

Revisión de los Efectos del Tratamiento con Agonistas y Antagonistas de Receptores de Cannabinoides en un Modelo de Periodontitis Experimental

Recibido 06/11/2019

Aceptado 04/03/2020

Ossola CA^{1,2}, Balcarcel NB¹, Mohn CE^{1,2}, Elverdin JC¹, Fernandez-Solari J^{1,2}

¹ **Universidad de Buenos Aires**
Facultad de Odontología
Cátedra de Fisiología
Buenos Aires, Argentina

² **CONICET**
Buenos Aires, Argentina

RESUMEN

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica que provoca daños sobre los tejidos periodontales y puede llevar a la pérdida de piezas dentarias. Si bien la enfermedad normalmente se inicia por la acumulación de placa bacteriana, que produce efectos nocivos sobre los tejidos, su patogénesis se ve potenciada por varias condiciones individuales entre las que se destaca la propia respuesta inmune/inflamatoria del hospedador, que es capaz de causar efectos deletéreos irreversibles sobre los tejidos de soporte y protección dentaria. La periodontitis, en todas sus formas, requiere de intervención odontológica periódica y de un enfoque multifactorial, por lo tanto, la comunidad científica está ampliamente dedicada a la búsqueda de métodos coadyuvantes que acompañen el tratamiento de la placa bacteriana y la eliminación del cálculo, con el fin de mejorar las condiciones de salud de los pacientes que padecen esta patología de alta incidencia. Las respuestas antiinflamatorias y osteoprotectoras desencadenadas por activación de receptores de cannabinoides en distintos tejidos han llevado a nuestro grupo de investigación a estudiar al sistema endocannabinoide como potencial blanco terapéutico para tratar la periodontitis. En este trabajo se revisan y discuten los resultados obtenidos hasta el momento en modelos experimentales.

Palabras clave: periodontitis, endocannabinoides, agonistas de receptores de cannabinoides, antagonistas de receptores de cannabinoides, osteoprotección

ABSTRACT

Periodontitis is a chronic inflammatory disease that causes damage to periodontal tissues and can lead to the loss of teeth. Although the disease is usually initiated by the accumulation of bacterial plaque, which produces harmful effects on the tissues, its pathogenesis is enhanced by several individual conditions, among which the host's own immune/inflammatory response, which is capable of causing irreversible deleterious effects on periodontal tissues.

Periodontitis, in all its forms, requires periodic dental intervention and a multifactorial approach; therefore the scientific community is widely dedicated to the search for adjuvant methods that accompany the treatment of bacterial plaque and the elimination of calculus, in order to improve the health conditions of patients suffering from this high incidence pathology. The anti-inflammatory and osteoprotective responses triggered by activation of cannabinoid receptors in different tissues have led our research group to study the endocannabinoid system as a potential therapeutic target to treat periodontitis. In this work, the results obtained until now in experimental models are reviewed and discussed.

Keywords: periodontitis, endocannabinoids, cannabinoid receptor agonists, cannabinoid receptor antagonists, osteoprotection

INTRODUCCIÓN LA PERIODONTITIS

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica de etiología fundamentalmente bacteriana, que afecta los tejidos duros y blandos de soporte y protección dentaria (Slots, 2017). La enfermedad, normalmente se origina a partir de una gingivitis preexistente, que es la inflamación de la encía producto de la acumulación de biofilm de placa bacteriana y sarro o cálculo (placa mineralizada) en los dientes y en la propia encía, en zonas linderas al surco gingival. La gingivitis es nociva para el tejido gingival, pero si es tratada a tiempo, sus daños son reversibles. Sin embargo, si la infección y la inflamación progresan, comienza a producirse pérdida de adhesión entre el epitelio de unión y el diente, lo que provoca la formación de una bolsa periodontal donde, en condiciones de salud, hay tan solo un surco. La bolsa periodontal subsecuente se llena de líquido crevicular y se constituye en un sitio favorable para la acumulación y la proliferación de microorganismos periodonto-patogénicos. Cuando esto sucede, la enfermedad pasa a convertirse en periodontitis, que se subdivide en diferentes formas y grados de severidad, pero que en todos los casos provoca daños irreversibles sobre los tejidos periodontales.

La periodontitis provoca el deterioro de los tejidos periodontales de protección (encía libre e insertada y epitelio de unión) y de inserción dentaria (cemento radicular, ligamento periodontal y hueso alveolar), lo que la lleva a constituir una de las causas más importantes de la pérdida de piezas dentarias en el adulto. Si bien la enfermedad normalmente se inicia por la acumulación de placa bacteriana, que produce efectos nocivos sobre los tejidos bucales mediados por enzimas hidrolíticas, sustancias ácidas y toxinas, su patogénesis se ve potenciada por varias condiciones individuales entre las que se destaca la propia respuesta

inmune/inflamatoria del hospedador, que es capaz de causar efectos deletéreos sobre los tejidos periodontales. Los lipopolisacáridos (LPS), toxinas producidas por especies bacterianas gram-negativas del biofilm de la cavidad bucal, conducen a un infiltrado de leucocitos en el tejido mucogingival, lo cual incrementa la síntesis y liberación de citoquinas proinflamatorias como las interleucinas 1 (IL-1) y 6 (IL-6), y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), de prostaglandinas (PG), especialmente la PGE₂, de especies reactivas del oxígeno y de enzimas hidrolíticas con actividades proinflamatorias y catabólicas (Page, 1991). Evidencias experimentales señalan a las prostaglandinas y al óxido nítrico (NO) como mediadores de la resorción ósea (Offenbacher et al., 1993; Lappin et al., 2000; Brennan et al., 2003). Niveles elevados de PGE₂ detectados en el líquido crevicular de los pacientes con periodontitis han sido relacionados con un incremento en la severidad de la enfermedad (Preshaw y Heasman, 2002). La NO sintasa inducible (NOSi), cuya actividad está incrementada en el tejido gingival afectado por periodontitis, desempeña un papel clave, tanto en la patogénesis de la enfermedad como en la pérdida ósea subsiguiente. El NO producido durante la respuesta inflamatoria posee un efecto dual, por un lado, contribuye a la destrucción bacteriana, y por otro, cuando alcanza altas concentraciones, posee un efecto deletéreo sobre los tejidos del hospedador. El NO es sintetizado en exceso en respuesta a citoquinas proinflamatorias, generando un efecto inhibitorio en la proliferación y diferenciación de osteoblastos, que lleva a una disminución de la osteogénesis (Saura et al., 2010), sumado a un efecto colagenolítico y anticolagenogénico que provoca la destrucción de los tejidos del hospedador (Park, 2013).

El equilibrio entre la formación de hueso inducido por los osteoblastos y la resorción ósea a cargo de los osteoclastos determina el nivel de la masa ósea. La pérdida ósea aparece por un desequilibrio a favor de los mecanismos de reabsorción. El ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B (RANKL), su receptor RANK, y el receptor señuelo osteoprotegerina (OPG), son moléculas clave en la regulación de la diferenciación de los osteoclastos, su reclutamiento y funcionamiento (Udagawa et al., 1999; Suda et al., 1999). RANKL es esencial para la diferenciación completa de células precursoras de osteoclastos y desempeña un papel fundamental en la resorción ósea periodontal (Lacey et al., 1998; Nagasawa et al., 2007). Un estudio realizado en cultivos de precursores de osteoclastos concluyó que el TNF α aumenta potentemente la proliferación/diferenciación de osteoclastos en presencia de RANKL (O'Gradaigh et al., 2004). Además, se informó que IL-1 y LPS estimulan la osteoclastogénesis a través de dos eventos paralelos: incremento directo de la expresión de RANKL y supresión de la expresión de OPG, molécula que interfiere

con la interacción RANK-RANKL, necesaria para la activación de pre-osteoclastos. Además, la supresión de la expresión de OPG está mediada por PGE2 (Suda et al., 2004).

En los últimos años, y en base a estudios epidemiológicos, la periodontitis ha sido ampliamente asociada con la enfermedad cardiovascular y los accidentes cerebro-vasculares (Pussinen et al., 2007). Aparentemente, el punto de vinculación entre ambas patologías es la inflamación. Si bien la periodontitis constituye una infección predominantemente local, al tratarse de una enfermedad inflamatoria crónica puede conducir a alteraciones sistémicas con repercusión en distintos órganos vitales tales como el corazón y los riñones. Estudios en humanos mostraron que los pacientes que se encuentran bajo tratamiento de la enfermedad periodontal presentan una disminución en el contenido sérico de proteína C reactiva e IL-6, dos parámetros inflamatorios sistémicos (Pussinen et al., 2007). Por lo tanto, el tratamiento de la enfermedad periodontal, no solo es importante para el mantenimiento de la salud bucal, sino que también lo es para la prevención de enfermedades inflamatorias sistémicas que pueden conducir a infarto miocárdico o accidentes cerebro-vasculares (Davé y Van Dyke, 2008).

EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE (SEC)

El SEC es una red de señalización intercelular que modula un espectro diverso de procesos fisiológicos incluyendo la nocicepción, el comportamiento, el apetito, el control motor, la reproducción, la formación de la memoria, el metabolismo óseo y la inflamación. Comprende ligandos endógenos como la anandamida (AEA) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG), una serie de mecanismos para su síntesis y degradación, y receptores de membrana acoplados a proteína G, siendo CB1r y CB2r los principales receptores específicos de cannabinoides (CB_r) y el receptor de potencial transitorio vainiloide tipo 1 (TRPV1), el receptor inespecífico de más amplia distribución en el organismo. Por su parte, la hidrolasa N-acil fosfatidiletanolamina fosfolipasa D (NAPE-PLD) y la amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH), son las principales enzimas encargadas de la síntesis y degradación de AEA, respectivamente, mientras que la diacilglicerol lipasa (DAGL) y la monoacilglicerol lipasa (MAGL), hacen lo propio con el 2-AG. Aunque los receptores de cannabinoides están presentes en diferentes tipos de células y tejidos, el CB1r es altamente expresado en el tejido nervioso, mientras que CB2r se expresa principalmente en células inmunes tales como monocitos, macrófagos, linfocitos y en células óseas (Fine y Rosenfeld, 2013; Kohnz y Nomura, 2014; Ahn et al., 2008).

Los cannabinoides pueden actuar como potentes agentes anti-inflamatorios ejerciendo sus efectos a través de la supresión de la producción de citoquinas, la inhibición de la proliferación celular, inducción

de apoptosis y la inducción de células T reguladoras (Nagarkatti et al., 2009). Los receptores CB1r y CB2r también han sido descritos en el tejido gingival (Nakajima et al., 2006). Se ha reportado que la AEA inhibe la inflamación periodontal excesiva y que el cannabidiol, un cannabinoide extraído de la planta de marihuana, disminuye la pérdida ósea inducida por periodontitis experimental (PE), disminuyendo la producción de TNF α e IL-1 α (Nakajima et al., 2006; Napimoga et al., 2009). Sin embargo, se han reportado efectos opuestos entre AEA y 2-AG, antiinflamatorios y proinflamatorios, respectivamente, en estudios con células de ligamento periodontal (Özdemir et al., 2014).

CONSUMO DE CANNABIS Y SALUD PERIODONTAL

Distintos reportes de la literatura describen efectos nocivos del consumo de cannabinoides sobre la salud periodontal (Liu et al., 2019), aunque la mayoría de ellos son inespecíficos y están vinculados a la ingesta de cannabis por vía inhalatoria (el acto de fumar marihuana), producto de la combustión de la hierba y el papel que la contiene. Los efectos deletéreos inespecíficos más conocidos sobre la cavidad bucal son los siguientes: irritación de mucosas por efecto del humo inhalado; condiciones favorables para el desarrollo de microorganismos debido al calor que produce la combustión; daño tisular adicional debido a la inhalación de químicos no cannabinoides presentes en la planta; malos hábitos de higiene bucal de los consumidores de cannabis. Sin embargo, existe un efecto nocivo específico desencadenado por los cannabinoides presentes en la planta, principalmente los tetrahydro-cannabinoides y el cannabidiol, que actúan sobre receptores del SEC localizados en diferentes estructuras de las glándulas salivales, y que median acciones que conducen a la hipofunción de tales glándulas y a la consecuente hiposalivación. Dado que la saliva constituye una barrera primaria contra las infecciones en la cavidad bucal, su déficit conduce al incremento en la predisposición a la acumulación de placa bacteriana sobre las superficies dentarias y periodontales, y por ende al desarrollo de periodontitis (Ambrósio et al., 2017).

SISTEMA ENDOCANNABINOIDE EN LAS GLÁNDULAS SALIVALES

En el año 2006, con nuestro grupo de trabajo, demostramos la presencia de receptores de cannabinoides en la glándula submaxilar de rata, determinando la presencia de los CB2r en zonas periféricas de las células acinares y en estructuras ductales, mientras que los CB1r se vieron circunscriptos a las estructuras ductales (Prestifilippo et al., 2006). En ese mismo trabajo también demostramos que la administración intraglandular del endocannabinoide anandamida (1 μ g/50 μ l) inhibe la secreción salival estimulada por

distintas dosis tanto del agonista colinérgico metacolina (1, 3 y 10 µg/Kg de rata) como de noradrenalina (1, 3, 10 y 30 µg/Kg de rata), pero que la administración previa de los antagonistas de CB1r y CB2r, AM251 (15µg/50µl) y AM630 (1µg/50µl), respectivamente, previno el efecto inhibitorio en todos los casos. Estos resultados en su conjunto demostraron por primera vez la presencia de los receptores específicos de cannabinoides en las glándulas submaxilares y su función biológica como moduladores de la secreción salival. A su vez, contribuyeron a la comprensión de por qué fumar marihuana produce xerostomía (sensación de boca seca), producto de las interacciones de los cannabinoides inhalados con sus receptores presentes en las glándulas salivales. En un trabajo publicado más adelante, demostramos que los endocannabinoides son incrementados en las glándulas submaxilares frente a situaciones inflamatorias sistémicas inducidas experimentalmente por la administración intraperitoneal de LPS (5 mg/kg) y que los CB1r y CB2r median, al menos en parte, los efectos inhibitorios de la secreción salival observados en tales condiciones (Fernandez-Solari et al., 2010). De hecho, la administración intraglandular de los antagonistas de CB1r y CB2r previno la hiposalivación inducida por la administración sistémica de LPS.

MATERIALES Y MÉTODOS – RESULTADOS

SISTEMA ENDOCANNABINOIDE EN LOS TEJIDOS PERIODONTALES

En el año 2006, Nakajima et al., demostraron, por técnicas inmunohistoquímicas, la presencia de CB1r y CB2r en fibroblastos y células endoteliales de tejido periodontal inflamado proveniente de biopsias humanas. A su vez, a partir del líquido crevicular que se acumula en las bolsas periodontales de estos pacientes, determinaron la presencia de AEA en una concentración promedio de 4,63 µg/ml. En ese mismo trabajo, realizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR), determinaron la expresión de los ARN mensajeros que codifican para CB1r en fibroblastos gingivales humanos (FGH) provenientes de pacientes sanos, y que tal expresión se vio incrementada en pacientes con gingivitis y más aún en pacientes con periodontitis. En el caso de los CB2r, prácticamente no se detectó expresión en FGH de pacientes sanos, pero sí en paciente con gingivitis, en tanto que el incremento de la expresión fue muy importante en pacientes con periodontitis. Cuando estudiaron el grado de expresión proteica de CB1r y CB2r en FGH por la técnica de Western blot en los distintos grupos de pacientes, observaron un incremento de la expresión de ambos receptores conforme se agravaba la enfermedad.

Los resultados de Nakajima et al., nos motivaron a desarrollar un protocolo experimental para intentar estudiar el potencial terapéutico del tratamiento con

ligandos de receptores de cannabinoides en ratas sometidas a periodontitis experimental (PE). En un principio, comenzamos realizando pruebas piloto con AEA y su análogo sintético no hidrolizable, la meta-AEA, en ratas sometidas a PE inducida mediante la colocación de una ligadura de algodón alrededor de los primeros molares inferiores de la rata durante 7 y 14 días. Sin embargo, no obtuvimos resultados satisfactorios dado que la ligadura no solo acumula bacterias periodonto-patogénicas, sino que adicionalmente genera un efecto traumático lesivo sobre los tejidos periodontales que es muy difícil de contrarrestar con un tratamiento farmacológico local. Por lo tanto, recurrimos a la literatura en busca de un modelo de PE más receptivo a la modulación farmacológica local. Fue así que descubrimos los trabajos de Llavaneras et al. (2001), sobre los cuales basamos la puesta a punto de nuestro propio modelo de PE inducido por la inyección gingival de LPS. El protocolo que desarrollamos consiste en inyecciones periódicas de 20µl de LPS (1mg/ml) en las encías vestibulares y linguales/palatinas de los primeros molares y en el espacio interdental entre el primer y el segundo molar de ambos lados, de los maxilares superiores e inferiores, en los días 1, 3 y 5 de cada semana, durante 6 semanas (Figura 1). Por su parte, los tratamientos con ligandos de receptores de cannabinoides consistieron en una aplicación tópica diaria de las drogas de estudio, embebidas en una torunda de algodón, durante las 6 semanas que dura el experimento.

Existe amplia evidencia que muestra que los endocannabinoides y sus receptores están implicados en el metabolismo óseo, regulando los procesos de remodelación (Bab y Zimmer, 2008). A su vez, se ha informado que los CB2r se expresan en osteoblastos, osteocitos y osteoclastos; y que estas células sintetizarían endocannabinoides. Los cannabinoides también promueven la proliferación de FGH a través de CB1r y CB2r en procesos de cicatrización periodontal y, por lo tanto, puede suponerse que el SEC tenga un papel modulador importante en dichos procesos (Kozono et al., 2010). Partiendo de la premisa que ciertas células del ligamento periodontal pueden diferenciarse en osteoblastos, extractos de ligamento periodontal de piezas dentarias extraídas de humanos fueron tratados con HU308, un agonista altamente selectivo de CB2r. El resultado fue un incremento en la expresión de genes osteogénicos y una disminución de la expresión de los osteoclastogénicos (Qian et al., 2010). Adicionalmente, el tratamiento con HU308 produjo un incremento de la mineralización de células de ligamento periodontal humano. Por otro lado, otros tratamientos con agonistas de CB2r han mostrado disminuir la pérdida ósea asociada a osteoporosis y a cáncer de hueso (Lozano-Ondoua et al., 2010). A pesar de la existencia de trabajos que reportan la participación del SEC en procesos patológicos orales basados

Procedimiento experimental

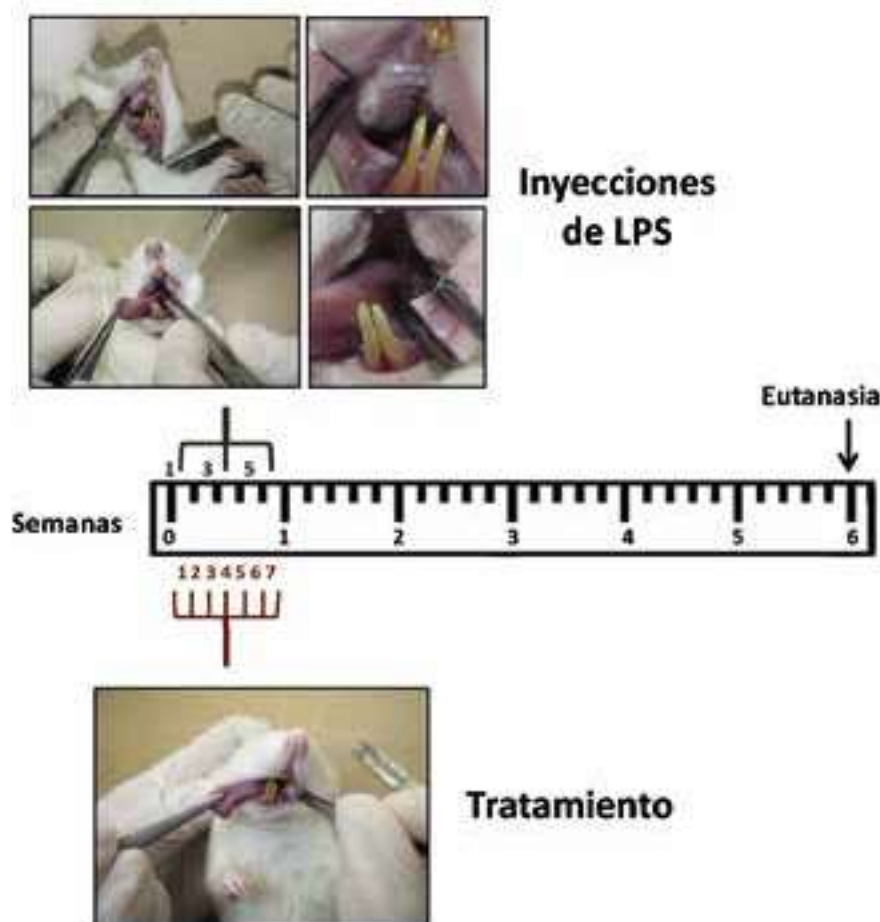


FIGURA 1. Esquema del procedimiento experimental de periodontitis inducida por LPS y de los tratamientos con ligandos de receptores del SEC. En la parte superior se observan las inyecciones gingivales de LPS en la encía vestibular y lingual/palatina del primer molar y en el espacio interdental entre el primer y segundo molar de ambos lados de los maxilares. En el sector medio, el esquema temporal del experimento que incluye inducción de PE con inyecciones de LPS los días 1, 3 y 5 de cada semana durante 6 semanas, el tratamiento diario con los ligandos y la eutanasia de los animales cumplidas las 6 semanas. En la parte inferior, el tratamiento diario con los ligandos del SEC

en estudios in vitro, nuestro grupo de trabajo fue pionero en el estudio de la manipulación farmacológica del SEC para tratar patologías periodontales in vivo.

TRATAMIENTOS DE LA PERIODONTITIS CON LIGANDOS DE RECEPTORES DE CANNABINOIDES

Nuestro grupo ha reportado el efecto protector de dos agonistas sintéticos para receptores específicos de cannabinoides y de un antagonista del receptor TRPV1 (sobre el cual actúa la AEA de forma inespecífica) administrados diariamente en forma tópica durante 6 semanas a ratas sometidas a PE inducida por LPS. A su vez, reportamos el efecto deletéreo adicional que produce el tratamiento con antagonistas altamente selectivos de CB1r y CB2r en ratas paralelamente sometidas a PE, sustentando la participación del SEC tanto en el control de la salud como en la fisiopatología de los tejidos periodontales. A continuación, se describen los resultados obtenidos con cada tipo de tratamiento:

TRATAMIENTO CON METANANDAMIDA (META-AEA), UN AGONISTA ALTAMENTE SELECTIVO DE CB1R.

Aunque tanto los CB1r como los CB2r se expresan en los tejidos periodontales, en primera instancia, nuestro grupo de investigación decidió estudiar los efectos mediados por CB1r. Para este propósito, seleccionamos un análogo de AEA, altamente selectivo para CB1r, la meta-AEA, que tiene una afinidad cuatro veces mayor para este receptor que la propia AEA y que además tiene una alta resistencia a la hidrólisis enzimática (Abadji et al., 1994).

En estudios in vitro demostramos que la producción de $\text{TNF}\alpha$ y de PGE_2 inducida por LPS ($10 \mu\text{g/ml}$) sobre extractos de tejido gingival proveniente de ratas sanas fue prevenido, al menos parcialmente, con la adición de Meta-AEA (10^{-9} M) a los medios de incubación (Ossola et al., 2012).

En estudios in vivo, la aplicación tópica diaria de Meta-AEA (500 ng/ml) en ratas sometidas a PE inducida por LPS atenuó parcialmente la pérdida ósea provocada experimentalmente sobre los primeros molares

inferiores, tanto en el sector lingual como en el vestibular (Tabla 1 y Figura 2). Este parámetro fue determinado utilizando un calibre digital a partir de la suma de las distancias entre el límite amelo-cementario y la cresta ósea alveolar (LAC-CA) de las raíces mesial, medial y distal, de las dos caras de los primeros molares. Adicionalmente, la pérdida ósea alveolar a nivel de las tablas externas fue evaluada a partir de la medición del ancho del hueso alveolar del maxilar inferior, utilizando el mismo calibre digital para medir la distancia entre la tabla vestibular y la lingual, a ni-

vel de la raíz mesial. El resultado observado fue que las ratas sometidas a PE inducida por LPS mostraron una disminución del ancho del hueso alveolar en la zona estudiada, mientras que las ratas tratadas con meta-AEA mostraron una prevención parcial de dicho efecto deletéreo (Tabla 1).

El análisis del tejido gingival asociado a los molares comprometidos demostró que el tratamiento diario con meta-AEA previno, al menos parcialmente, el incremento de la actividad de la enzima NOSi y del contenido de $\text{TNF-}\alpha$ estimulados por LPS, aunque no mos-

POA Macroscópica			Control	LPS	LPS + MAEA
Distancias en 1er molar inferior (mm)	LAC-CA	Lingual	2.565±0.005a	5.450±0.207b	4.797±0.113 c
		Vestibular	1.683±0.186a	3.220±0.246b	2.523±0.068 c
	V-L a nivel de raíz mesial		2.640±0.040a	2.380±0.070b	2.500±0.050c

TABLA 1. Efecto del tratamiento tópico diario con MAEA (500 ng/ml) sobre la pérdida ósea alveolar medida a nivel de las tablas externas asociadas al primer molar inferior como la suma de las distancias entre el límite amelo-cementario (LAC) y la cresta alveolar (CA) de las raíces mesial, medial y distal linguales y vestibulares, y la distancia entre la tabla vestibular (V) y la lingual (L) a nivel de la raíz mesial del primer molar.

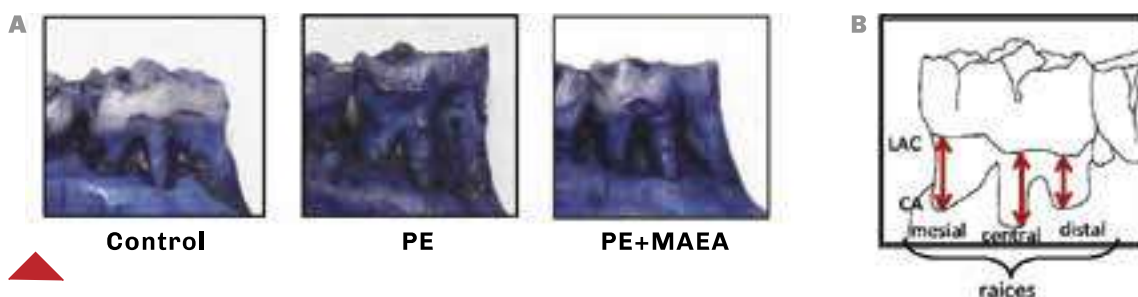


FIGURA 2. A. Fotografías de la cara lingual del maxilar inferior de ratas control, con periodontitis experimental (PE) y con PE pero tratadas con metanandamida (MAEA). B. Representación del método de la distancia LAC-CA para determinar pérdida ósea alveolar en las tablas externas.

POA Macroscópica			Control	LPS	LPS + HU308
Distancias en 1er molar inferior (mm)	LAC-CA	Lingual	2.396±0.097a	4.076±0.197b	3.483±0.170c
		Vestibular	0.962±0.065a	1.620±0.094b	1.333±0.087c
	V-L a nivel de raíz mesial		2.620±0.070 a	2.450±0.086 b	2.610±0.070a

TABLA 2. Efecto del tratamiento tópico diario con HU308 (500 ng/ml) sobre la pérdida ósea alveolar medida a nivel de las tablas externas asociadas al primer molar inferior como la suma de las distancias entre el límite amelo-cementario (LAC) y la cresta alveolar (CA) de las raíces mesial, medial y distal linguales y vestibulares, y la distancia entre la tabla vestibular (V) y la lingual (L) a nivel de la raíz mesial del primer molar.

tró efecto significativo sobre la producción de PGE2 incrementada por la endotoxina (Ossola et al., 2012). Cabe destacar que, al disminuir los parámetros inflamatorios mencionados, disminuye su efecto deletéreo sobre los tejidos periodontales.

TRATAMIENTO CON HU308, UN AGONISTA ALTAMENTE SELECTIVO DE CB2

El tratamiento con HU308, un cannabinoide sintético altamente selectivo para CB2r, previno la pérdida ósea alveolar inducida por LPS a nivel de las tablas alveolares externas de forma más completa que la observada en estudios previos con meta-AEA, esto fue observado especialmente con la medición de la distancia vestíbulo lingual a nivel de la raíz mesial del primer molar inferior (Tabla 2 y Figura 3). Adicionalmente, la pérdida ósea inducida por PE sobre las caras vestibular y lingual se vio prevenida parcialmente en las ratas tratadas con el agonista de CB2r (Ossola et al., 2016).

Con respecto a los parámetros inflamatorios gingivales, el tratamiento con HU308 previno completamente, tanto el incremento de la actividad de la NOSi, como el contenido de $\text{TNF}\alpha$ y los niveles de PGE2 incrementados por la PE inducida por la endotoxina.

Dada la eficacia del tratamiento con HU308, en este caso también se evaluó la pérdida ósea interradicu-

lar a nivel de los primeros molares inferiores, a partir de cortes histológicos mesio-distales. El estudio histomorfométrico de estos preparados mostró que las ratas sometidas a PE inducida por LPS mostraron pérdida ósea, denotada por un incremento del espacio periodontal entre la porción coronal de la raíz y el hueso alveolar, así como por una pérdida de volumen óseo en función del volumen total, en la mitad superior (o coronal) del espacio interradicular entre la raíz mesial y la distal (Figura 4). Sin embargo, las ratas sometidas a PE pero tratadas con HU308 no mostraron ningún signo de pérdida ósea con respecto a los controles, aportando mayor evidencia a favor del éxito del tratamiento.



FIGURA 3. Fotografías de la cara lingual del maxilar inferior de ratas control, con periodontitis experimental (PE) y con PE pero tratadas con HU308.

HISTOMORFOMETRÍA DEL HUESO ALVEOLAR

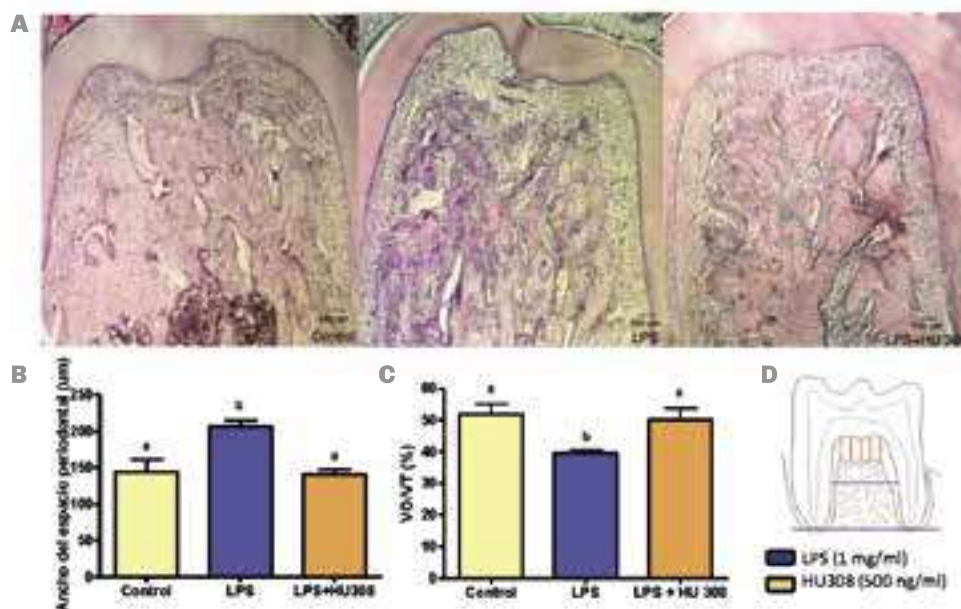


FIGURA 4. A. Microfotografías (tinción H&E; aumento original x40) que muestran las características histológicas del área interradicular mandibular del primer molar de las ratas sometidas a diferentes condiciones experimentales (control, PE y PE + HU-308). B. Evaluación del ancho del espacio periodontal. C. Porcentaje de hueso interradicular medido en la mitad coronal como volumen óseo (VO, tejido óseo) sobre volumen total (VT, representado por tejido óseo, ligamento periodontal y medula ósea). Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos. D. Representación del método para la evaluación del espacio periodontal (se promedia en valor de las transectas rojas trazadas entre el diente y el hueso) y del hueso interradicular (se evalúa VO/VT en %).

TRATAMIENTO CON CAPSAZEPINA, UN ANTAGONISTA DE TRPV1

Es sabido que el SEC, además de poseer los receptores específicos CB1r y CB2r, también interactúa con otros receptores inespecíficos como el TRPV1 que median algunos de los efectos de los endocannabinoides (Ossola et al., 2019). El TRPV1 es un canal catiónico no selectivo que se activa de forma exógena por la capsaicina, resiniferatoxina y algunas toxinas (Iadarola et al., 2018; Bohlen et al., 2010). Endógenamente, el TRPV1 se abre principalmente en respuesta a temperaturas elevadas (mayores a 43°C), a acidez, o a los ligandos N-araquidonoil dopamine, N-oleoil dopamine, y al endocannabinoide AEA (Szallasi y Blumberg, 1999; Van Der Stelt y Di Marzo, 2004). TRPV1 se encuentra principalmente en las neuronas nociceptivas del sistema nervioso periférico, pero también se ha descrito en muchos otros tejidos, incluidos los fibroblastos gingivales y las células del ligamento periodontal (López-González et al., 2017; Son et al., 2015). TRPV1 participa en la transmisión y modulación del dolor, es principalmente permeable a Ca^{2+} , y se ha demostrado que regula la vasodilatación, la respuesta inflamatoria y la osteogénesis (Cui et al., 2006; Wang et al., 2010). Además, tanto TRPV1 como TLR4 (recep-

tor de LPS) han sido asociados a enfermedades periodontales a partir de estudios realizados en muestras de tejido humano (Oztürk y Yildiz, 2011).

Nuestros resultados demostraron que el tratamiento diario consistente en la aplicación del antagonista específico del TRPV1 Capsazepina (Capz, 2 µg/ml) durante 6 semanas, previno el daño periodontal inducido por LPS sobre los primeros molares inferiores (Tabla 3). Este tratamiento no solo previno parcialmente la pérdida ósea alveolar inducida por la PE, medida por los métodos de las distancias LAC-CA y vestibulo-lingual, sino que también previno completamente los incrementos gingivales de $\text{TNF-}\alpha$ y PGE2 inducidos por la aplicación de la endotoxina. Adicionalmente, el hueso alveolar asociado a los primeros molares inferiores fue evaluado por medio de microfotografías. El tratamiento con Capz previno completamente la reducción del volumen del hueso interradicular inducida por PE y evidenciada tanto por el incremento del ancho del espacio periodontal como por disminución del área de hueso alveolar (VO/VT) con respecto a los controles. Más aún, la menor cantidad de superficies resorptivas en el grupo tratado con Capz aporta evidencia adicional a favor del efecto osteo-protector del tratamiento con Capz en ratas con PE.

POA Macroscópica			Control	LPS	LPS + CAPZ
Distancias en 1er molar inferior (mm)	LAC-CA	Lingual	2.716 ± 0.189a	3.412 ± 0.224b	2.962 ± 0.114c
		Vestibular	1.258 ± 0.233a	1.724 ± 0.136b	1.430 ± 0.222c
	V-L a nivel de raíz mesial		2.170 ± 0.070a	2.040 ± 0.020b	2.110 ± 0.050c

TABLA 3. Efecto del tratamiento tópico diario con Capsazepina (CAPZ) (2 µg/ml) sobre la pérdida ósea alveolar medida a nivel de las tablas externas asociadas al primer molar inferior como la suma de las distancias entre el límite amelo-cementario (LAC) y la cresta alveolar (CA) de las raíces mesial, medial y distal linguales y vestibulares, y la distancia entre la tabla vestibular (V) y la lingual (L) a nivel de la raíz mesial del primer molar.

POA Macroscópica			Control	LPS	LPS + AM251 + AM630
Distancias en 1er molar inferior (mm)	LAC-CA	Lingual	2.360±0.480a	3.667±0.670b	4.353±0.419c
		Vestibular	1.298±0.226a	1.690±0.214b	1.935±0.179c
	V-L a nivel de raíz mesial		2.536±0.047a	2.446±0.086b	2.354±0.053c

TABLA 4. Efecto del tratamiento tópico diario con un coctel de AM251 (2 µg/ml) y AM630 (1 µg/ml), sobre la pérdida ósea alveolar medida a nivel de las tablas externas asociadas al primer molar inferior como la suma de las distancias entre el límite amelo-cementario (LAC) y la cresta alveolar (CA) de las raíces mesial, medial y distal linguales y vestibulares, y la distancia entre la tabla vestibular (V) y la lingual (L) a nivel de la raíz mesial del primer molar.

TRATAMIENTO CON AM251 Y AM630, ANTAGONISTAS ESPECÍFICOS DE CB1R Y CB2R

En última instancia, realizamos experimentos en los cuales, ratas sometidas a PE fueron tratadas con un cóctel conformado por los antagonistas de CB1r (AM251, 2 µg/ml) y CB2 (AM630, 1 µg/ml), respectivamente. Luego de 6 semanas de tratamiento, se observó un aumento de la pérdida ósea alveolar medida en los maxilares inferiores en comparación con ratas sometidas a PE pero sin tratamiento adicional. Este hallazgo fue observado en las caras vestibular y lingual por medio del método de la distancia LAC-CA y reveló un daño exacerbado en el hueso alveolar circundante como consecuencia del bloqueo de CB1r y CB2r (Tabla 4). Además, la medición del ancho del hueso alveolar asociado al primer molar inferior mostró valores menores en el grupo de antagonistas con respecto a ratas con PE no tratadas. Este mayor adelgazamiento del hueso alveolar confirma el daño óseo aditivo del tratamiento con los antagonistas en ratas sometidas a PE.

El hueso interradicular del primer molar inferior fue evaluado por medio de microfotografías, sin embargo, dicho análisis no evidenció resultados completamente concluyentes respecto a la acción del tratamiento con el cóctel de antagonistas. Mientras el ancho del espacio periodontal aumentó con el tratamiento con los antagonistas en comparación con las ratas con PE no tratadas, la evaluación VO/VT no cambió significativamente.

Por su parte, la aplicación local de los AM251 y AM630 produjo un efecto aditivo al producido por la PE sobre el contenido gingival de TNF α . Sin embargo, el contenido gingival de PGE2 no cambió significativamente en respuesta a la aplicación los antagonistas con respecto a ratas con PE no tratadas.

PERSPECTIVAS FUTURAS

En los últimos años se han desarrollado fármacos que modulan al SEC tales como el URB597, un compuesto desarrollado como inhibidor selectivo de la FAAH, que constituye la principal enzima que degrada la AEA (Alexander y Cravatt, 2005). La inhibición de esta enzima conduce a la acumulación del endocannabinoide tanto en el SNC como en la periferia, incrementando la actividad de los receptores sobre los que actúa. Resultados recientes nos indican que el tratamiento diario con URB597 (20 µg/ml) atenúa la pérdida ósea alveolar inducida por PE. Por su parte, el JZL184 ha sido desarrollado como un inhibidor irreversible de la MAGL, enzima que degrada 2-AG (Pan et al., 2009) y el JZL195 como un inhibidor dual de la degradación de AEA y 2-AG (Leonard et al., 2017). Estas drogas podrían constituir elementos promisorios para ser estudiados como potenciales herramientas terapéuticas para tratar la periodontitis mediante la modulación del SEC. Por otro lado, existen drogas que han comen-

zando a ser estudiadas para tratamientos de enfermedades inflamatorias crónicas, como la N-arachidonoil serotonina (AA-5-HT) y el OMDM198, que tienen la ventaja de actuar incrementando la biodisponibilidad de AEA (inhibiendo su degradación) al mismo tiempo que son antagonistas de TRPV1, es decir que podrían disparar los mecanismos antiinflamatorios mediados por AEA, al mismo tiempo que bloquean la vía proinflamatoria mediada por los canales TRPV1 (De Filippis et al., 2010). Por lo tanto, AA-5-HT y OMDM198 se postulan como drogas interesantes para ser estudiadas como coadyuvantes para tratar la periodontitis dado su doble acción antiinflamatoria. De hecho, trabajos recientes han demostrado resultados satisfactorios con OMDM198 actuando sobre dos blancos para el tratamiento de una enfermedad de etiología compleja como lo es la osteoartritis (Mlost et al., 2018).

La mayoría de los estudios realizados hasta la fecha con drogas que modulan el SEC, tanto in vitro como in vivo, fueron realizados en el plano experimental. La aspiración de quienes trabajamos con el SEC como blanco terapéutico para el tratamiento de patologías inflamatorias, es que en un futuro cercano se estudien las posibilidades concretas de su aplicación en humanos, como por ejemplo para tratar la enfermedad periodontal, evaluando la acción terapéutica combinada con el tratamiento regular, ajustando las dosis de tratamiento, la forma de administración, y por supuesto, los posibles efectos secundarios.

CONCLUSIONES

En los últimos años, muchos estudios se han centrado en la investigación del SEC y su implicación en las enfermedades inmunes e inflamatorias, incluida la enfermedad periodontal (Szabady et al., 2018; Konermann et al., 2017; Özdemir et al., 2014). Sin embargo, la mayoría de estos estudios han sido realizados utilizando cultivos celulares de fibroblastos o de células de ligamento periodontal (Rawal et al., 2012). Nuestro grupo de investigación reportó por primera vez in vivo los efectos antiinflamatorios y osteo-protectores de la manipulación farmacológica del SEC sobre el tejido gingival y el hueso alveolar afectados por PE en animales de laboratorio. El menor efecto deletéreo sobre el hueso después de los tratamientos se sustenta en los resultados obtenidos por medio de evaluaciones macroscópicas y del análisis histomorfométrico en el hueso interradicular. Con respecto a los mediadores inflamatorios incrementados durante la periodontitis, pero disminuidos por los tratamientos, PGE2 y TNF- α han sido reportados como dos de los principales mediadores involucrados en la actividad resorptiva ósea, principalmente a través de la modulación de RANK, RANKL y la función de osteoclastica (Shoji et al., 2007; Roberts et al., 1997). Además, está extensamente demostrado que la reducción de sus niveles en los tejidos periodontales mediante el uso de

agentes antiinflamatorios está ligado a la atenuación de la pérdida ósea alveolar asociada a periodontitis (Ossola et al., 2016; Rettori et al., 2012).

Nuestros resultados demuestran que la activación de CB1r, la de CB2r, y el bloqueo TRPV1 atenúan la inflamación en el tejido gingival y previenen la pérdida ósea alveolar en ratas con PE inducida por LPS, contrariamente a lo que ocurre con el bloqueo de los CB1r y CB2r, que exacerba el daño de los tejidos periodontales en tales condiciones. Por lo tanto, estos hallazgos apoyan la hipótesis de que los receptores específicos de cannabinoides mediarían los efectos antiinflamatorios y protectores en los tejidos periodontales, mientras que TRPV1 mediarían los efectos proinflamatorios que conducen al daño periodontal. Nuestros resultados sientan bases para estudios adicionales que incluyan evaluaciones de efectos secundarios, para considerar la manipulación farmacológica del SEC como blanco para mejorar las consecuencias nocivas de la enfermedad periodontal en poblaciones humanas. Estos tratamientos, al ser locales, cuentan con la ventaja de que una dosis adecuada podría ser efectiva en su propósito y al mismo tiempo evitar posibles efectos sistémicos indeseados.

REFERENCIAS

- Abadji V, Lin S, Taha G, Griffin G, Stevenson LA, Pertwee RG y Makriyannis A. (1994). (R)-methanandamide: a chiral novel anandamide possessing higher potency and metabolic stability. *J Med Chem*, 37(12), 1889–1893. <https://doi.org/10.1021/jm00038a020>
- Ahn K, McKinney MK y Cravatt BF. (2008). Enzymatic pathways that regulate endocannabinoid signaling in the nervous system. *Chem Rev*, 108(5), 1687–1707. <https://doi.org/10.1021/cr0782067>
- Alexander JP y Cravatt BF. (2005). Mechanism of carbamate inactivation of FAAH: implications for the design of covalent inhibitors and in vivo functional probes for enzymes. *Chem Biol*, 12(11), 1179–1187. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2005.08.011>
- Ambrósio LM, Rovai ES, França BN, et al. (2017). Effects of periodontal treatment on primary sjögren's syndrome symptoms. *Braz Oral Res*, 16(31): e8. <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2017.vol31.0008>
- Bab I y Zimmer A. (2008). Cannabinoid receptors and the regulation of bone mass. *Br J Pharmacol*, 153(2), 182–188. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707593>
- Bohlen CJ, Priel A, Zhou S, King D, Siemens J y Julius D. (2010). A bivalent tarantula toxin activates the capsaicin receptor, TRPV1, by targeting the outer pore domain. *Cell*, 141(5), 834–845. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.052>
- Brennan PA, Thomas GJ y Langdon JD. (2003). The role of nitric oxide in oral diseases. *Arch Oral Biol*, 48(2), 93–100. [https://doi.org/10.1016/s0003-9969\(02\)00183-8](https://doi.org/10.1016/s0003-9969(02)00183-8)
- Cui M, Honore P, Zhong C, et al. (2006). TRPV1 receptors in the CNS play a key role in broad-spectrum analgesia of TRPV1 antagonists. *J Neurosci*, 26(37), 9385–9393. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1246-06.2006>
- Davé S y Van Dyke T. (2008). The link between periodontal disease and cardiovascular disease is probably inflammation. *Oral Dis*, 14(2), 95–101. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2007.01438.x>
- De Filippis D, D'Amico A, Cipriano M, et al. (2010). Levels of endocannabinoids and palmitoylethanolamide and their pharmacological manipulation in chronic granulomatous inflammation in rats. *Pharmacol Res*, 61(4), 321–328. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.11.005>
- Fernandez-Solari J, Prestifilippo JP, Ossola CA, Rettori V y Elverdin JC. (2010). Participation of the endocannabinoid system in lipopolysaccharide-induced inhibition of salivary secretion. *Arch Oral Biol*, 55(8), 583–590. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2010.05.006>
- Fine PG y Rosenfeld MJ. (2013). The endocannabinoid system, cannabinoids, and pain. *Rambam Maimonides Med J*, 4(4), e0022. <https://doi.org/10.5041/RMMJ.10129>
- Iadarola MJ, Sapio MR, Raithel SJ, Mannes AJ y Brown DC. (2018). Long-term pain relief in canine osteoarthritis by a single intraarticular injection of resiniferatoxin, a potent TRPV1 agonist. *Pain*, 159(10), 2105–2114. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001314>
- Kohnz RA y Nomura DK. (2014). Chemical approaches to therapeutically target the metabolism and signaling of the endocannabinoid 2-AG and eicosanoids. *Chem Soc Rev*, 43(19), 6859–6869. <https://doi.org/10.1039/c4cs00047a>

- Konermann A, Jäger A, Held SAE, Brossart P y Schmölle A. (2017). In vivo and in vitro identification of endocannabinoid signaling in periodontal tissues and their potential role in local pathophysiology. *Cell Mol Neurobiol*, 37(8), 1511–1520. <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0482-4>
- Kozono S, Matsuyama T, Biwasa KK, et al. (2010). Involvement of the endocannabinoid system in periodontal healing. *Biochem Biophys Res Commun*, 394(4), 928–933. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.03.080>
- Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. (1998). Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 93(2), 165–176. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81569-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81569-x)
- Lappin DF, Kjeldsen M, Sander L y Kinane DF. (2000). Inducible nitric oxide synthase expression in periodontitis. *J Periodontol Res*, 35(6), 369–373. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0765.2000.035006369.x>
- Leonard MZ, Alapafuja SO, Ji L, et al. (2017). Cannabinoid CB1 Discrimination: Effects of Endocannabinoids and Catabolic Enzyme Inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther*, 363(3), 314–323. <https://doi.org/10.1124/jpet.117.244392>
- Liu C, Qi X, Yang D, Neely A y Zhou Z. (2019). The effects of cannabis use on oral health. *Oral Dis*, Dec 2, 1–9. <https://doi.org/10.1111/odi.13246>
- Llavaneras A, Ramamurthy NS, Heikkilä P, et al. (2001). A combination of a chemically modified doxycycline and a bisphosphonate synergistically inhibits endotoxin-induced periodontal breakdown in rats. *J Periodontol*, 72(8), 1069–1077. <https://doi.org/10.1902/jop.2001.72.8.1069>
- López-González MJ, Luis E, Fajardo O, et al. (2017). TRPA1 channels mediate human gingival fibroblast response to phenytoin. *J Dent Res*, 96(7), 832–839. <https://doi.org/10.1177/0022034517695518>
- Lozano-Ondoua AN, Wright C, Vardanyan A, et al. (2010). A cannabinoid 2 receptor agonist attenuates bone cancer-induced pain and bone loss. *Life Sci*, 86(17-18), 646–653. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.02.014>
- Mlost J, Kostrzewa M, Malek N y Starowicz K. (2018). Molecular understanding of the activation of CB1 and blockade of TRPV1 receptors: implications for novel treatment strategies in osteoarthritis. *Int J Mol Sci*, 19(2), 342. <https://doi.org/10.3390/ijms19020342>
- Nagarkatti P, Pandey R, Rieder SA, Hegde VL y Nagarkatti M. (2009). Cannabinoids as novel anti-inflammatory drugs. *Future Med Chem*, 1(7), 1333–1349. <https://doi.org/10.4155/fmc.09.93>
- Nagasawa T, Kiji M, Yashiro R, et al. (2007). Roles of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin in periodontal health and disease. *Periodontol 2000*, 43(1), 65–84. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2006.00185.x>
- Nakajima Y, Furuichi Y, Biswas KK, et al. (2006). Endocannabinoid, anandamide in gingival tissue regulates the periodontal inflammation through NF- κ B pathway inhibition. *FEBS Lett*, 580(2), 613–619. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.12.079>
- Napimoga MH, Benatti BB, Lima FO, et al. (2009). Cannabidiol decreases bone resorption by inhibiting RANK/RANKL expression and pro-inflammatory cytokines during experimental periodontitis in rats. *Int Immunopharmacol*, 9(2), 216–222. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2008.11.010>
- O'Gradaigh D, Ireland D, Bord S y Compston JE. (2004). Joint erosion in rheumatoid arthritis: interactions between tumour necrosis factor α , interleukin 1, and receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) regulate osteoclasts. *Ann Rheum Dis*, 63(4), 354–359. <https://doi.org/10.1136/ard.2003.008458>
- Offenbacher S, Heasman PA y Collins JG. (1993). Modulation of host PGE2 secretion as a determinant of periodontal disease expression. *J Periodontol*, 64(5 Suppl), 432–444. <https://doi.org/10.1902/jop.1993.64.5s.432>
- Ossola CA, Surkin PN, Pugnali A, Mohn CE, Elverdin JC y Fernández-Solari J. (2012). Long-term treatment with methanandamide attenuates LPS-induced periodontitis in rats. *Inflamm Res*, 61(9), 941–948. <https://doi.org/10.1007/s00011-012-0485-z>
- Ossola CA, Surkin PN, Mohn CE, Elverdin JC y Fernández-Solari J. (2016). Anti-inflammatory and osteoprotective effects of cannabinoid-2 receptor agonist HU-308 in a rat model of lipopolysaccharide-induced periodontitis. *J Periodontol*, 87(6), 725–734. <https://doi.org/10.1902/jop.2016.150612>
- Ossola CA, Balcarcel NB, Astrauskas JI, Bozzini C, Elverdin JC y Fernández-Solari J. (2019). A new target to ameliorate the damage of periodontal disease: The role of transient receptor potential vanilloid type-1 in contrast to that of specific cannabinoid receptors in rats. *J Periodontol*, 90(11), 1325–1335. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0766>

Özdemir B, Shi B, Bantleon HP, Moritz A, Rausch-Fan X y Andrukhov O. (2014). Endocannabinoids and inflammatory response in periodontal ligament cells. *PLoS One*, 9(9), e107407. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107407>

Oztürk A y Yildiz L. (2011). Expression of transient receptor potential vanilloid receptor 1 and toll-like receptor 4 in aggressive periodontitis and in chronic periodontitis. *J Periodontol Res*, 46(4), 475–482. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2011.01363.x>

Page RC. (1991). The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol Res*, 26(3 Pt 2), 230–242. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1991.tb01649.x>

Pan B, Wang W, Long JZ, Sun D, Hillard CJ, Cravatt BF y Liu QS. (2009). Blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis by selective monoacylglycerol lipase inhibitor 4-nitrophenyl 4-(dibenzo[d][1,3]dioxol-5-yl(hydroxy)methyl)piperidine-1-carboxylate (JZL184) Enhances retrograde endocannabinoid signaling. *J Pharmacol Exp Ther*, 331(2), 591–597. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.158162>

Park JE, Abrams MJ, Efron PA y Barbul A. (2013). Excessive nitric oxide impairs wound collagen accumulation. *J Surg Res*, 183(1), 487–492. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2012.11.056>

Preshaw PM y Heasman PA. (2002). Prostaglandin E2 concentrations in gingival crevicular fluid: observations in untreated chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, 29(1), 15–20. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051x.2002.290103.x>

Prestifilippo JP, Fernández-Solari J, de la Cal C, Iribarne M, Suburo AM, Rettori V, McCann SM y Elverdin JC. (2006). Inhibition of salivary secretion by activation of cannabinoid receptors. *Exp Biol Med (Maywood)*, 231(8), 1421–1429. <https://doi.org/10.1177/153537020623100816>

Pussinen PJ, Tuomisto K, Jousilahti P, Havulinna AS, Sundvall J y Salomaa V. (2007). Endotoxemia, immune response to periodontal pathogens, and systemic inflammation associate with incident cardiovascular disease events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27(6), 1433–1439. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.106.138743>

Qian H, Zhao Y, Peng Y, et al. (2010). Activation of cannabinoid receptor CB2 regulates osteogenic and osteoclastogenic gene expression in human periodontal ligament cells. *J Periodontol Res*, 45(4), 504–511. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2009.01265.x>

Rawal SY, Dabbous MK y Tipton DA. (2012). Effect of cannabidiol on human gingival fibroblast extracellular matrix metabolism: MMP production and activity, and production of fibronectin and transforming growth factor β . *J Periodontol Res*, 47(3), 320–329. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2011.01435.x>

Rettori E, De Laurentiis A, Zorrilla Zubilete M, Rettori V y Elverdin JC. (2012). Anti-inflammatory effect of the endocannabinoid anandamide in experimental periodontitis and stress in the rat. *Neuroimmunomodulation*, 19(5), 293–303. <https://doi.org/10.1159/000339113>

Roberts F, McCaffery K y Michalek S. (1997). Profile of cytokine mRNA expression in chronic adult periodontitis. *J Dent Res*, 76(12), 1833–1839. <https://doi.org/10.1177/00220345970760120501>

Saura M, Tarin C y Zaragoza C. (2010). Recent insights into the implication of nitric oxide in osteoblast differentiation and proliferation during bone development. *ScientificWorldJournal*, 10, 624–632. <https://doi.org/10.1100/tsw.2010.58>

Shoji M, Tanabe N, Mitsui N, et al. (2007). Lipopolysaccharide enhances the production of nicotine-induced prostaglandin E2 by an increase in cyclooxygenase-2 expression in osteoblasts. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 39(3), 163–172. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00271.x>

Slots J. (2017). Periodontitis: facts, fallacies and the future. *Periodontol* 2000, 75(1), 7–23. <https://doi.org/10.1111/prd.12221>

Son GY, Hong JH, Chang I y Shin DM. (2015). Induction of IL-6 and IL-8 by activation of thermosensitive TRP channels in human PDL cells. *Arch Oral Biol*, 60(4), 526–532. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.12.014>

Suda K, Udagawa N, Sato N, Takami M, Itoh K, et al. (2004). Suppression of osteoprotegerin expression by prostaglandin E2 is crucially involved in lipopolysaccharide-induced osteoclast formation. *J Immunol*, 172(4), 2504–2510. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.4.2504>

Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT y Martin TJ. (1999). Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev*, 20(3), 345–357. <https://doi.org/10.1210/edrv.20.3.0367>

Szabady RL, Louissaint C, Lubben A, et al. (2018). Intestinal P-glycoprotein exports endocannabinoids to prevent inflammation and maintain homeostasis. *J Clin Invest*, 128(9), 4044–4056. <https://doi.org/10.1172/JCI96817>

Szallasi A y Blumberg PM. (1999). Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev*, 51(2), 159–212.

Udagawa N, Takahashi N, Jimi E, et al. (1999). Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor. *Bone*, 25(5), 517–523. [https://doi.org/10.1016/s8756-3282\(99\)00210-0](https://doi.org/10.1016/s8756-3282(99)00210-0)

Van Der Stelt M y Di Marzo V. (2004). Endovanilloids. Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. *Eur J Biochem*, 271(10), 1827–1834. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04081.x>

Wang L, Shi X, Zhao R, et al. (2010). Calcitonin-gene-related peptide stimulates stromal cell osteogenic differentiation and inhibits RANKL induced NF-kappaB activation, osteoclastogenesis and bone resorption. *Bone*, 46(5), 1369–1379. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.11.029>

Dirección para correspondencia

Cátedra de Fisiología
Facultad de Odontología
Universidad de Buenos Aires
Marcelo T de Alvear 2142, Piso 3° A
Ciudad Autónoma de Buenos Aires, C1122AAH
javier.fernandezsolari@odontologia.uba.ar

