidad, la cobertura y el porcentaje de identidad, y

el código de acceso de la secuencia; y en forma gráfica, donde se facilitó interpretar la región en la que se encontraron las coincidencias.

Finalmente, el diseño de primers para cada plantilla se realizó en la página de BLAST, con la herramienta bioinformática anexa *Primer-BLAST*, estableciendo el tamaño del producto esperado en un rango de 150-170 pb para asegurar una adecuada eficiencia de la reacción y un tamaño de amplicón suficiente para el diseño de sondas en el sistema de detección de la qPCR. Los parámetros de temperatura de fusión de los primers se dejaron sin modificaciones, es decir, con las características que el programa ofrece por defecto, asignando una temperatura mínima, óptima y máxima de 57°C, 60°C y 63°C, respectivamente, y la máxima diferencia de temperatura de fusión entre par de primers se dejó establecida en 3°C. Al mismo tiempo, los parámetros para la especificidad del par de primers en la amplificación se dejaron configurados con la habilitación de la búsqueda automática de primers específicos para la plantilla seleccionada e ignorando plantillas cuando estas tengan 6 o más discrepancias en la complementariedad con la secuencia de los primers, así como la inclusión de primers que tengan por lo menos 2 discrepancias con objetivos indeseados. La especificidad de los primers por especie se limitó a *Homo sapiens*.

Cultivo celular

Células odontoblásticas humanas fueron diferenciadas a partir de células madre mesenquimales de pulpa dental de terceros molares sanos, usando medio de diferenciación y TGF-beta como fue descrito anteriormente (9). Se sembraron 25.000 células en 3 placas de 6 pozos con Dulbecco's Modified Eagle Culture Medium (DMEM) (Hyclone, Thermo Scientific, Bremen, Germany) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco; Thermo Fisher Scientific), antibiótico 1% (100 U/mL penicilina + 100 µg/mL estreptomycin) y 10 ng/mL de TGF-β1 (Abcam, Cambridge, MA, USA) e incubados por 24 horas a 37°C, con una atmósfera humidificada con 5% de dióxido de carbono (CO₂), hasta alcanzar una confluencia del 70%.

El cultivo celular de odontoblastos en condiciones de inflamación se llevó a cabo estimulando un grupo de células con 2 µg/mL de lipopolisacárido de *E. coli* (LPS) y otro grupo con 40 µg/mL de Poly I:C por 24 horas, para simular infección bacteriana y viral respectivamente. Células sin estimular fueron utilizadas como control y para la normalización durante los análisis de expresión. Las células se recolectaron y se realizó la extracción de RNA con Trizol®.

Validación de genes

Para cuantificar la variación en los niveles de expresión en diferentes condiciones se utilizó la técnica de RT-qPCR utilizando SYBR Green (Luna® Universal One RT-qPCR Kit, New England BioLabs; USA) y el sistema de detección del termociclador en tiempo real CFX96 (BioRad; Hercules, CA, USA). Las condiciones de amplificación fueron las

siguientes: retrotranscripción por 10 min a 55°C, denaturación por 3 min a 95°C, 40 ciclos de amplificación con una temperatura de denaturación de 95°C por 15 seg y una temperatura de alineamiento de 60°C por 30 seg, se realizó curva de melting para confirmar la especificidad de los productos amplificados. Además de los genes escogidos se amplificaron tres ARNm de genes de referencia de uso común: GAPDH, B-act y 18S; dos genes como marcadores de fenotipo odontoblástico: DSPP y DMP1; y dos genes diana: CB1 y CB2 (Tabla 1).

La eficiencia de la PCR se calculó usando LinRegPCR (Academic Medical Center, AMC, Amsterdam, Netherlands). Se realizó cuantificación relativa para los transcritos de los receptores cannabinoides CB1 y CB2, normalizando con los mejores genes de referencia, teniendo como criterio para su elección las menores desviaciones estándar y los niveles de expresión similares a los genes diana y el análisis en Bestkeeper. La cuantificación y comparación de transcritos se llevó a cabo utilizando el método de Scheffé (10) utilizando como muestra control las células sin estimular.

Análisis de datos

Los datos se organizaron en hojas de cálculo en el programa Excel (Microsoft Office 2010). Los valores del ciclo de cuantificación (Cq) y las eficiencias de los genes de referencia y los genes diana fueron introducidos en la plantilla de Excel de Bestkeeper para elegir los mejores genes de referencia. Este índice calcula la media geométrica de los genes que se expresan con una desviación estándar (DE) inferior a 1 y el coeficiente de correlación de Pearson. Las gráficas se realizaron usando GraphPad Prism 7.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Todos los experimentos se realizaron por duplicado y 3 réplicas (n=12) por condición. El análisis de varianza de una vía ANOVA fue utilizado para determinar el valor de P usando un valor alfa < 0.05.

Resultados

Un total de 11 genes fueron seleccionados como candidatos para ser usados como genes de referencia. Son primers que amplifican todas las variantes de cada uno de los genes y son altamente específicos para *Homo sapiens*.

La especificidad de los primers fue confirmada corriendo el producto de amplificación de la RT-qPCR en gel de agarosa al 2%, todos los primers generan productos específicos pues se observa una sola banda en los tamaños de amplicón esperados.

Los valores Cq obtenidos por RT-qPCR se utilizaron para proporcionar una visión general de los niveles de expresión de los genes candidatos en todas las muestras, las medias de los valores Cq de los genes de referencia estuvieron entre 11 y 32.

La subunidad 18S resultó ser el gen más abundantemente expresado con el menor valor medio de Cq (11.54) y las desviaciones estándar entre 0.07 y 0.8 para las diferentes muestras. Por su parte GAPDH obtuvo la menor variación en la expresión (0.08), adicionalmente se calculó la eficiencia de los primers la cual osciló entre 1.94 y 2.07, la de B-act fue la más baja (1.69). Los genes que se escogieron como posibles genes de referencia por tener las menores desviaciones estándar y unos niveles de expresión similares a los genes diana fueron: CRN, FAM2 y LMX.

El análisis de la estabilidad de la expresión génica se realizó utilizando el índice de Bestkeeper, donde se calculó la media geométrica (GM), la desviación estándar (SD), el coeficiente de correlación (r) y el valor p. Los genes de referencia más estables fueron: CNR, LMX y FAM2, pues tuvieron un coeficiente de correlación (r) mayor entre los genes con SD menor a 1 y un x-fold menor a 2.

Para verificar las diferencias en los cambios de expresión (*fold change*) usando los genes de referencia escogidos y B-act, se realizó la cuantificación relativa de los genes diana CB1 y CB2. Al normalizar los mismos datos respecto a diferentes genes de referencia, se observa que hay una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.03$) entre los *fold change* obtenidos con B-act y los demás genes.

Discusión

Los odontoblastos son células diferenciadas que se encuentran en la pulpa dental en forma de empalizada, con prolongaciones que se extienden a lo largo de los túbulos dentinales, son las primeras células en responder a los estímulos externos, químicos y físicos, como cambios en la temperatura y la osmolaridad, pérdida de la integridad dentinal e infecciones bacterianas (19). Por lo tanto, conocer los diferentes perfiles de expresión de estas células es crucial para entender su papel fisiológico en los procesos de nocicepción e inflamación de la pulpa dental.

Los receptores cannabinoides CB1 y CB2 son receptores tipo GPCR que se encuentran en la membrana celular, núcleo y organelos de varios tipos celulares (20). Se han encontrado expresados en pulpa dental y odontoblastos en modelos murinos (21), también está reportada la presencia de CB1 en odontoblastos humanos (22). Es por esta razón que es importante estudiar la presencia de ambos receptores en odontoblastos humanos, pues es el primer paso para poder considerarlos como blancos farmacológicos para el tratamiento del dolor y la inflamación dental.

La evaluación de la expresión de estos receptores en odontoblastos humanos y pulpa dental requiere de técnicas moleculares como RT-qPCR. No existe información de que en esta línea celular se haya realizado validación de genes de referencia para la cuantificación relativa de transcritos. Por esa razón describir y llevar cabo el protocolo de validación de genes de referencia en diferentes condiciones de inflamación permitió encontrar los mejores genes para realizar la normalización de datos, con el fin de garantizar resultados certeros y confiables siempre que se requiera evaluar la expresión de un gen en odontoblastos humanos.

Durante el desarrollo de la metodología se pudo evidenciar que la rigurosidad en cada uno de los pasos de la validación es crucial para obtener los mejores genes de referencia posibles. Por una parte, es importante que los genes candidatos se escojan de un conjunto de datos de secuenciación previamente evaluados en los tejidos y células de interés o similares (23,24).

La elección de genes se realizó en Genevestigator, una herramienta en línea que ayuda a identificar genes que muestran una alta estabilidad de expresión en un conjunto de condiciones elegido (8). De esta manera los investigadores pueden identificar, a partir de todos los genes representados en los microarrays, aquellos que se expresan de forma más estable en condiciones similares a la de sus experimentos. Se trata de una base de datos de microarrays (47.000 conjuntos de sondas en más de 5000 matrices), anotados sistemáticamente y con control de calidad de varios organismos. En esta plataforma se utilizaron microarrays del sistema Affymetrix, que es un sistema de alta reproducibilidad, así que todos sus protocolos, medidas de control de calidad y datos tienen alto grado de homogeneidad (8).

Para la validación de genes se usó Bestkeeper, una herramienta que determina los estándares más adecuados, de entre diez candidatos, y los combina en un índice (25). El índice puede compararse con otros diez genes objetivo para decidir si se expresan de forma diferencial bajo un tratamiento aplicado. según Pfaffl et al, todo el procesamiento de datos se basa en los puntos de cruce, los genes con una SD menor a 1, con un coeficiente de correlación de Pearson mayor y con un x-fold menor a 2 se consideran los genes más estables (25).

En los resultados se observa que B-act tiene las desviaciones estándar más bajas, sin embargo, tiene unos niveles de expresión muy altos comparado a los genes diana (bajo Cq). Por otro lado, 18S tiene los niveles de expresión más altos, pero también una de las mayores desviaciones estándar, por esta razón se excluyó para realizar cuantificación relativa; esto está acorde a otros estudios, pues se ha reportado que al usar RNA ribosomal se obtienen medias de expresión altas (22).

GAPDH obtuvo la menor desviación estándar, pero tiene niveles de expresión más altos que los genes diana, aun así, fue el gen de referencia de uso común que mostró un adecuado desempeño. El gen que mostró los mejores resultados por tener una

desviación estándar baja y un nivel similar de expresión a CB1 y CB2 fue CRN, no se encontró evidencia de su utilización previa como gen de referencia.

La validación de genes en la herramienta Bestkeeper estuvo acorde al primer análisis de datos, CRN resultó ser el gen que obtuvo un mayor coeficiente de correlación entre los genes más estables, lo que refuerza la idea de que es un buen gen para utilizar en cuantificación relativa de qPCR en cultivo de odontoblastos humanos.

Al aplicar el método Scheffé normalizando con los mismos valores para CB1 y CB2 y cambiando los del genes de referencia por los datos de los genes con mejores resultados (LMX, FAM2, GAPDH, CRN, B-act), se observan diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión cuando se usa B-act como normalizador (26-28), demostrando que es importante que los genes de referencia escogidos tengan un nivel de expresión similar a los genes diana, no es suficiente tener una baja variabilidad en la expresión; esta es la razón de que en muchos estudios se descarte este gen para ser usado como gen de referencia (7,29) . El GAPDH no mostró diferencia significativa comparado a los demás genes, por lo cual podría también ser utilizado en este sistema celular.

Los resultados de la cuantificación relativa reafirmaron que un buen gen para normalizar es CRN. Para obtener mejores resultados se recomienda normalizar con al menos dos genes de referencia (2) y en odontoblastos humanos también podrían utilizarse GAPDH, LMX o FAM2, la media geométrica de esas cuantificaciones sería resultado adecuado para evaluar los niveles de expresión de los receptores cannabinoides. Para la evaluación de otro gen de interés podrían usarse estos mismos datos, y el gen de referencia adecuado debe escogerse teniendo en cuenta los niveles de expresión del gen diana.

Se ha reportado que el uso de los genes de referencia comúnmente utilizados puede conducir a una importante distorsión de los datos de expresión (2), los resultados mostraron que en este sistema de odontoblast like cells también. Por esta razón, es importante siempre realizar la validación de los genes de referencia antes de hacer evaluación de los niveles de expresión de un gen en cada contexto biológico, pues no existen genes que tengan una estabilidad universal en la expresión (8).

Conclusiones

Los resultados evidenciaron que la expresión de los genes de control interno varía, por lo que es necesario validar los genes de referencia para su uso en la normalización de la RT-qPCR en odontoblastos humanos.

Los diferentes análisis de datos sugieren que el gen más estable y con un perfil de expresión más adecuado para la cuantificación relativa de transcritos de CB1 y CB2 en las diferentes condiciones evaluadas es CRN.

Las herramientas bioinformáticas permiten seleccionar mejores genes de referencia para la evaluación más sensible de la expresión génica de moléculas de interés. La estrategia de búsqueda y verificación de nuevos genes de referencia permitieron describir con mayor exactitud y confiabilidad la expresión de receptores cannabinoides en células odontoblásticas humanas.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses conocidos, ni relaciones personales que pudieran influir en el trabajo presentado.

Financiación

Esta investigación fue parcialmente financiada por Biominerales Pharma (Bogotá) y el Centro de Investigación y Extensión (Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá)

Agradecimientos

A las doctoras Myriam L. Velandia-Romero y Eliana P. Calvo (Universidad El Bosque, Bogotá) por su amable colaboración con los experimentos de cultivo celular y el análisis bioinformático respectivamente.

Referencias

- (1) Prada-Arismendy J, Castellanos JE. Real time PCR. Application in dengue studies. Colombia médica (Cali, Colombia) 2011 Jun 6,;42(2):243-258.
- (2) Köhler M, Leitsch D, Müller N, Walochnik J. Validation of reference genes for the normalization of RT-qPCR gene expression in *Acanthamoeba* spp. Scientific reports 2020 Jun 25,;10(1):10362.
- (3) Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. Clinical chemistry (Baltimore, Md.) 2009 Apr 1,;55(4):611-622.
- (4) Romero Geraldo R, Hernández Saavedra N, Fimbres Olivarría D, García Lagunas N. Validation of suitable reference genes for quantitative real-time PCR normalization in *Crassostrea gigas* spat stage during toxic dinoflagellates exposure. Biotechnia 2020;22(2):94-102.
- (5) Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, ZumLa A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR.

- BioTechniques 2004 Jul 1,;37(1):112-119.
- (6) Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR. Control Selection for RNA Quantitation. BioTechniques 2000 Aug 1,;29(2):332-337.
- (7) Chapman JR, Waldenström J. With Reference to Reference Genes: A systematic review of endogenous controls in gene expression studies. PLoS one 2015;10(11):e0141853.
- (8) Hruz T, Wyss M, Docquier M, Pfaffl MW, Masanetz S, Borghi L, et al. RefGenes: identification of reliable and condition specific reference genes for RT-qPCR data normalization. BMC genomics 2011 Mar 21,;12(1):156.
- (9) Baldión PA, Velandia-Romero ML, Castellanos JE. Odontoblast-Like Cells Differentiated from Dental Pulp Stem Cells Retain Their Phenotype after Subcultivation. Int J Cell Biol 2018 Feb.
- (10) SCHEFE JH, LEHMANN KE, BUSCHMANN IR, UNGER T, FUNKE-KAISER H. Quantitative real-time RT-PCR data analysis : current concepts and the novel gene expression's CT difference formula. Journal of molecular medicine (Berlin, Germany) 2006;84(11):901-910.
- (11) Qian H, Zhao Y, Peng Y, Han C, Li S, Huo N, Et. al. Activation of cannabinoid receptor CB2 regulates osteogenic and osteoclastogenic gene expression in human periodontal ligament cells. Journal of Periodontal Research 2010;45(4):504-511.
- (12) Ito S, Gojoubori T, Tsunoda K, Yamaguchi Y, Asano M, Goke E, et al. Nicotine-induced expression of low-density lipoprotein receptor in oral epithelial cells. PLoS ONE 2013;8(12):e82563.
- (13) Ockenga W, Kühne S, Bocksberger S, Banning A, Tikkanen R. Epidermal growth factor receptor transactivation is required for mitogen-activated protein kinase activation by muscarinic acetylcholine receptors in HaCaT keratinocytes. International Journal of Molecular Sciences 2014 Nov 21,;15(11):21433-21454.
- (14) Graeser A, Huebbe P, Storm N, Höppner W, Döring F, Wagner AE, et al. Apolipoprotein E genotype affects tissue metallothionein levels: studies in targeted gene replacement mice. Genes & nutrition 2012 Apr;7(2):247-255.
- (15) Zheng X, Rao X, Gomez-Gutierrez JG, Hao H, McMasters KM, Zhou HS. Adenovirus E1B55K Region Is Required To Enhance Cyclin E Expression for Efficient Viral DNA Replication. Journal of Virology 2008 Apr 1,;82(7):3415-3427.
- (16) Vuong HG, Kondo T, Oishi N, Nakazawa T, Mochizuki K, Miyauchi A, et al. Paediatric follicular thyroid carcinoma – indolent cancer with low prevalence of RAS mutations and absence of PAX8–PPARG fusion in a Japanese population. Histopathology 2017 Nov;71(5):760-768.
- (17) Nikiforova MN, Biddinger PW, Caudill CM, Kroll TG, Nikiforov YE. PAX8-PPARGgamma rearrangement in thyroid tumors: RT-PCR and immunohistochemical analyses. The American journal of surgical pathology 2002 Aug;26(8):1016-1023.
- (18) Lim H, Nam OH, Kim M, El-Fiqi A, Yun H, Lee Y, et al. Delivery of dexamethasone from bioactive nanofiber matrices stimulates odontogenesis of human dental pulp cells through integrin/BMP/mTOR signaling pathways. International Journal of Nanomedicine 2016;11:2557-2567.
- (19) Solé-Magdalena A, Martínez-Alonso M, Coronado CA, Junquera LM, Cobo J,

- Vega JA. Molecular basis of dental sensitivity: The odontoblasts are multisensory cells and express multifunctional ion channels. . Ann Anat. 2018;215:20-29.
- (20) Haspula D, Clark MA. Cannabinoid Receptors: An Update on Cell Signaling, Pathophysiological Roles and Therapeutic Opportunities in Neurological, Cardiovascular, and Inflammatory Diseases. International journal of molecular sciences 2020 Oct 17,;21(20):7693.
- (21) Somsak. M, Sopee .P, Pornpoj. F. Cannabinoid receptor 1 (CB1R) expression in rat dental pulp. Oral Science International 2012;9(1):17-20.
- (22) Que K, PhD, He D, MD, Jin Y, MD, Wu L, MD, Wang F, MD, Zhao Z, MD, et al. Expression of Cannabinoid Type 1 Receptors in Human Odontoblast Cells. Journal of endodontics 2016;43(2):283-288.
- (23) Hossain MS, Ahmed R, Haque MS, Alam MM, Islam MS. Identification and validation of reference genes for real-time quantitative RT-PCR analysis in jute. BMC Molecular Biology 2019 Apr 29,;20(1):13.
- (24) Mar JC, Kimura Y, Schroder K, Irvine KM, Hayashizaki Y, Suzuki H, et al. Data-driven normalization strategies for high-throughput quantitative RT-PCR. BMC Bioinformatics 2009 Apr 19,;10(1):110.
- (25) Pfaffl M, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians T. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. Biotechnology Letters 2004 Mar;26(6):509-515.
- (26) Maresz K, Carrier EJ, Ponomarev ED, Hillard CJ, Dittel BN. Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. Journal of neurochemistry 2005 Oct;95(2):437-445.
- (27) Abidi, A. H., Alghamdi, S. S., Dabbous, M. K., Tipton, D. A., Mustafa, S. M., Moore BM. Cannabinoid type-2 receptor agonist, inverse agonist, and anandamide regulation of inflammatory responses in IL-1 β stimulated primary human periodontal ligament fibroblasts. J Periodontal Res 2020;55(5):762-783.
- (28) Ossola CA, Surkin PN, Mohn CE, Elverdin JC, Fernández-Solari J. Anti-Inflammatory and Osteoprotective Effects of Cannabinoid-2 Receptor Agonist HU-308 in a Rat Model of Lipopolysaccharide-Induced Periodontitis. J Periodontol. 2016;87(6):725-734.
- (29) Adeola F. Normalization of Gene Expression by Quantitative RT-PCR in Human Cell Line: comparison of 12 Endogenous Reference Genes. Ethiopian journal of health sciences 2018 Nov;28(6):741-748.

CAPÍTULO 3

Los desafíos inmunológicos regulan la expresión de los receptores cannabinoides en cultivos de odontoblastos y fibroblastos gingivales humanos

Resumen

Los odontoblastos y los fibroblastos gingivales juegan un papel esencial en los procesos fisiológicos y patológicos de los tejidos dentales. Los receptores cannabinoides (CB1 y CB2) están involucrados en la analgesia mediante la activación de canales de calcio que inhiben la síntesis de algunos neurotransmisores. Un mejor conocimiento de su fisiología abre la posibilidad de utilizar estos receptores como dianas terapéuticas en el control del dolor dental. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la presencia y la actividad de los receptores cannabinoides en células humanas similares a los odontoblastos (OLC) y en fibroblastos gingivales humanos (HGF). Se analizó la transcripción de CB1 y CB2 por PCR en tiempo real, la detección de las proteínas por inmunofluorescencia y se evaluaron los receptores cannabinoides funcionales midiendo las concentraciones de calcio intracelular, tras la estimulación con agonistas específicos para CB1, CB2 y TRPV1. Se encontraron transcripciones para CB1 y CB2 tanto en odontoblastos como en fibroblastos gingivales. El cannabidiol indujo un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en ambos tipos de células, pero sorprendentemente el pretratamiento con antagonistas cannabinoides selectivos atenuó este efecto, lo que sugiere una comunicación funcional entre receptores cannabinoides específicos y otros receptores diana del CBD. En conclusión, los odontoblastos humanos y los fibroblastos gingivales expresan receptores cannabinoides CB1 y CB2 funcionales, que podrían ser modulados para mejorar el tratamiento del dolor o la sensibilidad dental.

Palabras clave: Receptor cannabinoide tipo 1 (CB1), receptor cannabinoide tipo 2 (CB2), dolor dental, odontoblastos, fibroblastos gingivales.

Introducción

El dolor dental, la sensibilidad dentinal y la periodontitis son causados por daños estructurales en el esmalte, la dentina y los tejidos periodontales, regularmente desencadenados por el biofilm en estas superficies. El dolor dental asociado a estímulos microbiológicos, físicos o químicos es la causa más frecuente de consulta al odontólogo y afecta a la calidad de vida de los pacientes. Actualmente, para su tratamiento se utilizan con frecuencia antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y opioides (1), pero en muchos casos son insuficientes debido a los diversos procesos fisiológicos que intervienen en el proceso (2). Los odontoblastos y los fibroblastos gingivales se encuentran en la pulpa y en la encía, respectivamente, y son esenciales para la salud bucodental, ya que responden a los estímulos nocivos externos y participan en las actividades de mecanotransducción y reparación de los tejidos mediante la expresión de diversos canales y receptores iónicos (3,4).

Los receptores cannabinoides son receptores acoplados a proteínas G que se encuentran principalmente en la membrana plasmática (5,6). La unión del ligando genera cambios alostéricos en el receptor permitiendo la activación o inhibición de

múltiples vías de señalización; en ese sentido, la respuesta celular depende del tipo de agonista y del contexto biológico (7,8).

El papel de CB1 y CB2 en la regulación de las vías del dolor a través de la modulación de la liberación de neurotransmisores en las terminaciones nerviosas está ampliamente reportado (9). Igualmente, existe evidencia del efecto antiinflamatorio causado por la activación de ambos receptores (10). Por estos motivos, se han investigado como dianas terapéuticas para el tratamiento del dolor y la inflamación.

En varias condiciones patológicas, la expresión de los receptores cannabinoides está regulada para mantener la homeostasis y los procesos fisiológicos, por lo que diferentes células y tejidos los expresan para mediar efectos antinociceptivos y antiinflamatorios (11).

En los tejidos dentales, ambos receptores podrían tener un papel crucial en la transducción sensorial dental, la biomineralización y la reparación de los tejidos (12), lo que explica la intensa investigación realizada en el tema en los últimos años. Se ha demostrado la expresión de ambos receptores en odontoblastos murinos y en fibroblastos gingivales (13-15), y se ha encontrado CB1 en los cultivos primarios de odontoblastos humanos (12). Además, la presencia de CB2 en los fibroblastos gingivales parece estar implicada en el control del entorno inflamatorio, como ocurre durante la periodontitis (16).

En este trabajo, nos propusimos evaluar la presencia y actividad de los receptores cannabinoides en cultivos de células similares a odontoblastos y en fibroblastos gingivales humanos primarios, y evaluar el cambio en la expresión de CB1 y CB2 bajo condiciones inflamatorias en los odontoblastos. Los resultados proporcionarán información importante que puede utilizarse para desarrollar nuevas opciones terapéuticas utilizando los receptores cannabinoides como diana farmacológica para el control del dolor y la inflamación.

Materiales y métodos

Cultivo celular

Las células similares odontoblastos (OLC) se diferenciaron a partir de células madre mesenquimales de la pulpa dental utilizando 10 ng/mL de TGF- β (Abcam, Cambridge, MA, USA) durante tres semanas, siguiendo el protocolo ya establecido (17). Además, se cosecharon fibroblastos gingivales humanos (HGF) a partir de biopsias gingivales tomadas de cirugía periodontal. Se disociaron pequeños fragmentos de tejido con una mezcla de colagenasa (100 U/mL) y dispasa (1 mg/mL) durante una hora, luego se lavaron con medio fresco y se centrifugaron. El sedimento celular se sembró en frascos de cultivo de 25 cm² durante siete días y se mantuvo a 37 °C en incubadora

con un 5% de CO₂. En ambos casos, las células se cultivaron en DMEM (Hyclone, Thermo Scientific, Bremen, Alemania) complementado con un 10% de FBS (Gibco; Thermo Fisher Scientific) y antibiótico (100 U/mL de penicilina + 100 µg/mL de estreptomina) hasta alcanzar un 70% de confluencia para distribuir las células en placas oscuras de 384 pozos tras un tratamiento con tripsina al 0,25% para recolectar las células. Además, las placas de 24 pozos sembradas con OLC fueron tratadas durante 24 horas con 2 µg/mL de LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) o 40 µg/mL de Poly-I:C (InvivoGen, San Diego, CA) para simular las condiciones inflamatorias de infección bacteriana y viral, respectivamente. El proyecto recibió el aval del Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Colombia (B.CIEFO-008-2021).

Transcripción de CB1 y CB2 por RT-qPCR multiplex en OLC y HGF

Se utilizó una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RT-qPCR) de un solo paso utilizando sondas de hidrólisis Taqman® Multiplex Real-Time (Thermo Fisher Scientific) para determinar la transcripción de CB1 y CB2 utilizando el sistema de detección del termociclador en tiempo real CFX96 (BioRad; Hercules, CA, USA). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes 10 min de retrotranscripción a 55°C, desnaturalización durante 1 min a 95°C, 40 ciclos de amplificación con una temperatura de alineación de 58°C, utilizando los siguientes primers y sondas (MacroGen®) CB1: Forward 5'-GGTTAGCAAGATACTCAAGCATGA-3' reverse 3'-CTGGAAAAGGCCCAACAAG-5', Sonda: 6FAM-5'-CAGCTGCTGCTTTCTTCTTACACCCCGGTCTC-3'-TAMRA; CB2: Forward 5'-GACACGGACCCCTTTTCTTGCT-3' Reverse 3'-CCTCGTGCCCTATCC-5', Sonda: ROX-5'-TGGCCTTGCCACCTGCACACAG-3'-TAMRA y se utilizó β-actina como gen de referencia: Forward 5'-GGATGCAAGGAGATCACTG-3' Reverse 5'-CGATCCACGGAGTACTTG-3', HEX: 5'-CCCTGGCACCCAGCACAATG-3'.

Transcripción de CB1 y CB2 durante los estímulos inflamatorios en OLC

La RT-qPCR para evaluar la expresión de los genes CB1 y CB2 de los odontoblastos estimulados por LPS y Poly-I:C se realizó utilizando SYBR Green (Luna® Universal One RT-qPCR Kit, New England BioLabs; USA). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes 10 min de retrotranscripción a 55°C, desnaturalización durante 1 min a 95°C, 40 ciclos de amplificación con una temperatura de alineación de 58 °C utilizando los siguientes primers (MacroGen®) CB1: forward 5'-GGTTAGCAAGATACTCAAGCATGA-3' reverse 5'-CTGGAAAAGGCCCAACAAG-3', CB2: Forward 5'-GACACGGACCCCTTTGCT-3' Reverse 5' CCTCGTGCCCTACCTATCC-3' y el gen de la subunidad beta 2 del receptor colinérgico (CHRN2) fue validado y utilizado como gen de referencia: forward 5'-CAATGCTGACGGCATGTACGA-3'; Reverse 5'-CACGAACGGAACCTTCATGGTG-3'. La eficiencia de la PCR se calculó con el

software LinRegPCR (Academic Medical Center, AMC, Amsterdam, Países Bajos), y la cuantificación relativa se realizó con el método Scheffé (18) utilizando células no estimuladas como control.

Detección de las proteínas CB1 y CB2 en OLC y HGF

Se realizó una técnica de inmunofluorescencia indirecta para la detección de las proteínas CB1 y CB2. Las células (5×10^4 células/pozo) se sembraron en cubreobjetos de vidrio tratados con poli-L-lisina durante 24 horas, luego algunas células se trataron durante 24 horas con $2 \mu\text{g/mL}$ de LPS o $40 \mu\text{g/mL}$ de Poly-I:C, las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4%, y se permeabilizaron con Tritón X-100, para posteriormente bloquearse con suero de cabra al 10%. Las células se incubaron a 37°C con anticuerpos primarios policlonales anti-CB1 y anti-CB2 producidos en ratón (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), diluidos 1:100 en solución de bloqueo. A continuación, las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con Alexa 594 (Thermo Fisher Scientific) diluido 1:100 en PBS a temperatura ambiente. Los núcleos se contracoloraron con DAPI y los portaobjetos se montaron con Prolong®, para su observación en el microscopio Zeiss Axio Imager A2 (Göttingen, Alemania) con el software AxioVision. La presencia o ausencia de la proteína en las células y su localización se evaluaron en tres experimentos independientes ($n = 3$).

Agonistas, antagonistas y medición del Ca^{2+} intracelular

La actividad CB1 y CB2 in vitro en OLC y HGF se determinó calculando los cambios en las concentraciones de calcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) tras diferentes estímulos. En primer lugar, se cargaron las células con $2 \mu\text{M}$ de solución de Fluo-4 AM (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific) a 37°C durante 45 min en la oscuridad. A continuación, se utilizó cannabidiol $10 \mu\text{M}$ (CBD) para la estimulación de las células durante 1 y 10 min, ya sea solo o con un pretratamiento de 5 minutos con diferentes concentraciones de antagonistas (combinaciones de antagonistas: agonistas, $10 \mu\text{M}:10 \mu\text{M}$; $10 \mu\text{M}:1 \text{nM}$; $1 \text{nM}:10 \mu\text{M}$), según un experimento de viabilidad previo. Se utilizó un antagonista selectivo de CB1 (AM251, Tocris, Bristol, Reino Unido), un antagonista selectivo de CB2 (AM630, Tocris, Bristol, Reino Unido) y un antagonista de TRPV1 (Capsazepine, CZP (Tocris, Bristol, Reino Unido)). La solución stock a una concentración de 10mM se preparó en DMSO, las diluciones seriadas utilizadas se prepararon en medio de cultivo. La ionomicina es un activador excelente de canales de calcio, por lo que se utilizó como control positivo. La cuantificación de la fluorescencia de las células se realizó a una longitud de onda de $494/525 \text{ nm}$ (excitación/emisión) en un espectrofluorímetro (ClarioSTAR, BMG Labtech). Para el análisis de los resultados, los datos se normalizaron con respecto a las células no estimuladas (F/F_0) y se graficaron en cada tiempo de evaluación (1 y 10 min).

Análisis de los datos

Los datos se organizaron en hojas de cálculo en el programa Excel (Microsoft Office 2010) y se describieron como media y desviación estándar (SD) y las figuras se elaboraron utilizando el software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Se utilizó un análisis de varianza ANOVA de una vía para determinar el valor P utilizando un valor alfa <0,05.

Resultados

Los odontoblastos y los fibroblastos gingivales expresan CB1 y CB2, y están sobre-expresados en entorno inflamatorio

Tanto los OLC como los HGF expresan mensajeros de CB1 y CB2; los valores medios de Cq para el OLC fueron de 31,62 y 32,02 (CB1 y CB2), mientras que fueron de 29,87 y 31,62 para el HGF, mostrando un patrón similar de transcripción de los receptores. Los odontoblastos estimulados con LPS y Poly-I:C mostraron aumentos en la transcripción de los receptores cannabinoideos. La estimulación con LPS indujo un aumento de cinco veces en los niveles de expresión de CB1, mientras que CB2 aumentó más de diez veces con respecto a las células no estimuladas. El estímulo con Poly-I:C causó un aumento significativo de 4 y 8 veces en la transcripción de CB1 y CB2, respectivamente en OLC. La sobreexpresión de CB2 fue significativamente mayor que la de CB1 tanto en condiciones de LPS como de Poly-I:C.

Los odontoblastos y los fibroblastos gingivales expresan proteínas CB1 y CB2

Además, mediante inmunofluorescencia, se identificaron las proteínas CB1 y CB2 en OLC y HGF. SH-SY5Y y en células de macrófagos derivados de monocitos como controles positivos, respectivamente. Ambos receptores se expresaron en la membrana celular, el núcleo y el citoplasma.

El CBD aumenta las concentraciones de calcio intracelular en los odontoblastos y los fibroblastos gingivales

La estimulación de odontoblastos y fibroblastos gingivales con 10 μ M del agonista cannabidiol genera un aumento de las concentraciones de calcio intracelular en comparación con las células no estimuladas ($P < 0.001$). El pretratamiento con AM251, AM630 y CZP, antagonistas de CB1, CB2 y TRPV1 respectivamente, inhibe la afluencia de calcio en ambos tipos celulares, lo que demuestra la existencia de receptores funcionales en dichas células.

Discusión

Este estudio demostró la expresión de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 en odontoblastos y fibroblastos gingivales humanos. Se observó el aumento de su expresión ante los desafíos inmunológicos. Además, su funcionalidad se evidencia con base en los cambios observados en la afluencia de calcio cuando CB1, CB2 y TRPV1 se unen a diferentes ligandos.

La expresión y la función de ambos receptores en los tejidos dentales ya se han descrito anteriormente. Por ejemplo, CB1 se encontró en las terminaciones nerviosas de la pulpa dental humana (19). Además, pruebas por inmunohistoquímica también reportan de la presencia de receptores CB1 en odontoblastos de ratón (20). Por otra parte, se ha informado de la expresión de CB1 y CB2 en las células madre del ligamento periodontal, donde están implicadas en la diferenciación hacia el fenotipo osteogénico y dentinogénico a través de la señalización p38, MAPK y JNK en un entorno inflamatorio (14,21). La gran importancia en la reparación de tejidos de los receptores cannabinoides se pone de manifiesto mientras contribuyen a regular el volumen y el metabolismo óseo, la pérdida de hueso y la función de las células óseas en modelos murinos (15).

Se ha comprobado que los CB1 y CB2 se expresan en el tejido periodontal de ratón y en los fibroblastos periodontales humanos, la activación de estos receptores induce su adhesión y migración a través de la activación de la quinasa de adhesión focal y de la actividad MAPK (21), lo que demuestra que participan en la regulación de varias vías de señalización y expresión génica. En este caso, bajo condiciones inflamatorias, utilizando LPS y Poly-I:C como sustitutos de desafío bacteriano o viral, se encontró una sobre expresión de los transcritos CB1 y CB2. Se observó una mayor reactividad de los receptores CB en las células tratadas con LPS y Poly I:C en comparación con las OLC y HFG no tratadas, lo que podría interpretarse como un aumento de la cantidad de ambos receptores cannabinoides en condiciones inflamatorias. Investigaciones anteriores informan que el CB2 se expresa en condiciones normales, pero es excepcionalmente alto en la inflamación patológica (9). Maresz et al. (2005) demostraron en células microgliales que un entorno inflamatorio induce la activación

celular y la sobreexpresión de CB2, dependiente de los estímulos de citoquinas IFN- γ y GM-CSF (22).

Aunque las células del ligamento periodontal suelen expresar ambos receptores cannabinoides, el CB1 tiene una mayor expresión en el tejido sano, aunque se regula a la baja durante la infección bacteriana, mientras que el CB2 es inducido a la sobreexpresión. Por el contrario, en ese estudio, la inflamación estéril provocó un aumento significativo de CB1 y CB2 (13). Se descubrió que el tratamiento con agonistas y antagonistas del CB2 regula la respuesta inflamatoria en los fibroblastos del ligamento periodontal. Los ligandos agonistas de CB2 atenuaron la fosforilación de p38 y NF κ B y simultáneamente provocaron la fosforilación de p-ERK y p-CREB, afectando la concentración de AMPc y a las vías de β -arrestina (15,23). Nakajima et al (2006) informaron que CB1 y CB2 están sobre expresados en muestras de HGF de gingivitis y periodontitis. La estimulación del HGF con anandamida reduce la secreción de citoquinas inducida por LPS, y el bloqueo de los receptores CB1 o CB2 con antagonistas específicos atenuó ese efecto, confirmando la implicación de los receptores cannabinoides en el efecto antiinflamatorio del endocannabinoide anandamida (24).

Por otro lado, encontramos que el CBD genera un aumento de la concentración de calcio intracelular. Además, existen pruebas que los odontoblastos humanos expresan CB1 funcional, ya que responden tras la estimulación con diferentes agonistas y antagonistas (12), en este trabajo se encontró que para CB2 también ocurrió.

El CBD es el principal componente no psicoactivo del cannabis y se ha informado que posee efectos sedantes, antiinflamatorios y antipsicóticos (25), aunque varios de estos efectos parecen estar mediados por mecanismos independientes de los receptores cannabinoides. Reportes anteriores demuestran que el CBD inhibe varios receptores, como el TRPV1, el GPR55, el NMDAR, los receptores opioides, los receptores de adenosina A1 y los canales de calcio dependientes de voltaje; y, curiosamente, también activa el PPAR- γ , el 5HT1A y el receptor de glicina (26, 27).

Así, la acción del CBD a través de estas vías puede ser responsable de la supresión de la excitabilidad neuronal y de la percepción del dolor. Sin embargo, también hay pruebas de que el CBD inhibe la captación de dopamina, noradrenalina, GABA, serotonina y anandamida en las sinapsis (28), lo que explicaría sus efectos antinociceptivos y neuroprotectores. Además, el efecto antiinflamatorio también se explica por la inhibición de la COX-2, que impide la producción de metabolitos del ácido araquidónico (29). Aun así, en este trabajo se comprobó que cuando se estimulaban las células con CBD y antagonistas CB1 y CB2, se reducían las concentraciones de calcio intracelular, lo que demuestra que el CBD puede estar actuando directa o indirectamente a través de los receptores cannabinoides. Por otro lado, los antagonistas selectivos utilizados (AM251 y AM630) son también agonistas

inversos, lo que significa que tienen una eficacia negativa para una determinada vía de señalización, que acaba bloqueando los canales de calcio, de manera que al estimular con CBD no se generan influjos de calcio a través de CB1 y CB2

El crosstalk es un mecanismo de interacción entre diferentes sustancias intracelulares o vías de transducción de señales (12). Informes anteriores han demostrado que existe un acoplamiento entre los receptores cannabinoides y el TRPV1. Por ejemplo, en odontoblastos un estímulo que induce un aumento del calcio intracelular, es seguido de la extrusión de iones a través de los canales del intercambiador sodio-calcio hacia el frente de mineralización (30), lo que explica el papel de los receptores cannabinoides y del TRPV1 en la aposición del calcio en la dentina terciaria y la transducción de los estímulos externos.

El CBD es un agonista del TRPV1 y un modulador alostérico negativo de los receptores cannabinoides (31), por lo que la explicación de la disminución del calcio intracelular cuando se aplican antagonistas del CB1 y del CB2 puede deberse al crosstalk entre ambos tipos de receptores. Esta comunicación entre los dos receptores o sus vías de señalización hace que se mantenga un equilibrio fisiológico en condiciones patológicas. Por ejemplo, trabajos anteriores demostraron que los receptores cannabinoides median efectos antiinflamatorios y protectores en los tejidos periodontales, mientras que el TRPV1 media efectos proinflamatorios, que pueden estar asociados a la lesión periodontal (15). Deberán realizarse más estudios en odontoblastos y fibroblastos gingivales para dilucidar las vías de señalización que pueden ser activadas por el CBD y el mecanismo por el que se genera crosstalk con el TRPV1, de modo que el CBD pueda ser considerado como un posible tratamiento para patologías infecciosas o inflamatorias en la cavidad oral.

Conclusiones

Este trabajo demostró que los odontoblastos humanos y los fibroblastos gingivales primarios expresan receptores cannabinoides CB1 y CB2 funcionales y también que, en condiciones inflamatorias, ambos receptores se sobre-expresan, especialmente el CB2. Por otro lado, se demostró que el CBD genera influjos de calcio, demostrando que son receptores con actividad biológica y que tienen una comunicación funcional con el TRPV1. Estos resultados muestran la importancia de la expresión de estos receptores en los procesos fisiológicos y patológicos en la pulpa dental y los tejidos periodontales, demostrando su expresión funcional en estas células; abriendo nuevas perspectivas para buscar alternativas para tratamientos más efectivos contra el dolor y la inflamación dental.

Agradecimientos

A la doctora Myriam L. Velandia-Romero (Universidad El Bosque, Bogotá) por su amable colaboración con los experimentos de cultivo celular. También agradecemos a Adriana Ríos de Biominerales Pharma por su útil contribución.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses en relación con la investigación, la autoría y/o la publicación de este artículo.

Financiación

El proyecto fue parcialmente financiado por Biominerales Pharma, Bogotá Colombia

Referencias

1. García-Andreu J. Manejo básico del dolor agudo y crónico. *Anest Méx* 2017;29:77-85.
2. Julius D, Allan I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 2001;413:203-210.
3. Solé-Magdalena A, Revuelta EG, Menéñez-Díaz I, Calavia MG, et al. Human odontoblasts express transient receptor protein and acid-sensing ion channel mechanosensor proteins. *Microsc Res Tech* 2011;74(5):457-63.
4. Smith PC, Martínez C, Martínez J, McCulloch CA. Role of Fibroblast Populations in Periodontal Wound Healing and Tissue Remodeling. *Front Physiol* 2019;10:270.
5. Haspula D, Clark MA. Cannabinoid Receptors: An Update on Cell Signaling, Pathophysiological Roles and Therapeutic Opportunities in Neurological, Cardiovascular, and Inflammatory Diseases. *Int J Mol Sci* 2020;21(20):7693.
6. Ye L, Cao Z, Wang W, Zhou N. New Insights in Cannabinoid Receptor Structure and Signaling. *Curr Mol Pharmacol* 2019;12(3):239-248.
7. Smith JS, Lefkowitz RJ, Rajagopal S. Biased signaling: from simple switches to allosteric microprocessors. *Nat Rev Drug Discov* 2018;17(4):243-260. 8.
8. Navarro G, Reyes-Resina I, Rivas-Santisteban R, Sánchez de Medina V, et al. Cannabidiol skews biased agonism at cannabinoid CB1 and CB2 receptors with smaller effect in CB1-CB2 heteroreceptor complexes. *Biochem Pharmacol* 2018;157:148-158.
9. Starowicz K FD. Cannabinoids and Pain: Sites and Mechanisms of Action. *Adv Pharmacol* 2017;80:437-475
10. Philpott HT, O'Brien M, McDougall JJ. Attenuation of early phase inflammation by cannabidiol prevents pain and nerve damage in rat osteoarthritis. *Pain* 2017;158(12):2442-2451.

11. Miller LK, Devi LA. The highs and lows of cannabinoid receptor expression in disease: mechanisms and their therapeutic implications. *Pharmacol Rev* 2011;63(3):461-70.
12. Que K, He D, Jin Y, Wu L, et al. Expression of Cannabinoid Type 1 Receptors in Human Odontoblast Cells. *J Endod*. 2017 Feb;43(2):283-288.
13. Konermann A, Jäger A, Held SAE, Brossart P, et al. In vivo and In vitro Identification of Endocannabinoid Signaling in Periodontal Tissues and Their Potential Role in Local Pathophysiology. *Cell Mol Neurobiol* 2017;37(8):1511-1520.
14. Qian H, Zhao Y, Peng Y, Han C, et al. Activation of cannabinoid receptor CB2 regulates osteogenic and osteoclastogenic gene expression in human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res* 2010; 45(4):504-11.
15. Ossola CA, Surkin PN, Mohn CE, Elverdin JC, et al. Anti-Inflammatory and Osteoprotective Effects of Cannabinoid-2 Receptor Agonist HU-308 in a Rat Model of Lipopolysaccharide-Induced Periodontitis. *J Periodontol* 2016;87(6):725-34.
16. Picciolo G, Pallio G, Altavilla D, Vaccaro M, et al. β -Caryophyllene Reduces the Inflammatory Phenotype of Periodontal Cells by Targeting CB2 Receptors. *Biomedicines* 2020;8(6):164.
17. Baldion PA, Velandia-Romero M, Castellanos JE. Odontoblast-Like Cells Differentiated from Dental Pulp Stem Cells Retain Their Phenotype after Subcultivation. *Int J Cell Biol* 2018.
18. Scheffe JH, Lehmann KE, Buschmann IR, Unger T, et al. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel gene expression's CT difference formula. *J Mol Med* 2006;84(11):901-910.
19. Beneng K, Renton T, Yilmaz Z, Yiangou Y, et al. Cannabinoid receptor CB1-immunoreactive nerve fibres in painful and non-painful human tooth pulp. *J Clin Neurosci* 2010;17(11):1476–1479.
20. Somsak M, Sopee P, Pornpoj F. Cannabinoid receptor 1 (CB1R) expression in rat dental pulp. *Oral Sci Int* 2012;9(1):17-20.
21. Yan W, Cao Y, Yang H, Han N, et al. CB1 enhanced the osteo/dentinogenic differentiation ability of periodontal ligament stem cells via p38 MAPK and JNK in an inflammatory environment. *Cell Prolif* 2019;52(6).
22. Maresz K, Carrier EJ, Ponomarev ED, Hillard CJ, et al. Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. *J Neurochem* 2005;95(2):437-445.
23. Abidi AH, Alghamdi SS, Dabbous MK, Tipton DA, et al. Cannabinoid type-2 receptor agonist, inverse agonist, and anandamide regulation of inflammatory responses in IL-1 β stimulated primary human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Res* 2020;55(5):762-783.
24. Nakajima Y, Furuichi Y, Biswas KK, Hashiguchi T, et al. Endocannabinoid, anandamide in gingival tissue regulates the periodontal inflammation through NF-kappaB pathway inhibition. *FEBS Lett* 2006;580(2):613-9.

25. Ibeas C, Chen T, Nunn VM, Bazelot, et al. Molecular targets of Cannabidiol in neurological disorders, *Neurotherapeutics*. *NeuroTherapeutics* 2015;12:699–730.
26. Seeman P. Cannabidiol is a partial agonist at dopamine D2High receptors, predicting its antipsychotic clinical dose. *Transl Psychiatry* 2016;6:920.
27. Gomes FV, Resstel LB, Guimaraes FS. The anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the bed nucleus of the stria terminalis are mediated by 5-HT1A receptors. *Psychopharmacology* 2011;213:465–473.
28. De Petrocellis L, Ligresti A, Moriello AS, Allara M, et al. Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *Pharmacol* 2011;163:1479–1494.
29. Ruhaak LR, Felth J, Karlsson PC, Rafter JJ. Evaluation of the cyclooxygenase inhibiting effects of six major cannabinoids isolated from *Cannabis sativa*. *Biol Pharm Bull* 2011;34(5):774-8.
30. Tsumura M, Sobhan U, Muramatsu T, Sato M, et al. TRPV1-mediated calcium signal couples with cannabinoid receptors and sodium-calcium exchangers in rat odontoblasts. *Cell Calcium* 2012; (52): 124–136.
31. de Almeida DL, Devi LA. Diversity of molecular targets and signaling pathways for CBD. *Pharmacol Res Perspect* 2020;8(6).

CAPÍTULO 4

Evaluación de la presencia y actividad de receptores cannabinoides en pulpa dental y odontoblastos humanos

Resumen

Introducción: Los odontoblastos tienen un rol importante en varios procesos fisiológicos en los tejidos dentales. Además, se sabe que los receptores cannabinoides CB1 y CB2 tienen efecto analgésico actuando sobre los canales de calcio e inhibiendo la producción de neurotransmisores. En ese sentido, conocer las características de su expresión abre la posibilidad de usar estos receptores como blancos terapéuticos en el tratamiento del dolor dental. **Objetivo:** Evaluar la expresión y actividad de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 en pulpa dental y odontoblastos humanos. **Metodología:** Odontoblastos humanos sin estimular y en contexto inflamatorio y pulpas dentales sanas e inflamadas fueron procesados para la cuantificación de transcritos y detección de proteínas de los receptores cannabinoides por medio de RT qPCR e inmunofluorescencia. La actividad *in vitro* de CB1 y CB2 se determinó midiendo las concentraciones de calcio intracelular con Fluo-4 AM, se trataron los cultivos con agonistas y antagonistas de ambos receptores. **Resultados:** Se encontró presencia de los transcritos para CB1 y CB2 en odontoblastos y pulpa dental, en condiciones de inflamación ambos receptores se sobre-expresaron. Los agonistas causaron disminución de los valores $[Ca^{2+}]_i$. **Conclusión:** En pulpa dental y en odontoblastos humanos se expresan receptores cannabinoides CB1 y CB2 funcionales.

Palabras clave: Receptor cannabinoide tipo 1 (CB1), receptor cannabinoide tipo 2 (CB2), dolor dental, odontoblastos, pulpa dental.

Keywords: Cannabinoid receptor type 1 (CB1), cannabinoid receptor type 2 (CB2), dental pain, odontoblasts, dental pulp.

Introducción

El problema de salud más prevalente a nivel mundial es la caries no tratada en dientes permanentes, afectando a 2,4 billones de personas (1). En Colombia, en el VIII Estudio Nacional del dolor se describió que el 76% de los encuestados reportaron haber tenido presencia de dolor (agudo o crónico) y cerca del 23% refieren que es dolor dental (2). La sensibilidad dentinal y la pulpitis son su principal causa. El trauma, la caries o estímulos mecánicos, químicos, térmicos y eléctricos, generan irritación pulpar e inflamación, produciendo una condición de dolor extremo (3), lo que hace que sea el principal motivo de consulta al odontólogo y una preocupación en salud pública, pues afecta la calidad de vida de las personas.

Estudios recientes afirman que en la actualidad el tratamiento para el dolor dental sigue siendo el acetaminofén, los AINES y opioides (4). Debido a que la fisiopatología del dolor pulpar es compleja (5,6), no existe un tratamiento que sea efectivo en todas las condiciones, por esta razón es necesario seguir explorando nuevas alternativas para solucionar este problema.

Los odontoblastos resultan fundamentales en los procesos de mecano- y termo-sensibilidad dental (7). Se desconoce el mecanismo exacto involucrado en estas respuestas, sin embargo, se ha descrito la posible participación de algunos receptores, incluidos receptores cannabinoides (8). Los odontoblastos son células post-mitóticas, altamente diferenciadas exclusivas del tejido dental que hacen parte del tejido de la pulpa dental donde se encuentran también fibroblastos, vasos sanguíneos, terminaciones nerviosas, y células del sistema inmune, entre otros (9). Los odontoblastos participan en la síntesis de matriz extracelular que resulta fundamental en el proceso de reparación dentinal en caries, pero más recientemente, se ha descrito su papel en procesos de transmisión de estímulos sensoriales en el complejo dentino-pulpar en respuesta a diversos estímulos del medio, incluyendo agentes patógenos (10). Algunas teorías donde se incluye la “teoría hidrodinámica del odontoblasto como receptor”, propone la participación de esta célula en la generación del proceso de dolor dental (10). Sin embargo, muchos eventos de la fisiopatología del dolor pulpar son desconocidos. Se han descrito dos receptores de cannabinoides (CB1 y CB2) que son blanco de múltiples agonistas y antagonistas endógenos y algunos exógenos como por ejemplo el Δ -9-Tetrahidrocannabinol (THC) y el cannabidiol (CBD), obtenidos del cannabis (11). De manera similar, la activación de algunos de los canales TRP (principales canales asociados a dolor dental) por cannabinoides ha sido previamente descrita, incluidos TRPV1-3, TRPA1, TRPM8, entre otros (12). De manera relevante, el posible efecto sinérgico generado entre un agonista para CB2 y un antagonista para TRPV1 en el manejo de cuadros dolorosos ha sido descrito (13). Resultados similares han mostrado el acoplamiento de receptores CB1 y TRPV1 en cultivos de odontoblastos de rata determinado por medio del influjo de calcio, mostrando así un importante rol en el proceso de transducción de estímulos externos en los odontoblastos (8). Estos elementos nos llevan a plantear la necesidad de nuevos estudios que muestren la posible participación y activación de receptores cannabinoides en odontoblastos humanos.

Este trabajo se propuso determinar la presencia de CB1 y CB2 en un cultivo de células similares a odontoblastos humanos y en cortes histológicos dentales, así como evaluar su actividad *in vitro*, como parte de un abordaje previo que se requiere para establecer de mejor manera su participación y activación en el proceso de comunicación celular. Es probable que la administración de un agonista o antagonista de los receptores CB1 y CB2 genere modulación del dolor dental lo que permitiría la apertura de caminos para la exploración de moléculas que ayuden al control del dolor en odontología, como ha sido reportado para muchas otras condiciones asociadas con dolor agudo y crónico (14,15).

La importancia de evaluar la presencia y actividad de estos receptores radica en que no ha sido descrita en pulpa dental humana sana y en condiciones de inflamación, lo que es transcendental para encontrar y entender las vías moleculares subyacentes y de esta manera dejar la base para futuras investigaciones que permitan aportar a la resolución de los problemas del dolor dental y la sensibilidad dentinal. En este caso, se usaron un modelo celular de odontoblastos y además cortes histológicos para complementar los hallazgos.

Metodología

Cultivo celular y cortes histológicos

Células odontoblásticas humanas fueron diferenciadas a partir de células madre mesenquimales de pulpa dental de terceros molares sanos, usando medio de diferenciación y TGF-beta como fue descrito anteriormente (9). Se sembraron 150.000 células en placas de 6 pozos con Dulbecco's Modified Eagle Culture Medium (DMEM) (Hyclone, Thermo Scientific, Bremen, Germany) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco; Thermo Fisher Scientific), antibiótico 1% (100 U/mL penicilina + 100 µg/mL estreptomina) y 10 ng/mL de TGF-β1 (Abcam, Cambridge, MA, USA) e incubados por 24 horas a 37°C, con una atmósfera humidificada con 5% de CO₂, hasta alcanzar una confluencia del 70%.

El cultivo celular de odontoblastos en condiciones de inflamación se implementó estimulando los cultivos con 2 µg/mL de LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) o con 40 µg/mL de Poly IC (InvivoGen, St. Diego, CA) por 24 horas, para simular infección bacteriana y viral respectivamente, células sin estimular fueron utilizadas como control.

Las pulpas dentales sanas e inflamadas utilizadas para cuantificación de transcritos fueron recolectadas de dientes sanos de pacientes con exodoncias indicadas o con diagnóstico de pulpitis irreversible, previa firma del consentimiento informado (Anexo 2) y fueron puestas en RNA-Later y congeladas a -80°C, posteriormente fueron tratadas con 20 mg/µL de proteinasa K a 65°C por 12 horas.

La extracción de RNA de células y pulpas dentales se realizó con Trizol (Ambion).

Para los ensayos de la evaluación de la actividad de los receptores se sembraron odontoblastos en placas negras de 384 pozos, se estimularon y mantuvieron en las mismas condiciones de simulación inflamatoria por 24 Horas.

Por otra parte, para las inmunofluorescencias, se realizaron cortes histológicos de pulpas de dientes sanos extraídos por motivos ortodónticos y de pulpas inflamadas de pulpotomías de pacientes con diagnóstico de pulpitis irreversible, recolectadas en PFA al 4%.

Cuantificación de transcritos

La técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción en un solo paso en tiempo real (RT-qPCR) usando sondas de hidrólisis Taqman® Multiplex Real-Time solution (Thermo Fisher Scientific) fue utilizada para determinar la expresión de CB1 y CB2. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: retrotranscripción por 10 min a 55°C, denaturación por 1 min a 95°C, 40 ciclos de amplificación con una temperatura de hibridización de 58°C, usando los siguientes primers y sondas (Macrogen®)

CB1: Forward 5'-GGTTAGCAAGATACTCAAGCATGA-3'
Reverse 3'-CTGGAAAAGGCCCAACAAG-5', Sonda: 6FAM-5'-CAGCTGCTTTCTTCTTACACCCCGGTCTC-3' -TAMRA;

CB2: Forward 5'-GACACGGACCCCTTTTGGCT-3' Reverse 3'-CCTCGTGGCCCTACCTATCC-5', Sonda: ROX-5'-TGGCCTTGCCACCTGCACACAG-3'-TAMRA , como genes de referencia se usaron CHRN2 : Forward 5'-CAATGCTGACGGCATGTACGA-3' Reverse 3'-CACGAACGGAAGTTCATGGTG-5'. sonda: HEX-5'-GCTGCCGCCTGCCATCTACAA-3'-TAMRA y GAPDH: Forward 5'-CACTAGGCGCTCACTGTTCTC-3' Reverse 3'-AAATCCGTTGACTCCGACCT-5'. sonda: CY5-5'-CGAGCCACATCGCTCAGACA-3'-TAMRA

La eficiencia de la PCR se calculó usando LinRegPCR (Academic Medical Center, AMC, Amsterdam, Netherlands), y la cuantificación relativa se llevó a cabo utilizando el método de Scheffé (16) utilizando como muestra control las células sin estimular, según los protocolos descritos en el Capítulo 3 de este documento

Detección y cuantificación de receptores cannabinoides

Con el empleo de los cortes obtenidos de las pulpas sanas e inflamadas, se realizó una técnica de inmunohistoquímica para la detección de las proteínas CB1 y CB2 siguiendo el protocolo reportado (17).

Los cortes histológicos se desparafinaron con xilol por 20 min y luego se rehidrataron los tejidos con concentraciones ascendentes de etanol. Se permeabilizó con Tritón X-100 al 0.1% por 20 min, para el posterior bloqueo con suero de cabra al 10%. Se incubaron las muestras con anticuerpos primarios policlonales anti-CB1 y anti-CB2 producidos en ratón (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), diluidos 1:100 en solución de bloqueo. A continuación, las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con Alexa 594 (Thermo Fisher Scientific) diluido 1:200 en solución de bloqueo a temperatura ambiente. Los núcleos se contracoloraron con DAPI y se realizó el montaje con Prolong®, para su observación en el microscopio Zeiss Axio Imager A2 (Göttingen, Alemania) con el software AxioVision. La presencia o ausencia de la proteína en las células de las pulpas dentales y su localización se evaluaron en cuatro experimentos independientes (n = 4) de cada condición.

Adicionalmente se realizó la cuantificación de CB1 y CB2 por inmunofluorometría en el cultivo de odontoblastos estimulados con LPS y Poly-I:C. Las células sembradas en placa oscura de 384 pozos fueron fijadas con PFA al 4%. Posteriormente se realizó la permeabilización con Tritón X-100 al 0.1% por 20 min, luego se bloqueó con suero de cabra al 10%. Se incubaron las muestras independientes con anticuerpos primarios policlonales anti-CB1 y anti-CB2 producidos en ratón (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), diluidos 1:100 en solución de bloqueo. A continuación, las células se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con FITC (Thermo Fisher Scientific) diluido 1:200 en solución de bloqueo a temperatura ambiente. La cuantificación de la fluorescencia de las células se realizó en el espectrofluorímetro (ClarioSTAR, BMG Labtech). En cada pozo se realizó la cuantificación de proteínas totales con ácido bicinonínico, este dato se usó para normalizar las unidades de fluorescencia de cada pozo.

Evaluación de la actividad de cannabinoides sobre los receptores

El perfil farmacológico de los receptores cannabinoides se evaluó con el indicador Fluo-4 AM. El experimento se realizó con el protocolo establecido (18). Los experimentos se hicieron en cultivo de odontoblastos humanos sin estimular y tratados 24 h con 2 µg/mL de LPS o 40 µg/mL de Poly-I:C, sembrados en microplacas de 384 pozos con una confluencia del 90%. Las células se incubaron con 40 µL de solución de carga Fluo-4 AM a una concentración de 2 µM (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific) a 37°C por 1 hora en oscuridad. Células estimuladas con ionomicina fueron utilizadas como control positivo. Unos pozos de cada condición se trataron con agonistas (ACEA y HU 308, Tocris, Bristol, Reino Unido) y otros con antagonistas (AM251 y AM630, Tocris, Bristol, Reino Unido) de CB1 y CB2 respectivamente. Adicionalmente se evaluó el bloqueo de señal de los agonistas previo tratamiento de los cultivos con antagonistas en diferentes combinaciones de concentraciones antagonista-agonista (100µM:100µM; 100µM:10pM; 10pM:10pM; 10pM:100µM). La cuantificación de la fluorescencia de las células se realizó a una longitud de onda de 494/525 nm (excitación/emisión) en un espectrofluorímetro (ClarioSTAR, BMG Labtech). Para el análisis de los resultados, los datos se normalizaron con respecto a las células no estimuladas (F/F0) y se graficaron en cada tiempo de evaluación (1 y 10 min). Puede considerarse que en un cultivo de odontoblastos responde al ligando si la señal normalizada resultante cambia luego de la adición de la respectiva molécula en comparación con la señal de los odontoblastos no estimulados.

Análisis de datos

Los datos se organizaron en hojas de cálculo en el programa Excel (Microsoft Office 2010) y se describieron como media y desviación estándar (DE), las figuras se elaboraron utilizando el software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.). Todos los experimentos se realizaron por triplicado en tres

experimentos independientes (n=9). Se utilizó un análisis de varianza ANOVA de una vía para determinar el valor P utilizando un valor alfa <0,05.

Resultados

Odontoblastos humanos en condiciones de inflamación sobre-expresan receptores cannabinoides

Los odontoblastos estimulados con LPS y Poly-I:C mostraron un aumento significativo de los transcritos de los receptores cannabinoides. La estimulación con LPS indujo un aumento de tres veces en los niveles de expresión del CB1, mientras que el CB2 aumentó 6 veces con respecto a las células no estimuladas. El estímulo con Poly-I:C causó un aumento significativo de 3 y 11 veces en la transcripción de CB1 y CB2, respectivamente. La sobreexpresión de CB2 fue significativamente mayor que la de CB1 tanto en condiciones de LPS como de Poly-I:C.

La inmunofluorometría permitió cuantificar ambos receptores, en las células no estimuladas se encontró una media de 14.7 FU/ μ g de proteína de CB1, no se observó diferencia estadísticamente significativa en los valores de proteína de CB1 en las células estimuladas en comparación con el control. Por otro lado, la media de unidades de fluorescencia para CB2 fue 4.7 FU/ μ g en células sin estimular; se observó un aumento significativo en las células estimuladas con LPS y Poly I:C, pues las medias fueron 7.9 FU/ μ g y 11 FU/ μ g respectivamente.

En pulpa dental humana se expresan receptores cannabinoides y se encuentran sobre-expresados en tejido inflamado

En las qPCR multiplex de pulpas dentales inflamadas se observa que CB1 y CB2 se sobre expresan en promedio 37 y 142 veces más que las pulpas sanas respectivamente; CB2 se expresa significativamente más que en CB1 en las pulpas inflamadas.

En las inmunofluorescencias se observa la presencia de ambos receptores cannabinoides con un patrón celular. En los cortes de pulpas inflamadas es evidente una mayor intensidad de la fluorescencia de CB1 y CB2 en la empalizada odontoblástica.

Los receptores cannabinoides CB1 y CB2 son regulados fisiológicamente en ambiente inflamatorio

La estimulación de los odontoblastos con el agonista de CB1 (ACEA) en células tratadas con LPS y Poly I:C genera un bloqueo en los influxos de calcio a los 10 min respecto a las células sin ambiente inflamatorio, mientras que en las células tratadas con el agonista de CB2 el mismo efecto se logra en 1 min. En las células sin

tratamiento en ambos casos se observa que las concentraciones de calcio intracelular aumentan hasta 10 veces más con respecto a las células sin estimular.

Un efecto contrario se observa en las células que se encuentran en contexto inflamatorio al ser estimuladas con el antagonista de CB2 (AM630), pues en todas las concentraciones aumentan significativamente las concentraciones de calcio intracelular respecto a las células sin tratar. En el caso de CB1 el efecto no es evidente, sólo se observa en las células estimuladas con LPS y tratadas con 10 pM de AM630 y en las células estimuladas con Poly I:C y tratadas con 100 µM.

En las células en las que se trataron con el respectivo antagonista (AM251 o AM630) antes de ser estimuladas con el agonista, se observa un menor bloqueo en los influjos, pues en ambos casos (CB1 y CB2) hay aumento en las concentraciones de calcio intracelular.

Discusión

Este estudio demostró la expresión de ambos receptores cannabinoides en cultivo de odontoblastos humanos. Un estudio previo realizado en un cultivo primario de odontoblastos de pulpa dental humana reportó la presencia de receptores CB1 funcionales (19), pero no se encontró evidencia de la expresión de CB2. En el capítulo 3 con Sybr green se había comprobado la sobreexpresión de ambos receptores en condiciones de inflamación. En este capítulo se corroboró en otro experimento independiente con PCR multiplex utilizando sondas de hidrolisis; se encontró que las células tratadas con estímulos inflamatorios (LPS y Poly I:C) cambian su patrón de expresión, aumentando en más del triple de transcritos de CB1, mientras que para CB2 se induce un aumento de hasta 11 veces más respecto a las células no estimuladas.

Previamente en el capítulo 3, por medio de inmunocitoquímica se había comprobado la presencia y ubicación de los receptores cannabinoides en los cultivos de odontoblastos en condiciones inflamatorias, donde se observa un evidente aumento en la fluorescencia de ambos receptores, en especial de CB2 en las células tratadas con Poly:C. En el presente trabajo se cuantificaron las proteínas de CB1 y CB2 en las mismas condiciones por medio de inmunofluorometría, y se encontró los estímulos inflamatorios indujeron un aumento significativo de la intensidad de la señal para CB2, pero no para CB1.

Varios trabajos han demostrado que ambos receptores se sobre-expresan en inflamación patológica en distintos tejidos, en especial CB2 (20). Estos antecedentes están acordes con los hallazgos de este estudio, pues se comprobó por primera vez que ambos receptores se sobre regulan en condiciones inflamatorias en cultivo de

odontoblastos humanos, debido a que se encontró un aumento tanto en los transcritos como en la cantidad de proteínas.

Adicionalmente, por primera vez se comprobó y comparó la expresión de CB1 y CB2 en pulpas sanas e inflamadas. Encontramos que la cantidad de transcritos de CB1 y CB2 en las pulpas inflamadas se incrementan entre 30 y 140 veces más con respecto a las pulpas sanas respectivamente, mostrando un efecto similar e incluso mayor que en el cultivo de odontoblastos. Esto sucede porque en la pulpa hay presencia de otros tipos celulares como terminaciones nerviosas, células endoteliales, fibroblastos que hacen que la respuesta sea sumatoria y más evidente. Aunque se observa una dispersión muy grande en los datos, es de esperarse, ya que las muestras son muy heterogéneas, y la condición inflamatoria en cada paciente puede ser distinta. En este caso vuelve a ser CB2 quien presenta una mayor cantidad de transcritos en condiciones de inflamación. Al igual que en las inmunofluorescencias e inmunofluorometrías de los cultivos celulares, las inmunohistoquímicas de pulpas inflamadas mostraron mayor intensidad de la fluorescencia que las pulpas sanas. Sorprendentemente la señal fluorescente para ambos receptores es mucho más fuerte en la zona que corresponde a la empalizada odontoblástica, poniendo en evidencia que los receptores cannabinoides de los odontoblastos son predominantes en el complejo dentino-pulpar y sugieren un papel preferente de estas células en la respuesta ante agresiones a la pulpa dental a través de las respuestas mediadas por ambos receptores cannabinoides.

Se conoce que en la microglía y los linfocitos T la expresión y activación de IFN y GM-CSF inducen la fosforilación de STAT6, factor clave en la transcripción de los receptores cannabinoides (21,22); además se sabe que los odontoblastos también expresan esas mismas citoquinas ante la agresión microbiana (23). La sobreexpresión de CB1 y CB2 en odontoblastos estimulados con LPS y Poly I:C se puede explicar porque estas células expresan receptores tipo Toll (TLRs) tipo 4 y 9 (24,25), los cuales son activados luego de los respectivos estímulos reclutando proteínas adaptadoras que contienen dominios TIR, como MyD88 y TRIF, que prenden cascadas de señalización que activan NF- κ B, IRFs o MAP quinasas regulando la expresión de citoquinas, quimioquinas e IFNs de tipo I que, en última instancia, favorecen la respuesta antiinflamatoria que favorece el control de la infección microbiana (26,27).

Los TLR desempeñan un papel crucial, pues permiten que se detecte señales de peligro para desencadenar respuestas inflamatorias. La activación de diferentes tipos de células a través de los TLR modifica la expresión de receptores cannabinoides y los niveles de cannabinoides endógenos, los cuales inhiben la producción de citoquinas proinflamatorias a través de estos receptores (28).

Los odontoblastos son células que se encuentran en la pulpa dental, se organizan en empalizada con sus prolongaciones proyectadas hacia la dentina dentro de los túbulos dentinales, es por esta razón que son las primeras células en responder a los

diferentes estímulos físicos, químicos y mecánicos a los que se enfrentan los dientes. Por estas razones, un cultivo de odontoblastos humanos diferenciados a partir de células madre de pulpa dental fue utilizado en este caso como modelo de estudio para evaluar la expresión y función de los receptores cannabinoides.

Estudios previos, han demostrado que estas células son capaces de generar potenciales de acción, pues expresan canales de sodio dependientes de voltaje confiriéndoles propiedades de excitabilidad (29). También se reportó que expresan canales mecanorreceptores como TRP (7), lo que sugiere que podrían funcionar como células mecanosensoriales. En odontoblastos, también se ha evidenciado la presencia y actividad de otros canales de sodio y calcio como ENaC, ASIC, PIEZO 2, Ca²⁺ tipo L (30); razón por la que se sugiere que estas células tienen un importante papel en la fisiopatología de nocicepción dental.

Varias teorías explican la estrecha relación que existe entre los odontoblastos y las terminaciones nerviosas de la pulpa. Se conoce que estas células producen y liberan mediadores como óxido nítrico, glutamato y en especial purinas y pirimidinas bioactivas las cuales median respuestas celulares a través de los respectivos receptores (31). Se ha encontrado que tanto los odontoblastos como las terminaciones nerviosas de la pulpa expresan receptores purinérgicos de la familia P2X y P2Y lo que sugiere que el ATP liberado por odontoblastos después de un estímulo podría regular la entrada de calcio a los odontoblastos y favorecer su despolarización (32-34).

Por otro lado, la pulpa dental es un tejido altamente innervado, especialmente por fibras A δ mielínicas (conducción rápida) y fibras C amielínicas con transmisión más lenta (35). La estimulación de estas fibras por estímulos nocivos genera inflamación neurogénica (36), debido a la liberación de ATP y neuropéptidos como sustancia P (SP), péptido relacionado con la calcitonina (CGRP), neuroquinina A (NKA), neuropéptido Y (NPY) entre otros, que producen aumento en la permeabilidad vascular, vasodilatación y migración leucocitaria, eventos inflamatorios que potencian las sensaciones de dolor (27). La SP tiene un papel importante en este fenómeno, pues se ha encontrado que en odontoblastos y en la pulpa dental inflamada se sobreexpresan los receptores para este neuropéptido (NK1) (37). Esto es relevante, pues se ha evidenciado que al estimular con agonistas a CB1, se reduce la liberación SP y la activación de los NK1 (38), lo que explica el efecto antiinflamatorio y antinociceptivo de agonistas cannabinoides aplicados localmente en pulpa dental. Observaciones recientes proporcionan nueva información sobre los mecanismos por los que la administración periférica de cannabinoides produce efectos antinociceptivos y antihiperalgésicos, por ejemplo, inhibiendo la actividad y sensibilización de TRPV1 mediada por una vía PKA (Proteína quinasa A) en neuronas aferentes primarias por medio de la activación del CB1 (39).

Existe evidencia de una comunicación entre terminaciones nerviosas y células inmunes a través de la producción de endocannabinoides, los cuales activan ambos receptores (40). Dado que en condiciones patológicas se aumenta la síntesis de endocannabinoides (41), se podría explicar la comunicación de los odontoblastos y las terminaciones nerviosas también por este mecanismo, ya que se comprobó en este trabajo que en odontoblastos y pulpa dental se expresan receptores cannabinoides y anteriormente también se había demostrado su presencia en las terminaciones nerviosas de pulpa dental humana (42).

En este trabajo también se evaluó el perfil farmacológico de los receptores cannabinoides con el indicador Fluo-4 AM el cual es una molécula que, al unirse al calcio fluoresce y permite determinar la cantidad del ión en el citoplasma celular. Este calcio se constituye en un importante segundo mensajero en las cascadas de señalización intracelular de los receptores CB1 y CB2 (8).

La estimulación con los agonistas de CB1 y CB2 (ACEA y HU 308 respectivamente) en las células estimuladas con LPS o Poly I:C (contexto inflamatorio) indujo una reducción de las concentraciones de calcio, como era de esperarse. Esto se explica porque la activación de los receptores induce el bloqueo de los canales de calcio (40). Por el contrario, y como se esperaba, los antagonistas de CB1 y CB2 (AM251 y AM630) aumentaron los influjos de calcio, siendo este efecto más evidente para CB2. Este hallazgo es consistente con el efecto de estos antagonistas que bloquean la señal de inhibición de los canales de calcio y además activan los TRPA1 haciendo que aumenten las concentraciones de calcio (43).

Cuando el receptor cannabinoide se activa por un agonista, como ACEA o HU 308, su respuesta está asociada a la activación de varias cascadas MAPK dependientes de $G\beta\gamma$, y la inhibición dependiente de $G\alpha_i/o$ de la actividad de la adenil ciclasa, que a su vez, da lugar a la inhibición de los canales de potasio de tipo A ($K^+ A$) y de los canales de Canales de Ca^{2+} (tipo L, N-, P-/Q- y dependientes de voltaje) y aumenta la apertura de canales de potasio de rectificación interna (K_{ir}) haciendo que los odontoblastos se hiperpolaricen (40). Por otra parte, se conoce que los complejos $G\beta\gamma$ se acoplan y activan los canales de K^+ , permitiendo la salida de este ion contribuyendo a la hiperpolarización.

Ha sido descrito que, ambos receptores cannabinoides pueden estar también acoplados a proteína G_s y así, al activarse, estimulan la adenil ciclasa que, a su vez, estimulará la formación de AMPc, el cual, como un segundo mensajero activa la proteína quinasa A (PKA), haciendo que se inhiban los canales de calcio (44), explicando de esta manera el efecto antinociceptivo de los agonistas cannabinoides en la pulpa dental.

Cuando se realizó bloqueo con los antagonistas y luego estimulación con agonistas, se observó una regulación fisiológica, pero no en la misma proporción que con las

moléculas administradas individualmente. Esto demuestra que los odontoblastos expresan receptores cannabinoides funcionales, adicionalmente se observó una modulación más evidente en las células en contexto inflamatorio, lo que es acorde con la sobreexpresión de los receptores en estas condiciones demostrada con las pruebas de RT-qPCR y las inmunofluorescencias tanto en odontoblastos como en la pulpa dental, mostrando que en los odontoblastos de la pulpa y en cultivo existe una regulación en la expresión de los receptores en condiciones de inflamación.

Conclusiones

Se demostró que los odontoblastos humanos en cultivo expresan receptores cannabinoides CB1 y CB2 funcionales y ambos receptores (especialmente CB2) se sobre-expresan en condiciones inflamatorias. Estos receptores también están presentes en el tejido de la pulpa dental humana. Por otro lado, se demostró que los agonistas y antagonistas específicos generaron regulación en los influjos de calcio, demostrando que son receptores con actividad biológica.

Estos resultados sugieren la importancia de la expresión de estos receptores en los procesos fisiológicos y patológicos en la pulpa dental; abriendo nuevas perspectivas para buscar alternativas para tratamientos más efectivos contra el dolor y la inflamación dental usando agonistas de CB1 y CB2.

Referencias

- (1) Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJL, Marcenes W. Global Burden of Untreated Caries. *Journal of Dental Research* 2015 May;94(5):650-658.
- (2) Lipton JA, Ship JA, Larach-Robinson D. Estimated prevalence and distribution of reported orofacial pain in the United States. *Am Dent Assoc* 1993;124(10):115-121.
- (3) Hossain MZ, Bakri MM, Yahya F, Ando H, Unno S, Kitagawa J. The role of transient receptor potential (TRP) channels in the transduction of dental pain. *International Journal of Molecular Sciences* 2019 Jan 27,;20(3):526.
- (4) Pergolizzi JV, Magnusson P, LeQuang JA, Gharibo C, Varrassi G. The pharmacological management of dental pain. *Expert opinion on pharmacotherapy* 2020 Mar 23,;21(5):591-601.
- (5) Julius D Al. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 2001;413:203-210.
- (6) Ardila.C.M. Hipersensibilidad dentinal: Una revisión de su etiología, patogénesis y tratamiento. *Av Odontoestomatol* . 2009;25:137-146.
- (7) Solé-Magdalena A, Revuelta EG, Menénez-Díaz I, Calavia MG, Cobo T, García-Suárez O, et al. Human odontoblasts express transient receptor protein and acid-sensing ion channel mechanosensor proteins. . *Microsc Res Tech*. 2011;74(5):457-63.
- (8) Tsumura M. et al. TRPV1-mediated calcium signal couples with cannabinoid receptors and sodium-calcium exchangers in rat odontoblasts. *Cell Calcium* 2012;52:124–136.
- (9) Baldión PA, Velandia-Romero ML, Castellanos JE. Odontoblast-Like Cells Differentiated from Dental Pulp Stem Cells Retain Their Phenotype after Subcultivation. *Int J Cell Biol* 2018 Feb.

- (10) Shibukawa Y, Sato M, Kimura M, Sobhan U, Shimada M, Nishiyama A, et al. Odontoblasts as sensory receptors: transient receptor potential channels, pannexin-1, and ionotropic ATP receptors mediate intercellular odontoblast-neuron signal transduction. *Pflugers Arch*. 2015;467(4):843-463.
- (11) Wouters E, Walraed J, Banister SD, Stove CP. Insights into biased signaling at cannabinoid receptors: synthetic cannabinoid receptor agonists. *Biochem Pharmacol* 2019;169:113-623.
- (12) Munt ea. THC and Cannabinol Activate Sensory Nerves. *J. Neurosci* 2002;22(11):4720–4727.
- (13) Davis M, . Cannabinoids in pain management: CB1, CB2 and non-classic receptor ligands. *Expert Opin. Investig. Drugs* 2014;23(8):1123-1140.
- (14) Friedman D DO. Cannabinoids in the Treatment of Epilepsy. *N Engl J Med*. 2015;373(11):1048-1058.
- (15) Bie B, Wu J, Foss JF, Naguib M. An overview of the cannabinoid type 2 receptor system and its therapeutic potential. *Curr Opin Anaesthesiol* 2018;31(4):407-414.
- (16) SCHEFE JH, LEHMANN KE, BUSCHMANN IR, UNGER T, FUNKE-KAISER H. Quantitative real-time RT-PCR data analysis : current concepts and the novel gene expression's CT difference formula. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 2006;84(11):901-910.
- (17) M. L. Velandia, J. V. Montoya, M. Martínez, S. Perdomo, and J. E. Castellanos. Comparison of three neuro-tracing techniques for identification of the sciatic spinal nerve origin in mice. *Biomédica* 2002;22(4):529–534.
- (18) Thermo Fisher. Electrophysiology protocol. Available at: <https://www.thermofisher.com/co/en/home/references/protocols/neurobiology/neurobiology-protocols/electrophysiology.html>.
- (19) Que K, PhD, He D, MD, Jin Y, MD, Wu L, MD, Wang F, MD, Zhao Z, MD, et al. Expression of Cannabinoid Type 1 Receptors in Human Odontoblast Cells. *Journal of endodontics* 2016;43(2):283-288.
- (20) Starowicz K FD. Cannabinoids and Pain: Sites and Mechanisms of Action. *Adv Pharmacol*. 2017;80:437-475.
- (21) Maresz K, Carrier EJ, Ponomarev ED, Hillard CJ, Dittel BN. Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. *Journal of neurochemistry* 2005 Oct;95(2):437-445.
- (22) Boerner C, Bedini A, Hoell V, Kraus J. Analysis of Promoter Regions Regulating Basal and Interleukin-4-Inducible Expression of the Human CB1 Receptor Gene in T Lymphocytes. *Molecular pharmacology* 2008 Mar 1,;73(3):1013-1019.
- (23) Farges J, Carrouel F, Keller J, Baudouin C, Msika P, Bleicher F, et al. Cytokine production by human odontoblast-like cells upon Toll-like receptor-2 engagement. *Immunobiology (1979)* 2010;216(4):513-517.
- (24) Pääkkönen V, Rusanen P, Hagström J, Tjäderhane L. Mature human odontoblasts express virus-recognizing toll-like receptors. *International endodontic journal* 2014 Oct;47(10):934-941.
- (25) Botero TM, Shelburne CE, Holland GR, Hanks CT, Nör JE. TLR4 Mediates LPS-Induced VEGF Expression in Odontoblasts. *Journal of endodontics* 2006;32(10):951-955.
- (26) Kawasaki Takumi, Kawai Taro. Toll-like receptor signaling pathways. *Front. Immunol* 2014 25 September.
- (27) Caviedes-Bucheli, Javier, DDS, MSc, Muñoz, Hugo Roberto, DDS, MSc, Azuero-Holguín MM, DDS, Ulate E, DDS. Neuropeptides in Dental Pulp: The Silent Protagonists. *Journal of endodontics* 2008;34(7):773-788.

- (28) McCoy KL. Interaction between Cannabinoid System and Toll-Like Receptors Controls Inflammation. *Mediators of Inflammation* 2016 Aug 11,;2016:5831315-18.
- (29) Allard B, Magloire H, Couble ML, Maurin JC, Bleicher F. Voltage-gated sodium channels confer excitability to human odontoblasts: possible role in tooth pain transmission. *J Biol Chem.* 2013;281(39):29002-290010.
- (30) Bleicher F. Odontoblast physiology. . *Exp Cell Res.* . 2014;325(2):65-71.
- (31) Solé-Magdalena A, Martínez-Alonso M, Coronado CA, Junquera LM, Cobo J, Vega JA. Molecular basis of dental sensitivity: The odontoblasts are multisensory cells and express multifunctional ion channels. . *Ann Anat.* 2018;215:20-29.
- (32) Maurin JC, Couble ML, Thivichon-Prince B, Magloire H. odontoblaste - Un acteur incontournable de la perception de la douleur dentinaire. *Med Sci* 2013;29(3):293-299.
- (33) Lee BM, Jo H, Park G, et al. Extracellular ATP Induces Calcium Signaling in Odontoblasts. *J Dent Res.* 2017;96(2):200-207.
- (34) Lee K, Lee BM, Park CK, Kim YH, Chung G. Ion Channels Involved in Tooth Pain. *Int J Mol Sci* 2019;20(9):2266.
- (35) Sessle BJ. Peripheral and central mechanisms of orofacial inflammatory pain. . *Translating Mechanisms Orofacial Neurological Disorder*, 2011:179-206.
- (36) Bayliss WM. On the origin from the spinal cord of the vaso-dilator fibres of the hind-limb, and on the nature of these fibres. *The Journal of physiology* 1901 Feb 28,;26(3-4):173-209.
- (37) Caviedes-Bucheli J, Gutierrez-Guerra JE, Salazar F, Pichardo D, Moreno GC, Munoz HR. Substance P receptor expression in healthy and inflamed human pulp tissue. *International endodontic journal* 2007 Feb;40(2):106-111.
- (38) Darmani NA, Belkacemi L, Zhong W. Δ 9-THC and related cannabinoids suppress substance P- induced neurokinin NK1-receptor-mediated vomiting via activation of cannabinoid CB1 receptor. *European journal of pharmacology* 2019 Dec 15,;865:172806.
- (39) Oshita K, Inoue A, Tang H, Nakata Y, Kawamoto M, Yuge O. CB1 Cannabinoid Receptor Stimulation Modulates Transient Receptor Potential Vanilloid Receptor 1 Activities in Calcium Influx and Substance P Release in Cultured Rat Dorsal Root Ganglion Cells. *Journal of Pharmacological Sciences* 2005;97(3):377-385.
- (40) Kibret BG, Ishiguro H, Horiuchi Y, Onaivi ES. New Insights and Potential Therapeutic Targeting of CB2 Cannabinoid Receptors in CNS Disorders. *International journal of molecular sciences* 2022 Jan 17,;23(2):975.
- (41) Shohami E, Cohen-Yeshurun A, Magid L, Algali M, Mechoulam R. Endocannabinoids and traumatic brain injury. *British journal of pharmacology* 2011 Aug;163(7):1402-1410.
- (42) Beneng, K., Renton, T., Yilmaz, Z., Yiangou, Y, Anand P. Cannabinoid receptor CB1-immunoreactive nerve fibres in painful and non-painful human tooth pulp. *Journal of Clinical Neuroscience* 2010;17(11):1476–1479.
- (43) Patil M, Patwardhan A, Salas MM, Hargreaves KM, Akopian AN. Cannabinoid receptor antagonists AM251 and AM630 activate TRPA1 in sensory neurons. *Neuropharmacology* 2011;61(4):778-788.

(44) Bakali E, Tincello D. Current Understanding of Cannabinoids and Detrusor Overactivity. *Curr Bladder Dysfunct Rep* 2017 Mar 7;;12(1):86-94.

CONCLUSIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES

Se puede concluir que CB1 y CB2 pueden tener un papel importante en el control y regulación del dolor y la inflamación y que la unión de moléculas a los receptores permite activar múltiples vías de señalización que controlan la entrada y salida de iones intracelulares. La respuesta diferencial que puede obtenerse depende tanto del agonista o antagonista, como del tipo de célula y el contexto biológico.

Adicionalmente se encontraron los genes de referencia más adecuados para realizar la cuantificación relativa de experimentos de RT qPCR en cultivo de odontoblastos humanos en condiciones inflamatorias. Esta validación permite elegir los genes de referencia óptimos para la evaluación de niveles de expresión de diferentes genes diana en este cultivo, así que se recomienda normalizar con los genes que obtuvieron los mejores resultados y que presenten niveles de expresión similares a los transcritos a evaluar.

Por otro lado, se logró estandarizar un modelo celular en condiciones de inflamación en odontoblastos y fibroblastos gingivales donde se demostró la sobreexpresión de CB1 y CB2, pues se encontró que aumentaban los transcritos y las proteínas respecto a las células no estimuladas, demostrando que en estas condiciones hay regulación en la expresión de ambos receptores, en especial de CB2. Además, la estimulación con cannabidiol aumentó las concentraciones de calcio intracelular comprobando que son receptores funcionales en ambos cultivos celulares.

Finalmente, la cuantificación de los receptores CB1 y CB2 permitió corroborar su sobreexpresión y actividad biológica en condiciones de inflamación en cultivo de odontoblastos humanos. Adicionalmente, por primera vez se evidenció la sobreexpresión de ambos receptores en pulpas inflamadas. Encontrar ambos receptores funcionales expresados en este tejido abre las puertas a considerarlos blancos farmacológicos en el control de la sensibilidad, el dolor y la inflamación dental.

Para hacer eso posible, se recomienda realizar pruebas electrofisiológicas, como patch clamp para obtener resultados de los cambios de las diferentes concentraciones iónicas intracelulares. Es necesario evaluar el efecto de los agonistas utilizados y del cannabis de espectro completo en el cultivo de odontoblastos, evaluando si se reduce la inflamación. Además, es importante corroborar y conocer las cascadas de señalización y los mediadores implicados al activar los receptores con cada una de las moléculas estudiadas. Se requieren estudios *in vivo* para evaluar el efecto antiinflamatorio y antinociceptivo de los cannabinoides en pulpa dental.

ASPECTOS ÉTICOS

Teniendo en cuenta que la presente investigación es un estudio en ciencias biomédicas y al tratarse de un estudio *in vitro*, en el que se utilizaron pulpas dentales humanas, la propuesta acoge la declaración de Helsinki de 2013, por lo que se obtendrá un consentimiento informado de los voluntarios donantes previa explicación del procedimiento y tratamiento de tejidos. El proyecto recibió aprobación del comité de ética de la Facultad de Odontología. (Anexo 1, 2 y 3).

Según la resolución 8430 de 1993 del ministerio de salud la clasificación de nuestro estudio es: Riesgo menor que el mínimo. Adicionalmente manifestamos que nos recogemos en las normas de buenas prácticas de laboratorio de la OMS. Finalmente nos comprometemos a mantener los criterios de integridad científica, a la adecuada utilización de métodos de investigación, a la transparencia y veracidad de nuestros procesos y recolección de datos, reconociéndonos en la declaración de Singapur de 2010.

AGRADECIMIENTOS

A la doctora Myriam L. Velandia-Romero (Universidad El Bosque, Bogotá) por su amable colaboración en los experimentos. Los autores niegan cualquier conflicto de interés relacionado con este estudio.

FINANCIACIÓN

El proyecto fue parcialmente financiado por Biominerales Pharma, Bogotá Colombia.

PRODUCTOS

Presentación Oral: VII Congreso de la Región Latinoamericana de la IADR, LIV Reunión Científica Anual Sociedad Argentina de Investigación Odontológica, 10,11,12,13 de noviembre de 2021. Título de la ponencia: Transcripción de receptores cannabinoides: validación de genes de referencia para qPCR en cultivo de odontoblastos humanos. (Anexo 4)

Presentación Oral: XXXI Encuentro Nacional de Investigación Odontológica, Asociación Colombiana de Facultades de Odontología, noviembre 3- 5 de 2021. Título: Detección de mensajeros de receptores cannabinoides en odontoblastos y fibroblastos gingivales y evaluación de actividad. (Anexo 5)

Sometimiento resumen: 2022 IADR/APR General Session & Exhibition. Título de resumen aceptado: Cannabinoid receptors expression and activity in odontoblast-

like-cells and gingival fibroblasts. (Anexo 6)

Sometimiento resumen: 2022 IADR/APR General Session & Exhibition. Título de resumen aceptado: Reference genes validation in human-odontoblast-culture for cannabinoid receptors transcripts quantitation. (Anexo 7)

Sometimiento artículo en revista indexada: Título: Cultured human odontoblast and gingival fibroblasts express both functional cannabinoid receptors. Revista: Acta Odontológica Latinoamericana (Anexo 8). Se recibió la evaluación por el revisor (anexo 8.1), se realizaron las respectivas correcciones y el 21/05/2022 se envió la nueva versión del manuscrito a los editores.

Sometimiento artículo en revista indexada: Título: Reference genes validation for the relative quantification of cannabinoid receptors expression by qPCR in human odontoblasts. Revista: Archives of Oral Biology (Anexo 9)

ANEXOS

Anexo 1. Aval de ética

Centro de Investigación y Extensión
Facultad de Odontología
Sede Bogotá



Bogotá D.C., 19 de febrero del 2021.

[B.CIEFO-008-2021]

Doctor
CAMILO ALEJANDRO GUERRERO GUTIERREZ
Director Área Curricular
Facultad de Odontología – Sede Bogotá.
Universidad Nacional de Colombia
Ciudad

Asunto: Concepto Comité de Ética en Investigación.

Respetado Profesor:

Cordialmente le informo que el Comité de Ética en Investigación de la Facultad, en su sesión del día 15 de febrero, Acta 02-21, luego de revisar el trabajo titulado: "**EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA Y ACTIVIDAD DE RECEPTORES CANNABINOIDES EN PULPA DENTAL Y ODONTOBLASTOS HUMANOS.**", presentado por la estudiante de la Maestría en Odontología, LAURA MARCELA NAVARRO SAIZ, dirigido por el Doctor JAIME EDUARDO CASTELLANOS PARRA y codirigido por la profesora LILIA JADITH BERNAL CEPEDA, emitió el concepto de **AVALADO**, dado que este último cumple con todos los requerimientos éticos y metodológicos.

Con un cordial saludo,

CATALINA MARIA AREVALO CARO
Directora Centro de Investigación y Extensión
cmarevaloc@unal.edu.co

Copia: JAIME EDUARDO CASTELLANOS PARRA, Director del proyecto- Sede Bogotá
LILIA JADITH BERNAL CEPEDA Codirectora del proyecto- Sede Bogotá
LAURA MARCELA NAVARRO SAIZ, Estudiante

Anexo 2. Formato de consentimiento informado

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA DONACIÓN Y RECOLECCIÓN DE
PULPAS Y DIENTES HUMANOS PARA EL ESTUDIO TITULADO “Evaluación de
la presencia y actividad de receptores cannabinoides en pulpa dental y
odontoblastos humanos ”
(Otorgado en cumplimiento de la ley 35 de 1989)**

CIUDAD: _____ FECHA: Día: _____ Mes: _____ Año: _____

NOMBRE DEL PACIENTE					
IDENTIFICACIÓN		EDAD		SEXO	
Diente(s)					

Yo, _____
identificado como aparece al pie de mi firma, en calidad de paciente(____) o
acudiente (____) de _____
en su condición de menor de edad (____), analfabeta(____), discapacitado(____);
por medio del presente documento, y en pleno uso de mis facultades mentales,
otorgo en forma libre mi consentimiento a la estudiante de Maestría LAURA
MARCELA NAVARRO SAIZ, bajo la dirección del profesor JAIME EDUARDO
CASTELLANOS PARRA y co-dirección de la profesora LILIA JADITH BERNAL
CEPEDA, para que haga uso de el(los) diente(s) que me serán extraídos por
extracción indicada para recolectar pulpa dental o para obtener cortes
histológicos con fines académicos.
Autorizo con la condición que no se mencione mi nombre, que los resultados
del estudio puedan ser utilizados con fines de enseñanza, investigación y
divulgación científica. Certifico que se me ha informado que la participación en
este estudio es voluntaria, respetándose la voluntad de aceptación a rehusar la
donación de mis dientes sin que esto afecte la calidad en la atención que se me
está prestando en el momento.
Certifico que se me ha explicado que no estaré expuesto a ningún riesgo en el
proceso de recolección de la muestra, aparte de lo inherente a la cirugía que no
hace parte de la investigación y será aclarado por el profesional respectivo.
Doy fe de que se me ha explicado claramente que no recibiré ningún beneficio
económico derivado de mi participación, sin embargo, se me explicó que es
probable que mi participación ayude a encontrar una respuesta a la pregunta de
investigación, siendo esto un beneficio para la sociedad.

El presente documento ha sido leído, entendido por mí en su totalidad y se ha resuelto cualquier inquietud que yo presente respecto a este documento, por lo tanto acepto voluntariamente participar y confirmo mi donación voluntaria.

Firma de Paciente o Acudiente

Nombre: _____

Cédula: _____

Como testigo certifico que se hizo la lectura exacta del documento de consentimiento para el potencial participante y el individuo ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmo que el individuo ha dado consentimiento libremente.

Firma de Testigo

Nombre: _____

Cédula: _____

Ha sido proporcionada al participante una copia de este documento de Consentimiento Informado.

Firma de Investigador Principal

LAURA MARCELA NAVARRO SAIZ

C.C. 1,054.092.120

INFORMACIÓN DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN

INVESTIGADOR PRINCIPAL	LAURA MARCELA NAVARRO SAIZ Odontóloga Estudiante de Maestría en Odontología Correo electrónico: Imnavarros@unal.edu.co Teléfono: 3133653163
DIRECTOR	Dr. JAIME EDUARDO CASTELLANOS PARRA PhD, Profesor Titular Catedrático Correo electrónico: jecastellanosp@unal.edu.co
CODIRECTOR	Dra. LILIA JADITH BERNAL CEPEDA Doctorado en Ciencias Farmacológicas Correo electrónico: lijbernalc@unal.edu.co

Anexo 3. Folleto informativo

¡Muchas gracias!

Por colaborar en nuestro proyecto de investigación

Universidad Nacional de Colombia
Maestría en Odontología

Proyecto de Investigación
"Evaluación de la presencia y actividad de receptores cannabinoides en pulpa dental y odontoblastos humanos"

Si tiene alguna duda sobre el manejo de las muestras o sobre el proyecto de investigación, Ud. puede contactar a:

Laura Marcela Navarro Saiz
Teléfono: 3133653163
Imnavarros@unal.edu.co

Los resultados obtenidos pueden en un futuro beneficiar a la comunidad para mejorar la salud oral

IBAPO
INVESTIGACIONES BÁSICAS Y APLICADAS EN ODONTOLÓGIA

Laura Marcela Navarro Saiz
Jaime Eduardo Castellanos Parra
Lilia Jadith Bernal Cepeda

Bogotá 2020

Procedimiento:

Universidad Nacional de Colombia
Maestría en Odontología

1. Se realizará la extracción del diente

2. Se desinfectará y llevará al laboratorio

3. Se someterá a diferentes sustancias para prepararlo para el proceso de corte

4. Se realizará el corte en laminas muy delgadas

5. Se realizarán las tinciones pertinentes

OBJETIVO DEL ESTUDIO
Evaluar la presencia y actividad de receptores cannabinoides en pulpas dentales y células similares a odontoblastos humanos.



Laura Marcela Navarro Saiz
Jaime Eduardo Castellanos Parra
Lilia Jadith Bernal Cepeda

Bogotá 2020

Anexo 4. Certificado ponencia LAR



La Región Latinoamericana de la IADR y la Sociedad Argentina de Investigación Odontológica dejan constancia que

LAURA NAVARRO SAIZ

ha participado en calidad de PRESENTADOR del trabajo

TRANSCRIPCIÓN DE RECEPTORES CANNABINOIDES: VALIDACIÓN DE GENES DE REFERENCIA PARA QPCR EN CULTIVO DE ODONTOBLASTOS HUMANOS.

cuyos autores son

NAVARRO SAIZ LM, BERNAL CEPEDA LJ, CASTELLANOS JE

en el VIII Congreso de la Región Latinoamericana de la IADR y la LIV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Odontológica, de manera virtual, los días 10, 11, 12 y 13 de noviembre de 2021.

Analía Garrofe
Presidente
Comisión Organizadora

Gabriel Sánchez
Presidente
SAIO

María del Carmen López Jordi
Presidente
LAR



www.saio.org.ar

Anexo 5. Certificado ponencia ACFO



Anexo 6. Carta aceptación ponencia IADR

Wednesday, 16-Mar-2022

Laura Marcela Navarro Saiz
Bogotá, Colombia

Abstract Control ID#: 3711970

Abstract Title: Cannabinoid receptors expression and activity in odontoblast-like-cells and gingival fibroblasts

Dear Laura Marcela Navarro Saiz,

It is a pleasure to inform you that your abstract has been **ACCEPTED** for virtual **INTERACTIVE TALK** presentation at the **2022 IADR/APR General Session & Exhibition**. The **2022 IADR/APR General Session & Exhibition** is a **100% virtual** experience.

Please note that some colleagues have provided an alternate email address for notification, so if this letter is addressed to a colleague, please forward it to his/her attention. Email notifications are sent only to the address provided for the presenter when the abstract was submitted; it is the presenter's responsibility to notify co-authors.

DO NOT lose this notification. The mode of your presentation has been assigned by the IADR Scientific Group Program Chair and must be followed as we are unable to change it at this date. Assignments were based on authors' requests as much as possible. Final presentation numbers are assigned after the presenter pre-registration deadline of April 18, 2022.

All session times are in China Standard Time (UTC +8).

PRESENTATION INFORMATION

Presentation Mode: Interactive Talk Session

Presentation Date: June 23, 2022

Session Title: Pulp Biology & Regeneration Research

Live Session Time: 8:00 PM - 9:30 PM China Standard Time (UTC +8)

Live Presentation Duration: 6 minutes, 1 minute for question, 1 minute for transition (total of 8 minutes)

PRE-REGISTRATION REQUIREMENT

All presenters must pre-register and pay the applicable fee by the **April 18, 2022**

presenter pre-registration deadline. If you do not pre-register, you will NOT be allowed to present at the meeting and your abstract will be withdrawn from the online scientific program and will not be citable as appearing in the special edition of the *Journal of Dental Research*.

Approximately one week after the presenter registration deadline, a notification confirming your participation with your final presentation number and live presentation time will be sent. The notices will be sent to all registered presenters at once after the pre-registration deadline. Notifications are not sent out after individual registration.

MEETING REGISTRATION

Register for the meeting here: **<https://www.iadr.org/events/iags/2022-iadrapr-general-session-registration>**.

Note to Members: To register as a member, you must have activated or renewed your 2022 membership by the time you register. To renew your membership online, click here, **<https://www.iadr.org/membership/member-benefits>**, to log in and complete your membership renewal before proceeding to complete your meeting registration for the 2022 IADR/APR General Session.

Presenters will need the Abstract Control ID# to register for the meeting:
3711970

PRESENTER INFORMATION

Click here to view Interactive Talk presenter information and requirements:<https://www.iadr.org/events/iags/interactive-talk-presentations-frequently-asked-questions>

Included in this information is the Abstract Withdraw/Presenter Change Request form (<https://www.iadr.org/2022IAGS/abstractwithdraw-refund>). If you need to request a presenter change or withdraw your abstract, you are **required** to complete this form as soon as possible. If you make a presenter change request, please note that individuals may present only one abstract (excluding Symposia and Keynote Speakers) and the replacement must be a co-author. To avoid delays, please make your request well in advance of the presenter pre-registration deadline.

PRESENTATION DISPLAY

Your title will be included in the program as submitted: Cannabinoid receptors expression and activity in odontoblast-like-cells and gingival fibroblasts

If you would like to edit your presentation title (not to exceed 10 words), please send an email to meetings@iadr.org by no later than April 18, 2022.

Share on social media that you have been accepted to be a presenter at the 2022 IADR/APR General Session & Exhibition.

MEETING INFORMATION

To find other important meeting information including the FAQs for the virtual meeting, preliminary schedule of events, new initiatives, featured presentations, etc., please visit <https://www.iadr.org/2022iags>.

Thank you for submitting your abstract. We look forward to your presentation at the 2022 IADR/APR General Session & Exhibition. We have scheduled a full conference and we hope you are able to experience the whole of the meeting. Please visit <https://www.iadr.org/2022iags> for more details. If you have any questions, please send a message to meetings@iadr.org.

Sincerely,

David Bartlett
Annual Session Committee, Chair
Anexo 7. Carta de aceptación ponencia IADR
Wednesday, 16-Mar-2022

Prof. Jaime Castellanos
Bogotá, Colombia

Abstract Control ID#: 3712469

Abstract Title: Reference genes validation in human-odontoblast-culture for cannabinoid receptors transcripts quantitation

Dear Prof. Jaime Castellanos,

It is a pleasure to inform you that your abstract has been ACCEPTED for virtual INTERACTIVE TALK presentation at the 2022 IADR/APR General Session & Exhibition. The 2022 IADR/APR General Session & Exhibition is a 100% virtual experience.

Please note that some colleagues have provided an alternate email address for notification, so if this letter is addressed to a colleague, please forward it to his/her attention. Email notifications are sent only to the address provided for the presenter when the abstract was submitted; it is the presenter's responsibility to notify co-authors.

DO NOT lose this notification. The mode of your presentation has been assigned by the IADR Scientific Group Program Chair and must be followed as we are unable to change it at this date. Assignments were based on authors' requests as much as possible. Final presentation numbers are assigned after the presenter pre-registration deadline of April 18, 2022.

All session times are in China Standard Time (UTC +8).

PRESENTATION INFORMATION

Presentation Mode: Interactive Talk Session

Presentation Date: June 23, 2022

Session Title: Pulp Biology & Regeneration Research

Live Session Time: 8:00 PM - 9:30 PM China Standard Time (UTC +8)

Live Presentation Duration: 6 minutes, 1 minute for question, 1 minute for transition (total of 8 minutes)

PRE-REGISTRATION REQUIREMENT

All presenters must pre-register and pay the applicable fee by the **April 18, 2022**

presenter pre-registration deadline. If you do not pre-register, you will NOT be allowed to present at the meeting and your abstract will be withdrawn from the online scientific program and will not be citable as appearing in the special edition of the *Journal of Dental Research*.

Approximately one week after the presenter registration deadline, a notification confirming your participation with your final presentation number and live presentation time will be sent. The notices will be sent to all registered presenters at once after the pre-registration deadline. Notifications are not sent out after individual registration.

MEETING REGISTRATION

Register for the meeting here: **<https://www.iadr.org/events/iags/2022-iadrapr-general-session-registration>**.

Note to Members: To register as a member, you must have activated or renewed your 2022 membership by the time you register. To renew your membership online, click here, <https://www.iadr.org/membership/member-benefits>, to log in and complete your membership renewal before proceeding to complete your meeting registration for the 2022 IADR/APR General Session.

**Presenters will need the Abstract Control ID# to register for the meeting:
3712469**

PRESENTER INFORMATION

Click here to view Interactive Talk presenter information and requirements:<https://www.iadr.org/events/iags/interactive-talk-presentations-frequently-asked-questions>

Included in this information is the Abstract Withdraw/Presenter Change Request form (<https://www.iadr.org/2022IAGS/abstractwithdraw-refund>). If you need to request a presenter change or withdraw your abstract, you are required to complete this form as soon as possible. If you make a presenter change request, please note that individuals may present only one abstract (excluding Symposia and Keynote Speakers) and the replacement must be a co-author. To avoid delays, please make your request well in advance of the presenter pre-registration deadline.

PRESENTATION DISPLAY

Your title will be included in the program as submitted: Reference genes validation in human-odontoblast-culture for cannabinoid receptors transcripts quantitation

If you would like to edit your presentation title (not to exceed 10 words), please send an email to meetings@iadr.org by no later than April 18, 2022.

Share on social media that you have been accepted to be a presenter at the 2022 IADR/APR General Session & Exhibition.

MEETING INFORMATION

To find other important meeting information including the FAQs for the virtual meeting, preliminary schedule of events, new initiatives, featured presentations, etc., please visit <https://www.iadr.org/2022iags>.

Thank you for submitting your abstract. We look forward to your presentation at the 2022 IADR/APR General Session & Exhibition. We have scheduled a full conference and we hope you are able to experience the whole of the meeting. Please visit <https://www.iadr.org/2022iags> for more details. If you have any questions, please send a message to meetings@iadr.org.

Sincerely,

David Bartlett Annual Session Committee, Chair Anexo 8. Sometimiento artículo a Acta Odontológica Latinoamericana

T1040 External > Inbox x

Acta Odontológica Latinoamericana Aol
to me

Sat, Mar 19, 7:01 PM (4 days ago) ☆ ↶ ⋮

🌐 Spanish > English Translate message Turn off for: Spanish x

Estimada Dra. Navarro-Saiz:
Hemos recibido correctamente su manuscrito de código provisorio P671. Después de su adecuación a las normas de la revista, se le ha dado entrada en AOL con el código T1040. Le solicitamos que mencione este último código en el *Subjet* de toda la correspondencia relacionada con el mismo. Comenzamos ahora el proceso de revisión y la mantendremos informada. Muchas gracias por su colaboración a AOL
Cordialmente,

María E. Itoiz y Ricardo L. Macchi
Editores AOL

Anexo 8.1

Acta Odontológica Latinoamericana Aol
to me, Acta

Tue, May 17, 8:29 AM (7 days ago) ☆ ↶ ⋮

🌐 Spanish > English Translate message Turn off for: Spanish x

Estimada Dra. Laura Navarro

En archivo adjunto se envía el informe del referato de su trabajo T 1040. En base a él, su trabajo será considerado nuevamente para su publicación en AOL si Ud. realiza las correcciones sugeridas por el revisor. Al enviar una nueva versión por favor indique los cambios en el manuscrito usando "control de cambios" o bien resaltándolos. Por otro lado, responda los comentarios del revisor punto por punto.

Antes del nuevo envío, por favor controle el manuscrito con la *check list* que figura en las Instrucciones para autores en nuestra página web. Las faltas de adecuación a esas normas dan lugar a muchas demoras en el procesamiento de los trabajos.

Esperando una nueva versión de su manuscrito, la saluda muy cordialmente

Patricia Mandalunis
AOL

Anexo 9. Sometimiento artículo Journal of Oral Biology and Craniofacial Research

Journal of Oral Biology and Craniofacial Research <em@editorialmanager.com>
para mí

lun, 23 may, 7:07 (hace 1 día) ☆ ↶ ⋮

🌐 inglés > español Traducir mensaje Desactivar para: inglés x

This is an automated message.

Manuscript Number: JOBCR-D-22-00191
Reference gene validation for the relative quantification of cannabinoid receptor expression in human odontoblasts via quantitative polymerase chain reaction

Dear Professor Castellanos Parra,

Your above referenced submission has been assigned a manuscript number: JOBCR-D-22-00191.

To track the status of your manuscript, please log in as an author at <https://www.editorialmanager.com/jobcr/>, and navigate to the "Submissions Being Processed" folder.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,
Journal of Oral Biology and Craniofacial Research