



Universidad de Concepción

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

**Evaluación de la presencia y actividad del sistema
endocannabinoide, y los receptores PPAR y
TRPV1 en el proceso de neurulación de *X. laevis***

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la
Universidad de Concepción para optar al título profesional de Biólogo

Por Angel Javier Torres Toro

Prof. Guía Dr. Patricio Alejandro Castro Maldonado

Prof. Co-guía Dr. Carlos Felipe Burgos Arias

Mayo 2024

Concepción, Chile

HOJA DE FIRMAS

Profesor Guía

Dr. Patricio Castro Maldonado

Departamento de Fisiología

Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía

Dr. Carlos Burgos Arias

Departamento de Fisiología

Universidad de Concepción

Profesores Evaluadores

Dra. Marcela Torrejón Quezada

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Universidad de Concepción

Dr. Fernando Sepúlveda Briceño

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Universidad de Concepción

AGRADECIMIENTOS

Me es difícil expresar en palabras la gratitud que siento al momento de escribir este texto. Me gustaría comenzar por agradecer al Dr. Patricio Castro, primeramente, por permitirme ingresar al Departamento de Fisiología y formar parte de su laboratorio, por su buena disposición al enseñarme, por los innumerables consejos e ideas que compartió conmigo y por su puesto por guiarme durante todo este proceso, así también quiero agradecer al Dr. Carlos Felipe Burgos, por guiarme y enseñarme sobre bioinformática, por su paciencia, tiempo y consejos en las incontables reuniones que tuvimos.

Me gustaría agradecer a la Dra. Marcela Torrejón y al Dr. Fernando Sepúlveda por su exigencia y sugerencias en las distintas etapas de evaluación.

Agradezco a mis compañeros de LAND, a Claudio, a Nicolas, a Gloria y a los diversos Tecnólogos/as médico que pasaron por el laboratorio, por ayudarme en los experimentos, por sus consejos o tips de trabajo, por las alegrías y momentos compartidos.

Quiero agradecer a mi grupo familiar, a mi hermano Dante, mi madre Jacqueline y mi padre Claudio por siempre apoyarme, a lo largo de toda mi formación universitaria, a pesar de la distancia y los problemas, siempre estuvieron para mí.

Indudablemente quiero agradecer a los amigos y amigas que formé a lo largo de la carrera (curiosamente la mayoría perteneciente al laboratorio de Fitoquímica), por los distintos momentos compartidos, de penas y glorias, de risas y llantos, de aventuras y desventuras, sinceramente significan mucho para mí.

También agradezco a Felipe, Enzo y Marcelo, que, aunque pasaran meses sin vernos, siempre me apoyaron en este proceso brindándome su amistad incondicional.

Todas mis experiencias me han llevado a donde estoy, por lo que finalmente agradezco a todas las personas con las que me vinculé y conocí durante estos 6 años.

Tabla de contenido

AGRADECIMIENTOS	3
Índice de tablas.....	6
Índice de figuras	7
Abreviaturas	9
Resumen	12
Abstract	14
I.- Introducción.....	16
1. Neurulación.....	16
2. Defectos del tubo neural	18
3. Efectos de fitocannabinoides en desarrollo embrionario.....	19
4. Sistema endocannabinoide e interacciones con Fitocannabinoides.	20
5. PPAR y TRPV1 receptores del endocannabinoide.....	25
II.- Hipótesis.....	30
III.- Objetivo general.....	30
IV.- Objetivos específicos	30
V.- Materiales y métodos.....	31
1. Manipulación de animales y técnicas embriológicas.....	31
1.1 Declaración ética y animales de experimentación.....	31
1.2 Obtención de embriones de <i>Xenopus laevis</i>	31
2. Técnicas de Biología Molecular.....	33
2.1 Extracción de ARN total.	33
2.2 Síntesis de cDNA mediante transcripción inversa.....	33
2.3 Ensayos de RT-qPCR.....	34
2.4 Electroforesis en gel de agarosa.....	36
3. Predicciones computacionales.	36
3.1 Generación de modelos predictivos de xCB1 y LBD-xPPAR α	36
3.2 Preparación del ligando.....	39
3.3 Preparación de proteínas.	39
3.4 Generación de grilla.	40

3.5 Docking proteína-ligando	41
4. Tratamientos farmacológicos	42
4.1 Evaluación fenotípica de los tratamientos farmacológicos	43
4.2 Análisis y adquisición de imágenes.	44
5. Análisis estadístico	44
VI.- Resultados	45
1. Perfil de expresión del SEC, TRPV1, PPAR α y PPAR γ en el proceso de neurulación de <i>Xenopus laevis</i>	45
2.1 Predicciones computacionales: Modelamiento molecular.	50
2.2 Simulaciones de Docking molecular y ReDockings.....	51
3. Tratamientos farmacológicos con CBD y GW6471	61
VII.- Discusión	67
1.- Perfil de expresión de componentes del endocannabinoidoma.	67
2.- Predicciones <i>in silico</i> interacciones de CBD-CB1/PPAR α y GW6471-PPAR α	69
3.- Tratamiento farmacológico con CBD afecta a la formación del tubo neural.	71
VIII.- Conclusión	74
IX.- Bibliografía	75

Índice de tablas

Tabla 1.- Lista de partidores utilizados para qRT-PCR.....	34
Tabla 2.- Información de Proteínas utilizadas en el trabajo.....	40
Tabla 3.- Porcentaje de embriones con fenotipo alterado en tratamiento con CBD en los diferentes estadios evaluados.	63
Tabla 4.- Porcentaje de embriones con fenotipo alterado en tratamiento con GW6471 en los diferentes estadios evaluados.....	64

Índice de figuras

Figura 1.- Descripción general de la neurulación primaria.....	17
Figura 2.- Resumen esquemático de la neurulación en <i>Xenopus laevis</i>	17
Figura 3.- Señalización en la sinapsis endocannabinoide.....	22
Figura 4.- Vías metabólicas implicadas en la síntesis de Anandamida (AEA).....	24
Figura 5.- Organización estructural de los PPAR.	27
Figura 6.- Desarrollo embrionario de <i>Xenopus Laevis</i>	33
Figura 7.- Alineamiento de secuencias aminoacídicas de xCB1 y hCB1...	37
Figura 8.- Alineamiento de secuencias aminoacídicas de xPPAR α y hPPAR α	37
Figura 10.- Representación esquemática del procedimiento realizado para tratamientos farmacológicos.	42
Figura 11.- Electroforesis en gel de agarosa de productos de qRT-PCR. ...	46
Figura 12.- Patrón de expresión relativa de CB1, NAPE-PLD, DAGL α , PPAR α , PPAR γ y TRPV1 en todos los templados evaluados de <i>Xenopus laevis</i>	47
Figura 13.- Patrón de expresión relativa de CB1, NAPE-PLD, DAGL α , PPAR α , PPAR γ y TRPV1 en Neurulación.....	49
Figura 14.- Modelo predictivo seleccionado de xCB1.	50
Figura 15.- Modelo predictivo seleccionado de xPPAR α -LBD.....	51
Figura 16: Acoplamiento molecular entre xCB1 unido a CBD y entre xPPAR α unido a CBD y GW6471.	53
Figura 17: Acoplamiento molecular entre hCB1 unido a CBD y xCB1 unido a CBD.....	54
Figura 18: Acoplamiento molecular entre hPPAR α unido a CBD y entre xPPAR α unido a CBD.	56
Figura 19: Gráficos de puntuación de Docking score y ΔG teórico de CBD.	57
Figura 20: Acoplamiento molecular entre hPPAR α unido a GW6471 y entre xPPAR α unido a GW6471.....	59
Figura 21.- Histogramas % fenotipo anormal en diversos estadios de desarrollo de <i>Xenopus laevis</i>	63

Figura 22: Tratamiento farmacológico con CBD y GW6471 produce DTN.
..... 65

Figura 23: Curva concentración-respuesta del porcentaje de anormalidad de
renacuajos en estadio 45 tratados con concentraciones crecientes de CBD
(1 μ M-100 μ M)..... 66

Abreviaturas

PN: Placa neural

TN: Tubo neural

DTN: Defectos del tubo neural

CBD: Cannabidiol

SNC: Sistema Nervioso Central

THC: Tetrahidrocannabinol

SEC: Sistema endocannabinoide

CB1: Receptor cannabinoide 1

CB2: Receptor cannabinoide 2

AEA: Anandamida

2-AG: 2-araquidonoilglicerol

NAPE-PLD: N-acil fosfatidiletanolamina fosfolipasa D

DAGL: Diacilglicerol lipasa

DAG: Diacilglicerol

NArPE: N-araquidonoil fosfatidiletanolamina

NAEs: N-aciletanolaminas

PEA: Palmitoiletanolamida

OEA: Oleoiletanolamida

FE: Fosfatidiletanolamina

AMPC: Adenosín monofosfato cíclico

TRPV1: Receptor de potencial transitorio sensible a la temperatura, subtipo vanilloide 1

PPAR: Receptor activado por proliferadores de peroxisomas

PPAR γ : Receptor activado por proliferadores de peroxisomas gama

DAGL α : Diacilglicerol lipasa alfa

DAGL β : Diacilglicerol lipasa beta

PPAR α : Receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa

LBD: Dominio de unión a ligando

RXR: Receptor de retinoide

PPRE: Elementos de respuesta de PPAR

CBDa: Ácido cannabidiolico

PPAR δ : Receptor activado por proliferadores de peroxisomas beta

A δ : Beta-amiloide

DRG: Ganglio de la raíz dorsal

MMR: Marc's modified Ringer's

hCG: Hormona gonadotropina coriónica humana

xCB1: Receptor cannabinoide 1 de *Xenopus*

hCB1: Receptor cannabinoide 1 de humano

xPPAR α : Receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa de *Xenopus*

hPPAR α : Receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa de humano

DMSO: Dimetilsulfóxido

E12,5: Estadio 12,5

E20: Estadio 20

E40: Estadio 40

E45: Estadio 45

Resumen

En la actualidad se ha asociado epidemiológicamente al consumo de marihuana durante la gestación, con la aparición de las principales malformaciones congénitas del Sistema Nervioso Central (SNC), donde se encuentran los Defectos del tubo neural (DTN) (Reece & Hulse, 2019). Comprender acerca de la influencia de fitocannabinoides como Tetrahidrocannabinol (THC) y Cannabidiol (CBD), la participación de la señalización endocannabinoide y como esta interviene en el desarrollo del SNC, específicamente, en el proceso de neurulación, es esencial para comprender como los cannabinoides pueden inducir la presencia de DTN. De lo anterior, el objetivo del presente trabajo es determinar la participación del Sistema endocannabinoide (SEC) y de algunos posibles blancos de acción directos e indirectos (receptor cannabinoide 1 (CB1), receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa (PPAR α), receptor activado por proliferadores de peroxisomas gama (PPAR γ) y receptor de potencial transitorio sensible a la temperatura, subtipo vanilloide 1 (TRPV1)) de moléculas cannabinoides durante el proceso de neurulación en *Xenopus laevis* a través de experimentos de RT-qPCR, la elaboración de modelos bioinformáticos predictivos y tratamientos farmacológicos.

Nuestros resultados indican la presencia de todos los transcritos de interés evaluados (CB1, N-acil fosfatidiletanolamina fosfolipasa D (NAPE-PLD), diacilglicerol lipasa alfa (DAGL), PPAR α , PPAR γ y TRPV1) en el proceso de neurulación de *Xenopus laevis*. La elaboración de modelos predictivos bioinformáticos indica que CBD interaccionaría con CB1 y PPAR α , al igual que GW6471 con PPAR α , ambas drogas con parámetros similares entre las proteínas humanas y de *Xenopus*. Luego, la administración de CBD afecta el cierre correcto del Tubo neural (TN) de manera dependiente de la

concentración y la administración de GW6471 un antagonista de PPAR α sugiere que este fármaco no tiene efectos teratogénicos en los embriones al ser administrado en neurulación. En conclusión, los resultados nos señalan que la señalización endocannabinoide participaría durante el proceso de neurulación de *Xenopus laevis* y que su alteración por medio de la presencia de CBD podría inducir malformaciones que se evidencian en estadios larvales posteriores.

Abstract

Currently, the consumption of marijuana during pregnancy has been epidemiologically associated with the occurrence of major congenital malformations of the Central Nervous System (CNS), including Neural Tube Defects (NTDs) (Reece & Hulse, 2019). Understanding the influence of phytocannabinoids such as Tetrahydrocannabinol (THC) and Cannabidiol (CBD), the role of endocannabinoid signaling, and how it intervenes in the development of the CNS, specifically in the process of neurulation, is essential for understanding how cannabinoids can induce the presence of NTDs. Therefore, the objective of this study is to determine the involvement of the Endocannabinoid System (ECS) and some possible direct and indirect targets of action (cannabinoid receptor 1 (CB1), peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α), peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ), and transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1)) of cannabinoid molecules during the neurulation process in *Xenopus laevis* through RT-qPCR experiments, the development of predictive bioinformatics models, and pharmacological treatments.

Our results indicate the presence of all transcripts of interest evaluated (CB1, N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D (NAPE-PLD), diacylglycerol lipase alpha (DAGL), PPAR α , PPAR γ , and TRPV1) in the neurulation process of *Xenopus laevis*. The development of predictive bioinformatics models suggests that CBD would interact with CB1 and PPAR α , as well as GW6471 with PPAR α , both drugs showing similar parameters between human and *Xenopus* proteins. Additionally, the administration of CBD affects the proper closure of the Neural Tube (NT) in a concentration-dependent manner, while the administration of GW6471, an

antagonist of PPAR α , suggests that this drug does not have teratogenic effects on embryos when administered during neurulation. In conclusion, the results indicate that endocannabinoid signaling may be involved in the neurulation process of *Xenopus laevis* and that its alteration by the presence of CBD could induce malformations that are evident in later larval stages.

I.- Introducción

1. Neurulación

La neurulación es un proceso embrionario común para todos los organismos del filo Chordata desde protocordados (cefalocordados y urocordados) hasta el subfilo Craniata (humanos). Este corresponde a una de las primeras etapas en la ontogenia de los cordados. Durante la neurulación, las células precursoras neuronales de la placa neural (PN) se diferencian, pliegan y fusionan para formar una estructura tubular denominada Tubo neural (TN), que, en vertebrados, corresponderá al cerebro y la médula espinal (Figura 1) (Davidson & Keller, 1999; Nikolopoulou et al., 2017). El proceso de neurulación es morfogénicamente complejo y requiere la coordinación de diversos mecanismos, tanto celulares como moleculares tales como: constricción apical, migración y diferenciación celular (Figura 2) (Nikolopoulou et al., 2017).

El TN adopta la conformación tubular desde una conformación plana de la PN, a través de sucesivas etapas. Inicialmente, la PN es inducida a diferenciarse (inducción neural), lo que genera una serie de eventos celulares que producen que este conjunto de células, que forman un neuroepitelio por sus características morfológicas y funcionales, se curve creando pliegues neurales que se elevan hacia la línea media dorsal (migración celular y constricción apical), y finalmente sus bordes se fusionan para completar el cierre del TN. Este proceso se denomina neurulación primaria y posee ligeras variaciones entre especies (Nikolopoulou et al., 2017).

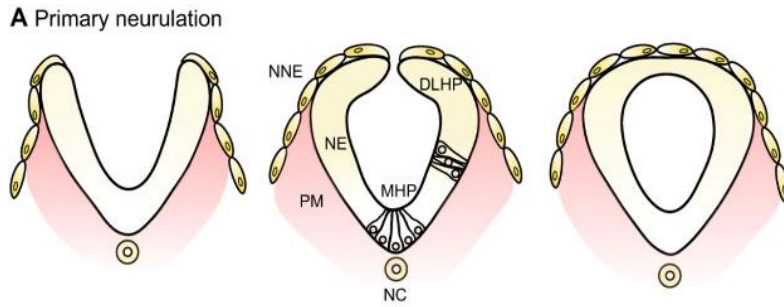


Figura 1.- Descripción general de la neurulación primaria. Representación esquemática de la neurulación primaria que implica la elevación de los pliegues neurales (panel izquierdo), seguida de su flexión (panel central) y fusión (panel derecho). DLHP, punto de bisagra dorsolateral; MHP, punto de articulación medio; NC, notocorda; NE, neuroepitelio; NNE, ectodermo no neural; PM, mesodermo paraxial. Extraído de Nikolopoulou et al., 2017.

El anfibio *Xenopus laevis* ha sido una especie ventajosa para el estudio de diferentes procesos durante el desarrollo, dentro de los cuales encontramos la neurulación. Primero porque sus huevos tienen aproximadamente 1 mm de diámetro, lo que significa que es más de 2300 veces más grande que el huevo de ratón, lo que permite una amplia variedad de manipulaciones experimentales. En segundo lugar, la cubierta del huevo es transparente, lo que permite la visualización directa de las primeras etapas de la morfogénesis (Borodinsky, 2017).

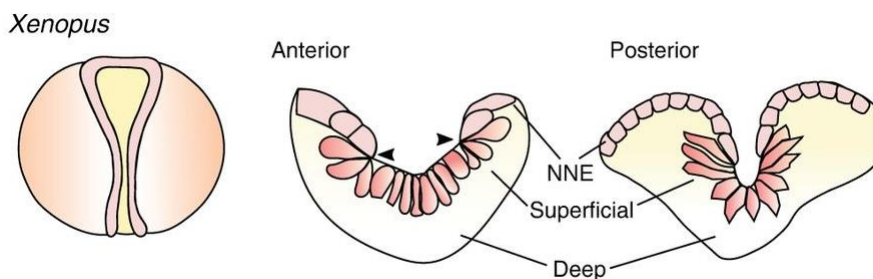


Figura 2.- Resumen esquemático de la neurulación en *Xenopus laevis*. Las características clave de la neurulación para *Xenopus*. Se muestran secciones transversales del tubo neural de *Xenopus* con apariencia

típica en las regiones embrionarias anterior y posterior. Las puntas de flecha indican puntos de articulación. NNE, ectodermo no neural. Extraído de Nikolopoulou et al., (2017).

2. Defectos del tubo neural

Las alteraciones de la neurulación provocadas por fallas de los cambios morfológicos dinámicos de éste conducen a perturbaciones en el cierre del TN y provocan defectos del tubo neural (DTN) (Benavides-Rivas et al., 2020; Nikolopoulou et al., 2017). Si no se completa el cierre fisiológico del neuroepitelio, éste queda expuesto al medio ambiente externo y, en consecuencia, sujeto a degeneración y déficit neuronal. El tipo y la gravedad de estos DTN abierto varían según el nivel del eje del cuerpo afectado. Por lo tanto, la falla del cierre en el cerebro y la médula espinal prospectivos da como resultado anencefalia y espina bífida abierta (mielomeningocele) (Greene & Copp, 2014).

Los DTN constituyen los defectos morfológicos graves más comunes diagnosticados en fetos y recién nacidos humanos (Wallingford et al., 2013), las segundas malformaciones congénitas más frecuentes a nivel mundial y las primeras asociadas al sistema nervioso, con una incidencia entre 2 y 6 por 1000 nacidos vivos, que pueden presentarse aislados o asociados con otras malformaciones (Gheasuddin & Galea, 2022; Yanes Calderón et al., 2017). Tanto los factores ambientales como los genéticos contribuyen a la tasa de incidencia de los DTN (Wallingford et al., 2013)

Un Factor genético relevante en el proceso de neurulación corresponde al metabolismo del folato y a la señalización del ácido retinoico los cuales promueven el cierre del TN (Burren et al., 2008; Li et al., 2018). Además, el retinol es fundamental tanto para el desarrollo ocular como para la fotorrecepción en diferentes especies de vertebrados (Luo et al., 2006).

Factores ambientales que pueden incidir en la aparición de DTN son los fármacos antiepilépticos (FAE) o anticonvulsivos. Se ha demostrado que los hijos de madres epilépticas presentan una mayor incidencia de DTN asociados con el uso de FAE durante el embarazo (Lindhout & Schmidt, 1986; Robert & Guibaud, 1982; Rosa, 1991). Además, el ácido valproico y la carbamazepina, FAE ampliamente utilizados, aumentan la incidencia de DTN, tanto en estudios epidemiológicos como en animales (Lindhout et al., 1992; Padmanabhan & Ahmed, 1996; Rosa, 1991; Sequerra et al., 2018).

El 25 de junio de 2018, la FDA (Food and drug, agencia de Estados Unidos) aprobó el primer medicamento clasificado como FAE con cannabidiol (CBD) de grado farmacéutico purificado y derivado de plantas, Epidiolex (Greenwich Biosciences, Inc, Carlsbad, CA), para pacientes ≥ 2 años con síndrome de Dravet o síndrome de Lennox-Gastaut (Devinsky et al., 2018). Debido al hecho de que Epidiolex corresponde a un FAE (medicamentos que aumentan la incidencia de DTN) fabricado en base a CBD, es de interés estudiar la posible relación de CBD y la aparición de DTN.

3. Efectos de fitocannabinoides en desarrollo embrionario

El consumo de *Cannabis sativa* ha sido asociado epidemiológicamente con las principales malformaciones congénitas del Sistema Nervioso Central (SNC), incluidos los defectos del tubo neural en humanos (Reece & Hulse, 2019). Estudios realizados en Estados Unidos indican que el consumo de marihuana entre mujeres embarazadas es mayor que el de cualquier otra droga ilícita (Volkow et al., 2019) y que su consumo ha aumentado en los últimos años (Brown et al., 2017). Asimismo, estudios realizados por Reece & Hulse, (2019) en Canadá confirmaron que los defectos congénitos eran más comunes en los territorios donde se fuma cannabis con más frecuencia

que en otros territorios, además el cannabis y muchos cannabinoides estaban asociados con el aumento de anomalías congénitas.

Se han realizado experimentos con CBD y tetrahidrocannabinol (THC), moléculas de carácter terpenofenólico farmacológicamente relevantes de la marihuana (Turner et al., 2017), y se ha demostrado que la exposición a altas dosis de THC y CBD durante el desarrollo embrionario provoca una alteración del desarrollo cerebral y otros efectos teratogénicos en ratones, peces y pollos (Carty et al., 2018; Fish et al., 2019; Psychoyos et al., 2008) alterando de manera dosis-dependiente el cierre exitoso del tubo neural, causando anencefalia, produciendo defectos en la morfología del TN, induciendo defectos en los ojos, el hocico y la mandíbula, así como disminución del crecimiento, ejes curvos y edemas (Carty et al., 2018; Gheasuddin & Galea, 2022; Psychoyos et al., 2008; Pandelides et al., 2021). Así mismo el tratamiento con CBD alteró la transcripción de genes implicados en la señalización del ácido retinoico, además observaron diferencias en el tamaño de los ojos en peces expuestos a THC y CBD sugiriendo que la alteración del metabolismo del retinol durante el desarrollo podría ser responsable de defectos morfológicos (Pandelides et al., 2021). Este estudio junto con Carty et al., (2018) demuestran que el CBD induce toxicidades conductuales y de desarrollo en concentraciones sorprendentemente más bajas que el THC.

Estos datos nos muestran una situación preocupante dado el inminente aumento en el consumo de Marihuana y las posibles consecuencias desconocidas de este consumo en el embarazo y en el neurodesarrollo embrionario humano.

4. Sistema endocannabinoide e interacciones con Fitocannabinoides.

La *Cannabis sativa* se ha utilizado durante más de 5.000 años con fines medicinales y recreativos (Pertwee, 2006). El uso del cannabis como hierba medicinal se informó por primera vez en China, aproximadamente en el año 2727 a. c. Desde entonces, el cannabis se ha utilizado como agente medicinal con efectos antinociceptivos, antiinflamatorios, anticonvulsivos y antieméticos (Bockmann et al., 2023). Esta planta contiene 120 fitocannabinoides (Turner et al., 2017), y más de 400 compuestos naturales que pertenecen a variadas clases de familias químicas (ElSohly & Slade, 2005).

El sistema endocannabinoide (SEC) es reconocido como las diversas vías de señalización que son activadas por los endocannabinoides y que explicarían los efectos fisiológicos y psicoactivos del cannabis. Está constituido por los receptores acoplados a proteína G CB1 (receptor cannabinoide 1) y CB2 (receptor cannabinoide 2), sus agonistas endógenos, los endocannabinoides anandamida (AEA) y 2-araquidonoilglicerol (2-AG), que corresponden a neuromoduladores lipofílicos liberados independientemente de las vesículas sinápticas (Bockmann et al., 2023); y enzimas pertenecientes al SEC que regulan el metabolismo asociado al mismo, como N-acil fosfatidiletanolamina fosfolipasa D (NAPE-PLD) y diacilglicerol lipasa (DAGL) (Figura 3) (Di Marzo, 2011).

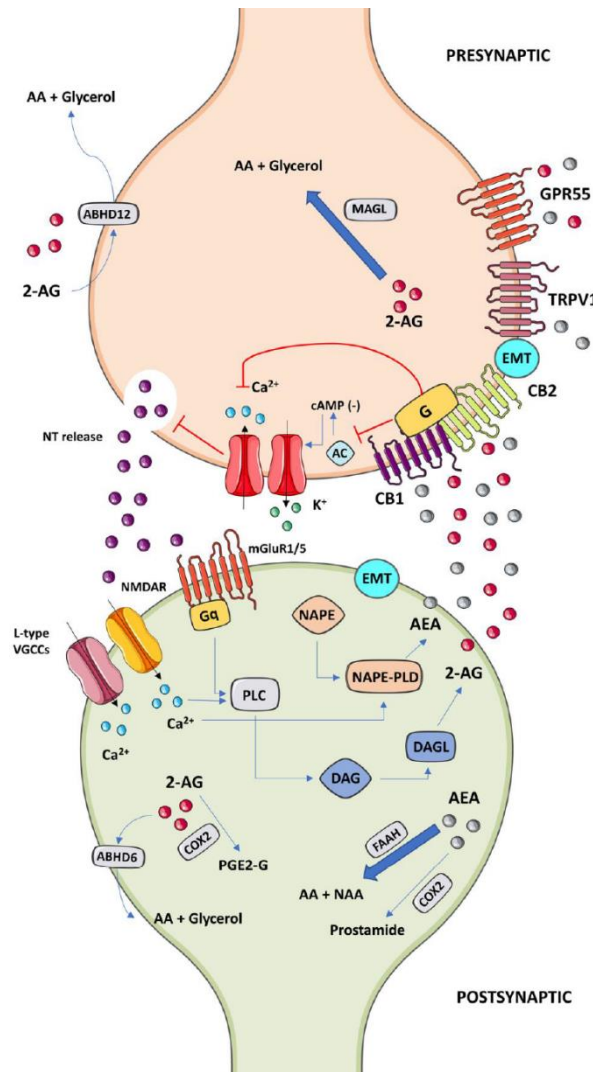


Figura 3.- Señalización en la sinapsis endocannabinoide. El glutamato liberado por las células presinápticas estimula receptores ionotrópicos y metabotrópicos en las células postsinápticas, lo que conlleva un aumento en la concentración/flujo de Ca^{2+} . El Ca^{2+} y/o la proteína Gq estimulan la PLC, lo que lleva a la producción de DAG, el sustrato para la formación de 2-AG por DAGL, mientras que NAPE-PLD hidroliza NAPE para formar AEA. Los endocannabinoides se difunden a través de la hendidura sináptica, alcanzando los receptores CB1 y CB2, TRPV1 (receptor de potencial transitorio sensible a la temperatura, subtipo vanilloide 1) y GPR55 (receptor acoplado a proteína G 55), entre otros. La vía clásica aguas abajo del receptor cannabinoide ocurre a través de la proteína Gi: inhibición de la actividad de adenilil ciclasa, modulación de canales de K^+ y Ca^{2+} , y subsiguiente inhibición de la liberación de neurotransmisores. La señalización se finaliza mediante la degradación de los endocannabinoides. FAAH (amida hidrolasa 1 de ácidos grasos) metaboliza AEA en AA (ácido araquidónico) y etanolamina, mientras que COX-2 (ciclooxigenasa-2) puede generar eventualmente prostamida a partir de AEA. MAGL (monoacilglicerol

lipasa), degradan 2-AG en AA y glicerol, mientras que COX-2 se metaboliza en PGE₂-G. El grosor de las flechas de las enzimas metabolizadoras representa su importancia en el control de la disponibilidad de AEA y 2-AG. Extraído de Bockmann et al., (2023).

El SEC está muy conservado entre las especies animales, incluidos los humanos, y parece estar involucrado en todas las etapas del desarrollo del SNC desde la neurulación (Bockmann et al., 2023). En los vertebrados (p. ej., pollo, ratón, *Xenopus* y pez cebra), el SEC se expresa en el SNC antes y durante el desarrollo neurológico (Berghuis et al., 2007; Harkany et al., 2007; Krug & Clark, 2015; Lam et al., 2006; Psychoyos et al., 2012).

La síntesis de endocannabinoides se produce principalmente por el aumento de Ca²⁺ intracelular. La síntesis de 2-AG es estimulada por altos niveles de Ca²⁺ y la vía de la Gq/fosfolipasa C, que produce diacilglicerol (DAG), luego las enzimas DAGL (DAGL α y DAGL β), hidrolizan DAG, generando finalmente 2-AG (Bockmann et al., 2023; Di Marzo & De Petrocellis, 2012). En el caso de la AEA se induce la acción de NAPE-PLD, esta es sensible al Ca²⁺ y cataliza la hidrólisis de N-araquidonoil fosfatidiletanolamina (NArPE) (Bockmann et al., 2023), convirtiendo directamente NArPE en AEA (Figura 4) (Di Marzo, 2011; Di Marzo & De Petrocellis, 2012).

NAPE-PLD generalmente se considera una enzima biosintética principal de las N-aciletanolaminas (NAEs) dentro de las cuales se encuentran la palmitoiletanolamida (PEA), la oleoiletanolamida (OEA) y AEA (Bockmann et al., 2023; Mock et al., 2020). Cabe recalcar que esta enzima participa en la síntesis de diversas moléculas de naturaleza lipídica como por ejemplo PEA y OEA y no solo en la producción de AEA (Figura 4). NAPE-PLD corresponde a un blanco relevante de interés dado que participa en el metabolismo de moléculas derivadas de la fosfatidiletanolamina (FE) (molécula precursora de NAEs), siendo la FE uno de los principales lípidos

en la composición de las plaquetas de Yolc de los anfibios (Buschiazzo et al., 2003).

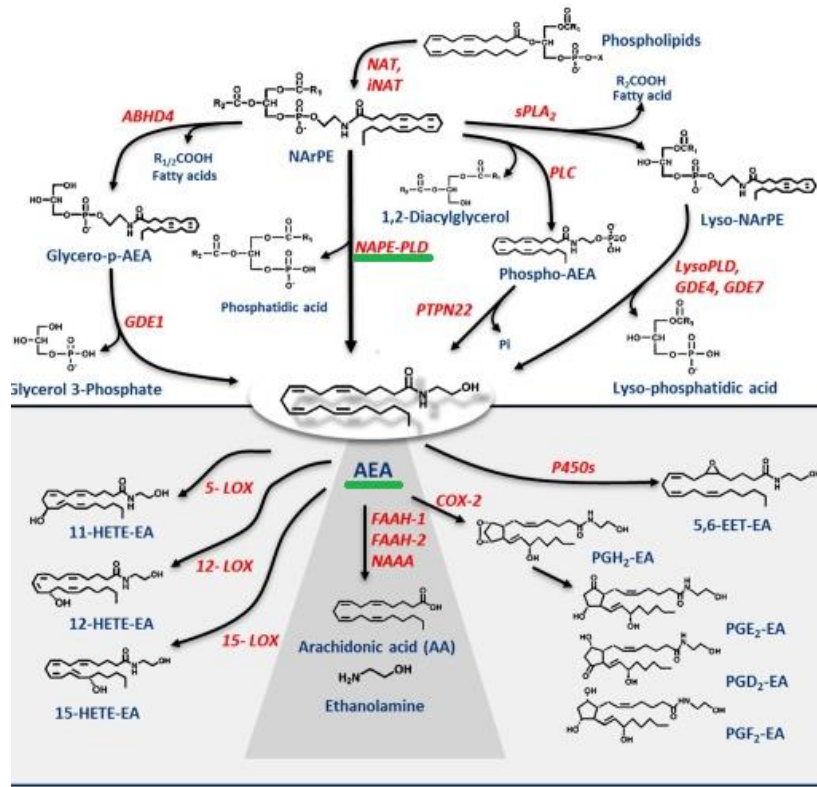


Figura 4.- Vías metabólicas implicadas en la síntesis de Anandamida (AEA). En el esquema AEA y NAPE-PLD se han remarcado en verde. Extraído y modificado de Maccarrone, (2017).

Clásicamente, las moléculas de cannabinoides actúan a través de dos receptores acoplados a proteína G, los receptores CB1 y CB2, regulando varias vías intracelulares. Estos receptores están acoplados principalmente a la proteína G inhibidora, que, a su vez, disminuye la activación de la adenilil ciclasa, reduciendo la formación de AMPc (Adenosín monofosfato cíclico) (Bockmann et al., 2023). El endocannabinoide AEA es un agonista parcial de CB1 mientras que 2-AG es agonista completo para CB1 (Cristino et al., 2020; Reggio, 2010).

Los compuestos farmacológicamente activos de la marihuana, los fitocannabinoides THC y CBD interactúan con los receptores cannabinoides CB1 y CB2. El THC imita a los endocannabinoides como agonista parcial en CB1 y CB2 (Pacher et al., 2020). Por otro lado, el CBD actúa como un modulador alostérico negativo de CB1 (Tham et al., 2019), como un agonista inverso muy débil de CB2 (Di Marzo, 2020) y como agonista del receptor de potencial transitorio sensible a la temperatura, subtipo vanilloide 1 (TRPV1) y al receptor activado por proliferadores de peroxisomas gama (PPAR γ) (Bockmann et al., 2023; Cristino et al., 2020; Di Marzo, 2020).

Trabajos realizados por (Berrendero et al., 1999; Keimpema et al., 2010; Psychoyos et al., 2012) sugieren que, tanto en pollos como en ratones, los endocannabinoides 2-AG y AEA están presentes dentro del cerebro en desarrollo al final de la gestación. Psychoyos et al., (2012) mediante qPCR y RT-PCR encontraron niveles comparables de transcripciones de DAGL α , DAGL β y NAPE-PLD en pollos y en ratones entre las etapas de neurulación y desarrollo neuronal. Además, detectaron ARNm de CB1 desde la etapa de gastrulación, concordando con estudios realizados en pez cebra (Migliarini & Carnevali, 2009).

Finalmente, resultados inmunoquímicos de Psychoyos et al., (2012) sobre CB1 revelaron la presencia de la proteína CB1 en la gastrulación, la neurulación y el desarrollo neuronal de pollo lo que es consistente con hallazgos en pez cebra, que describen la presencia del receptor CB1 en el momento de la eclosión (Migliarini & Carnevali, 2009).

5. PPAR y TRPV1 receptores del endocannabinoidoma.

Los endocannabinoides no solo actúan sobre CB1 y CB2 sino que también sobre otros blancos; AEA y 2-AG activan a TRPV1 y a PPAR γ (Bouaboula et al., 2005; Cristino et al., 2020). Con el objetivo de incluir varios mediadores lipídicos similares a endocannabinoides, sus enzimas metabólicas y sus objetivos moleculares Di Marzo, (2020) propone un SEC ampliado el cual denomina “endocannabinoidoma”, que incluye más de 100 mediadores lipídicos, 20 enzimas y 20 receptores (dentro de los que incluye al receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa (PPAR α), PPAR γ y a TRPV1). Los receptores más estudiados implicados en el endocannabinoidoma son TRPV1, PPAR α y PPAR γ (Cristino et al., 2020).

Los PPAR son una familia de receptores nucleares promiscuos que responden a un número sorprendente de señales biológicas dispares, incluidos ácidos grasos y eicosanoides, y ligandos sintéticos de estructuras químicas muy diferentes. Mecanísticamente, esto se explica por los dominios de unión a ligando de los PPAR que son inusualmente grandes y, por tanto, susceptibles a ser modulados. Los activadores endógenos de los PPAR incluyen los ácidos grasos insaturados linolénico, linoleico, petroselénico y araquidónico (O’Sullivan, 2016). Es importante destacar que existe poca similitud estructural entre los ligandos de PPAR y los cannabinoides utilizados clínicamente (O’Sullivan & Kendall, 2010).

Como otros miembros de la superfamilia, los PPAR están organizados en 4 dominios. El dominio de unión al ADN (dominio C, Figura 5) está extremadamente bien conservado y su estructura dedo de Zinc es la firma de los miembros de la superfamilia de receptores de hormonas nucleares. El dominio de unión al ADN está conectado con el dominio de unión a ligando (LBD) C-terminal (dominio E/F) mediante la región bisagra (dominio D). El dominio E/F está implicado en la dimerización de los PPAR con el receptor de retinoide (RXR) y en la función de transactivación ligando-dependiente

del receptor, mientras el dominio N-terminal de la proteína (dominio A/B) está asociado en la regulación ligando-independiente de la actividad del receptor (Michalik et al., 2002).

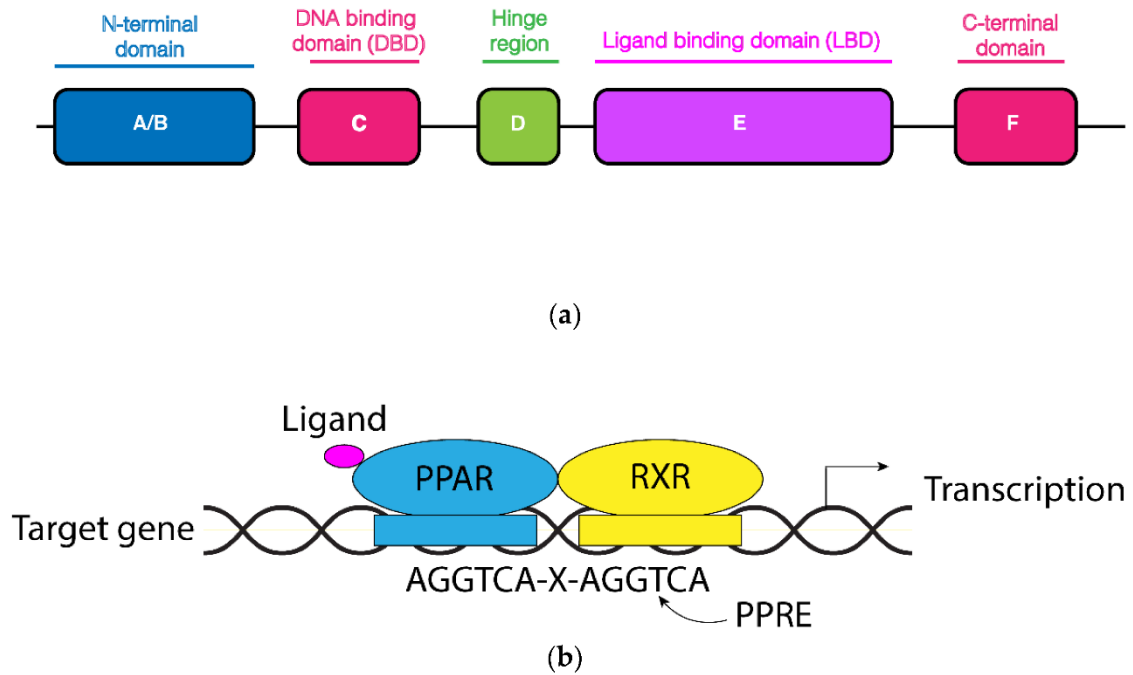


Figura 5.- Organización estructural de los PPAR. (a) Organización estructural de los receptores nucleares PPAR y sitios de unión PPRE (elementos respuesta de PPAR). (b) El dominio A/B N-terminal abarca una función de activación independiente del ligando. La región de unión al ligando C-terminal incluye la interfaz de la función de activación dependiente del ligando. PPAR se heterodimeriza con RXR y se une a los sitios de unión de PPRE en la región promotora de los genes diana. Probablemente, con un complejo coactivador, este pueda asociar y fomentar la transcripción. Extraído de Todisco et al., (2022)

Los PPAR forman heterodímeros con RXR y se unen a secuencias de ADN llamadas elementos de respuesta de PPAR (PPRE), lo que provoca cambios en la transcripción de los genes diana. Los genes diana de los PPAR están involucrados en la regulación del metabolismo y la homeostasis energética, la diferenciación celular y la inflamación. (O’Sullivan, 2016). En la

actualidad se conocen tres isoformas de PPAR: alfa, beta/delta y gama (Esposito et al., 2011; O'Sullivan, 2016). Las tres isoformas están codificadas por genes diferentes, pero muestran una similitud sustancial de aminoácidos en los dominios de unión al ligando (O'Sullivan & Kendall, 2010).

Se ha demostrado que endocannabinoides como AEA activan a PPAR α y PPAR γ (Bockmann et al., 2023; Sun et al., 2006) y 2-AG activa a PPAR γ (Bouaboula et al., 2005). Desde 2002, se ha acumulado evidencia de que los endocannabinoides, compuestos similares a los endocannabinoides (PEA y OEA), fitocannabinoides y ligandos de cannabinoides sintéticos se unen a los PPAR y los activan (O'Sullivan, 2007, 2013). Los fitocannabinoides y sus derivados, incluidos THC, CBD, CBDa, cannabigerol, cannabigerol quinina, cannabicromo y ácido ajulémico (un análogo sintético de un metabolito de THC), pueden unirse y aumentar la actividad transcripcional de PPAR γ (Esposito et al., 2011), lo que sugiere que esta es una propiedad de muchos compuestos fitocannabinoides. Por el contrario, hay menos datos sobre los efectos de los fitocannabinoides en PPAR α (O'Sullivan, 2016).

En cuanto a PPAR δ hay poca evidencia que indique que los cannabinoides interactúen directamente con él. De hecho, se ha demostrado que el ácido ajulémico (Liu et al., 2003), los metabolitos 2-AG (Kozak et al., 2002) y PEA (LoVerme et al., 2006) no activan PPAR δ (O'Sullivan & Kendall, 2010). Dado que los PPAR son sensores de los niveles de ácidos grasos y los endocannabinoides son derivados de ácidos grasos, no es sorprendente que cada vez más evidencia sugiera que los endocannabinoides activan los PPAR, y que esta acción podría mediar, al menos en parte, muchos de los efectos biológicos de los cannabinoides (O'Sullivan & Kendall, 2010).

Se ha demostrado también que los cannabinoides pueden modular a TRPV1 (Almeida & Devi, 2020; Bockmann et al., 2023). TRPV1 es un canal

catiónico no selectivo expresado principalmente en las fibras C y A δ de las neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG). Este receptor transmembrana actúa como sensor de calor, pH ácido y estímulos químicos de los cuales el principio picante del ají, la capsaicina, es el agonista clásico (Caterina et al., 1997). Cuando se activa, TRPV1 facilita la entrada de iones predominantemente Ca²⁺ en el citoplasma, estimulando así a la neurona para que evoque una señal de alerta al cerebro sobre un posible daño tisular. Recientemente, se sugirió una función alternativa de TRPV1 cuando se demostró que TRPV1 está localizado en neuritas y conos de crecimiento donde regula la motilidad en células F11 transfectadas transitoriamente y neuronas DRG embrionarias (Goswami & Hucho, 2007). La motilidad de los conos de crecimiento y la dirección de las neuritas en extensión son procesos dinámicos que implican señales de Ca²⁺ a través de receptores de la superficie celular. Además, TRPV1 desempeña un papel en la reorganización del citoesqueleto (Goswami et al., 2006), la migración celular (Waning et al., 2007) y en la regeneración de neuronas lesionadas (Biggs et al., 2007), procesos que son estrictamente regulado por la concentración de Ca²⁺ libre intracelular (Zheng & Poo, 2007). Estos hallazgos sugieren un papel importante para TRPV1 durante la diferenciación neuronal (EL Andaloussi-Lilja et al., 2009). El papel funcional de TRPV1 en el cerebro aún no se ha resuelto, pero una sugerencia puede ser que TRPV1 desempeñe un papel como regulador de Ca²⁺ durante el desarrollo embrionario (EL Andaloussi-Lilja et al., 2009).

En base a la información anteriormente señalada nos preguntamos si la señalización endocannabinoide participa en el proceso de neurulación en el modelo *Xenopus laevis* mediante la actividad de las enzimas NAPE-PLD, DAGL y los receptores CB1, TRPV1, PPAR α y PPAR γ .

II.- Hipótesis

- La señalización endocannabinoide participa en el proceso de neurulación de *Xenopus laevis* mediante la actividad de las enzimas NAPE-PLD, DAGL y los receptores CB1, TRPV1 y PPAR.

III.- Objetivo general

- Determinar la participación del SEC a través de tratamientos de moléculas cannabinoides como CBD Y GW6471 y su posible acción sobre algunos blancos como (PPAR α , PPAR γ y TRPV1) durante el proceso de neurulación en *Xenopus laevis*.

IV.- Objetivos específicos

- Evaluar la presencia de transcritos de componentes pertenecientes al SEC como CB1, NAPE-PLD y DAGL α y otros blancos de interés relacionados como PPAR α , PPAR γ y TRPV1 en diferentes estadios asociados al proceso de neurulación de *Xenopus laevis* mediante qRT-PCR.

- Evaluar la capacidad de interacción de xCB1-CBD y xPPAR α -CBD/GW6471 a través de la elaboración de modelos bioinformáticos predictivos.

- Evaluar el efecto teratógeno de CBD y de GW6471, un bloqueador farmacológico específico de PPAR α en el proceso de neurulación de *Xenopus laevis*.

V.- Materiales y métodos.

1. Manipulación de animales y técnicas embriológicas.

1.1 Declaración ética y animales de experimentación.

Los métodos implementados para el cuidado y manipulación del modelo *Xenopus* fueron previamente aprobados y revisados por la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID), por el comité de ética de la Facultad de Ciencias Biológicas y por el comité de Ética, Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Concepción (Fondecyt 1231038). Los animales fueron tratados de acuerdo con los protocolos éticos establecidos por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH). El protocolo de eutanasia de anfibios se basó en los métodos descritos por (Close et al., 1997).

Los embriones fueron mantenidos en solución Marc's modified Ringer's (MMR al 10%, pH 7.4), conteniendo NaCl 1 M, KCl 20 mM, MgSO₄ 10 mM, CaCl₂ 20 mM, HEPES 50 mM.

1.2 Obtención de embriones de *Xenopus laevis*.

A las hembras adultas de *Xenopus laevis* se les inyectó una vez (preprime) 50 UI (unidad internacional) de hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) de 1 a 2 días antes de la recolección de óvulos. Posteriormente, las hembras fueron inyectadas nuevamente (prime) con 350-500 UI de hCG (dependiendo de su tamaño y peso), 24 h antes de la recolección de huevos. Los huevos recolectados fueron fertilizados con un pequeño trozo de testículo previamente obtenido por disección.

La obtención de testículos se llevó a cabo mediante la sedación previa de una rana macho, a la cual se anestesió con un 5% de benzocaína. Una vez anestesiada, fue sacrificada para luego recolectar las gónadas mediante una disección abdominal, las cuales fueron conservadas en una solución 1X de MMR suplementado con 20% de Suero de Bovino Fetal (FBS), a la que se añadieron 10 μ l de una solución base de antibióticos penicilina/estreptomicina. Además, se extrajo el cerebro del macho el cual sirvió como control positivo en los ensayos de qRT-PCR.

Los ovocitos fertilizados se mantuvieron en una solución salina al 10 % de MMR, posteriormente fueron limpiados de su gelatina protectora a través de agitación mecánica en una solución de cisteína al 2% en MMR al 10% pH 7,8-7,9. Una vez limpios, los embriones se mantuvieron en solución MMR al 10% (pH 8) y se recolectaron muestras en etapas de neurulación: estadio 10-12,5 (neurulación temprana), estadio 14-15 (neurulación media) y estadio 19-20 (neurulación tardía, término de neurulación). Las etapas de desarrollo se registraron de acuerdo con Gerhart & Kirschner, (2020) (Figura 6)

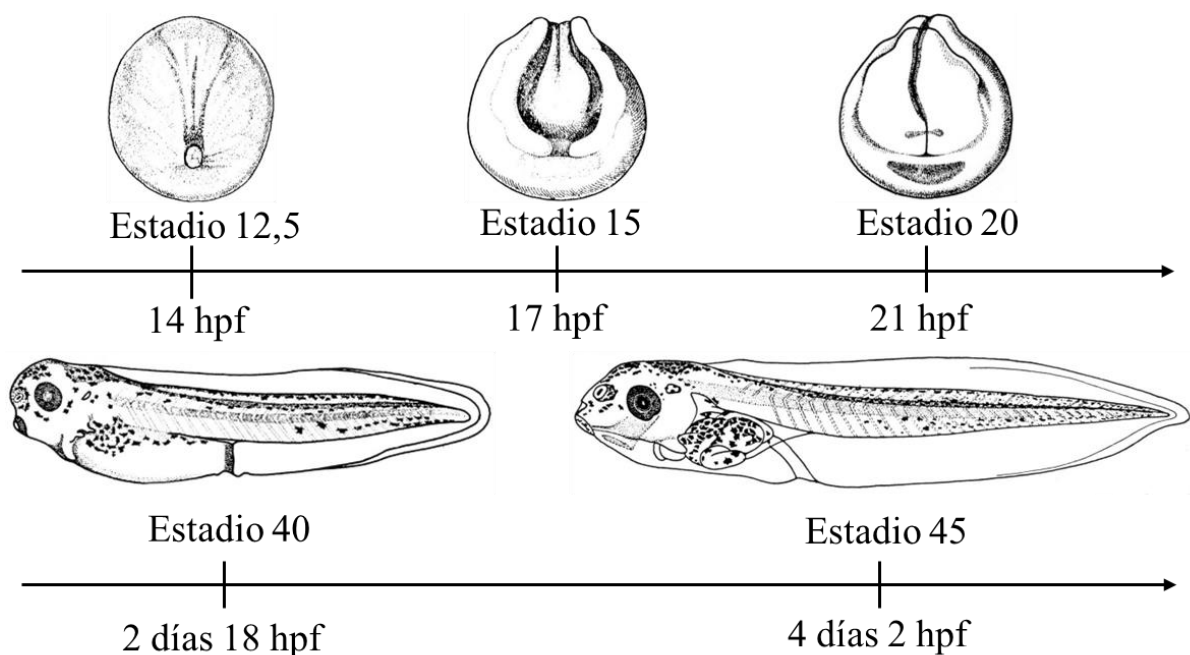


Figura 6.- Desarrollo embrionario de *Xenopus Laevis*. Etapas seleccionadas para el análisis del cierre del tubo neural y efectos morfológicos (E40-E45). Estadio de neurulación temprana (E12.5) la zona media del embrión determina la posición futura de la placa neural. La elevación inicial de pliegues neurales, más pronunciada en la región anterior es observable durante estadio de neurulación intermedia (E14-E15). En estadio de neurulación tardía (E20) los pliegues neurales se tocan entre si permitiendo el cierre del tubo neural. Extraído y modificado de Gerhart & Kirschner, (2020).

2. Técnicas de Biología Molecular.

2.1 Extracción de ARN total.

La extracción total del ARN se realizó usando el kit de ARN total E.Z.N.A®HP de acuerdo a las indicaciones del fabricante. En este ensayo se utilizaron embriones de *Xenopus laevis* en etapas de neurulación (estadios 12,5-20) y tejido cerebral adulto.

Se homogeneizaron muestras (30 mg) (15 embriones) en 500 µl de tampón de lisis GTC. Los ciclos de centrifugación se realizaron de acuerdo con las instrucciones del Kit. Las muestras se lavaron con 500 µl de etanol (70% v/v) y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 2 min.

El ARN total se suspendió en 30 µl de agua libre de ARNasa y se cuantificó por absorbancia a 260 nm y su pureza según la relación 260/280 en el equipo NanoQuant infinito 200 PRO, Tekan. El ARN se almacenó a -80 °C para su uso posterior.

2.2 Síntesis de cDNA mediante transcripción inversa

La síntesis de ADN se realizó usando la transcriptasa reversa AffinityScript cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). 1 µg de ARN total fue incubado con 10.0 µl de first strand master mix (2×), 1.5 µl de oligo(dT), 1.5 µl de Random Primers (0.1 µg/µl), 1.0 µl de AffinityScript RT/ RNase Block enzyme mixture y H₂O libre de RNAasas para un volumen final de 20 µl. Las muestras fueron incubadas durante 5 minutos a 25°C para permitir el alineamiento de los partidores, luego fueron incubados por 15 minutos a 42°C para permitir la síntesis de cDNA. Una última incubación fue llevada a 90°C durante 5 minutos para terminar la reacción de síntesis de cDNA.

2.3 Ensayos de RT-qPCR.

La amplificación del cDNA se realizó en el termociclador AriaMx Real-time PCR System ocupando un kit comercial. La reacción de RT-qPCR fue preparada con Brilliant II SYBR Green qPCR Master Mix (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

El volumen final de 20 µl fue preparado con 2 µl de cDNA y 250 nM del respectivo set de partidores (partidores para transcritos de Sub1, CB1, NAPE-PLD, DAGL α , TRPV1, PPAR γ y PPAR α (Tabla 1)). El ciclo de temperaturas siguió el siguiente protocolo: 5 minutos a 95°C; 40 ciclos 95°C por 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C por 30 segundos y una extensión final de 72°C durante 5 min.

Tabla 1.- Lista de partidores utilizados para qRT-PCR

Nombre	Partidor sense 5'-3'	Partidor antisense 5'-3'	Producto (pb)
CB1	TGTCCGACAGATCATAAGCGG	GAATGTGGTGTCTGCAAGGC	145
NAPE-PLD	GGACAGAGGACAGGTTACCA	CTGTCGTTTCCGAAGTGTCTC	80
DAGLa	CACAAGGGAATGGTTCTGTCTGCT	TGGCCAACCACAATCAGTTCGT	128
PPARg	TTCGCCATTCGCTTCAACTC	TGGGTTTCACGTTTCAGCA	109
PPARa	GAAGAACCGCAACAAGTGCC	GAATGCCACGGTCGGAAAAG	103
TRPV1	ACCCTCAGTGCTTCATTCCG	AACCTCCTCTGGAACCGTCT	108
Sub1	AGCAGGAGAAATGAAGCCAGG	CCGACATCTGCTCCTTCAGT	143

Posterior a los ciclos de PCR, la pureza de los productos de PCR fue chequeada mediante un análisis de su correspondiente curva de fusión. La cuantificación fue calculada comparando el número de ciclos requeridos para amplificar cada gen sobre el ciclo límite (Ct), en relación con el gen de referencia, en este caso Sub1, por su constante nivel de expresión específicamente en este tipo de muestras (Mughal et al., 2018). Los controles utilizados para evaluar la expresión de transcritos fueron:

- i. Control positivo (Cerebro Adulto *Xenopus laevis*).
- ii. Control negativo embriones en estadio de gástrula (estadio 12,5).

Posterior a la primera cuantificación, el $\Delta\Delta Ct$ fue determinado mediante una normalización frente al estadio 12,5 ocupando la fórmula $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (muestra) – ΔCt (promedio de estadio 12,5).

Los experimentos incluyen 3 réplicas biológicas (embriones de bach's distintos) y 2 réplicas técnicas por cada replica biológica.

Los partidores se diseñaron utilizando el software NCBI Primer-Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>), considerando su T_m , el porcentaje de GC, la formación de dímeros y estructuras.

2.4 Electroforesis en gel de agarosa.

Los productos de RT-qPCR se separaron en gel de agarosa al 1%. Los geles se prepararon en tampón de electroforesis TAE 0,5X (ácido tris-acético EDTA; Tris-HCl 40 mM, ácido acético 30 mM y EDTA 1 mM; pH 7,6 y bromuro de etidio 0,5 µg/ml (APEX, Houston, TX, EE. UU.). Se utilizó un marcador de peso molecular de escalera de ADN de 100 pb y un buffer de carga (6X) (GeneRuler, Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) Para visualizar las diferentes bandas de ADN en el gel de agarosa se utilizó un equipo transiluminador.

3. Predicciones computacionales.

3.1 Generación de modelos predictivos de xCB1 y LBD-xPPAR α .

Para realizar modelos predictivos de CB1 de *Xenopus laevis* (xCB1) y del dominio de unión a ligando (Ligand binding domain LBD) de PPAR α de *Xenopus laevis* (xPPAR α), se comparó el porcentaje de identidad de las secuencias aminoacídicas de xCB1 (código Uniprot Q801M1) v/s hCB1 (CB1 humano) (código Uniprot P21554) y de xPPAR α (código Uniprot AAH79684) v/s hPPAR α (PPAR α humano) (código Uniprot CAG30433), resultando en un 83% y un 81% de identidad, respectivamente, (Figuras 7 y 8).

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
800 bits(2066)	0.0	Compositional matrix adjust.	<u>393/473(83%)</u>	436/473(92%)	4/473(0%)
xCB1	1	MKSILDGLADTTFRITITDLLYLPNEVQYDDSKGDISSKLVYFPQKLPSSLRGDPHE			60
hCB1	1	MKSILDGLADTTFRITITDLLY+G N++QY+D KGD++SKL YFPQK PL+S RG P E			60
xCB1	61	KMTIIDDPLLSIPLDQINATDFYKNSII-FKDTDDNVQCGKNFMDMECFMILTPSQQLVI			119
hCB1	61	KMT D+P L +P DQ+N T+FYNKS+ FK+ ++N+QCG+NFMD+ECFM+L PSQQL I			119
xCB1	120	AALSIIIGTFTVLENLMLVIVVQSRSLRCRPSYHFIGSLAVADLLGSVIFVYSFVDFHV			179
hCB1	120	AVLSLTLTGFTVLENLVLVLCVILHSRSLRCRPSYHFIGSLAVADLLGSVIFVYSFIDFHV			179
xCB1	180	FHRKDSPNVFLFKLGGVTASFTASVGSFLTAIDRYISIHRPMSYKRIVTRTKAVIAFCM			239
hCB1	180	FHRKDS NVFLFKLGGVTASFTASVGSFLTAIDRYISIHRP++YKRIVTR KAV+AF+ C+			239
xCB1	240	MWTIAIVIAVLPFGWNCIKLRVSCDIFPLIDETYLMFWIGVTSVLLLFIVYAYMYILW			299
hCB1	240	MWTIAIVIAVLP L LGWNCIKLRVSCDIFPHIDETYLMFWIGVTSVLLLFIVYAYMYILW			299
xCB1	300	KAHNHAVRMLQRGTQKSIIVHTSEDGKVHITRPDQTRMDIRLAKTLVLVLLVLIICWGPL			359
hCB1	300	KAH+HAVRM+QRGTQKSII+HTSEDGKV +TRPDQ RMDIRLAKTLVLVLLVLIICWGPL			359
xCB1	360	MAIMVYDVFVGKINKTIKTVFAFCSVLCLLNSTVNPPIYALRSKDLRNFACSMFPSCQGT			419
hCB1	360	+AIMVYDVFVGK+NK IKTVFAFCS+LCLLNSTVNPPIYALRSKDLR+AF SMFPSC+GTA			419
xCB1	420	QPLDNSM-ESDCQNRHVNN-SNAHRAAESCIKSTVKIAKVTMSVSDTSAEAV			470
hCB1	420	QPLDNSM +SDC ++H NN ++ HRAAESCIKSTVKIAKVTMSVSDTSAEA+			472

Figura 7.- Alineamiento de secuencias aminoacídicas de xCB1 y hCB1. En la fila central se muestran los residuos conservados entre ambas secuencias y con “+” se muestran los cambios semiconservados.

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
805 bits(2079)	0.0	Compositional matrix adjust.	<u>381/471(81%)</u>	428/471(90%)	4/471(0%)
xPPARα	5	MVDTNSELCLITPLDEDDLESPLSGEFLQDVIDIQDITQITIGDDGSTPFGASEHQFFGNS			64
hPPARα	1	MVDTS L LC L+PL+ DLESPLS EFLQ++ +IQ+I+Q+IG+D S FG +E+Q+ G+			60
xPPARα	65	PGSIGSVSTDLTDTLSPASSPASITFPAASGSAEDAACKSLNLECRVCSDKASGFHYGVH			124
hPPARα	61	PGSDGSV---ITDTLSPASSPSSVTYPVPGSVDESPGALNIECRICGDKASGYHYGVH			117
xPPARα	125	ACEGCKGFFRRTIRLKLVDRCERMCKIQKKNRNCQYCRFEKCLNVGMSHNAIRFGRMP			184
hPPARα	118	ACEGCKGFFRRTIRLKLVDYD+C+R CKIQKKNRNCQYCRF KCL+VGMSSHNAIRFGRMP			177
xPPARα	185	RSEKAKLKAELMCDQDQVKTQMDLLSLARLIYDAYLKNFNMNKVKARAILTGKASN-P			243
hPPARα	178	RSEKAKLKAEL C+ D++D++ ADL SLA+ IY+AYLKNFNMNKVKAR IL+GKASN P			237
xPPARα	244	PFVIHDMETLCAEKTLVAKLVANGIQNKEAEVRIHFCCQCTSVETVTELEFAKIPGF			303
hPPARα	238	PFVIHDMETLCAEKTLVAKLVANGIQNKEAEVRIHFCCQCTSVETVTELEFAKIPGF			297
xPPARα	304	TELDLNDQVTLTKYGVYEA+FMFLASVMNKDGMVLVAYGNF ITREFLKS LRKPIGDMMEP			363
hPPARα	298	ANLDLNDQVTLTKYGVYEAIFAMLSVMNKDGMVLVAYGNF ITREFLKS LRKPFCDIMEP			357
xPPARα	364	KFEFAMKFNALDSDSLFVAALICCGDRPGLVNIPISEKMQESIVHVLKHLQSNHP			423
hPPARα	358	KFDAMKFNALDSD+SLFVAALICCGDRPGL+N+ IEKMQE IVHVL+LHLQSNHP			417
xPPARα	424	DDSF LFPKLLQK MADLRQLVTEHAQLVQTIKKTETDAALHPLLQEIYRDMY			474
hPPARα	418	DD FLFPKLLQK MADLRQLVTEHAQLVQ IKKTE+DAALHPLLQEIYRDMY			468

Figura 8.- Alineamiento de secuencias aminoacídicas de xPPARα y hPPARα. En la fila central se muestran los residuos conservados entre ambas secuencias y con “+” se muestran los cambios semiconservados.

A través de una revisión bibliográfica la estructura humana 5U09 (hCB1) extraída de Protein Data Bank PDB (código 5U09), resolución de 2.6 Å obtenida mediante cristalografía y difracción de rayos X (Shao et al., 2016) fue seleccionada como molde para construir nuestro modelo de xCB1. Posteriormente se procedió a alinear la secuencia de 5U09 vs xCB1 y eliminado en el molde los residuos pertenecientes a componentes usados para la cristalización (glicógeno sintasa) de la secuencia del cristal 5U09 en base a la referencia de xCB1 (Figura 9).

```

xenopus_cb1      FKDTDDNVQCCKNFMDMECFMILTPSQQLVIAALSIIILGFTFTVLENMLVLVVIVQSRSLR      60
5U09_corregido  GKENEENIQCGENFMDIECFMVLNPSQQLAIAVLSLTGFTFTVLENLLVLCVILHSRSLR      60
                *:.:.*:***.***.***.*.***.*.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***
                *:.:.*:***.***.***.*.***.*.***.***.***.***.***.***.***.***

xenopus_cb1      CRPSYHFIGSLAVADLLGSVIFVYSFVDFHVFHRKDSNPVFLFKLGGVTASFTASVGSFLF      120
5U09_corregido  CRPSYHFIGSLAVADLLGSVIFVYSFIDFHFVHRKDSRNVFLFKLGGVTASFTASVGSFLF      120
                *****.***** ***** *****

xenopus_cb1      LTAIDRYISIHPRMSYKRIVTRTKAVIAFCMMWTIAIVIAVLPFLGWNCIKLRSVCSDF      180
5U09_corregido  LAAIDRYISIHPRPLAYKRIVTRPKAVVAFCLMWTIAIVIAVLPPLLGNWCKELQSVCSDF      180
                *:.*****.:.***** **.*.***.*****.*** **.*.*****

xenopus_cb1      PLIDETYLMFWIGVTSVLLLLFIVYAYMYILWKAHNHAVRMLQRGTQKSIIVHTSEDGKVH      240
5U09_corregido  PHIDETYLMFWIGVTSVLLLLFIVYAYMYILWKA-----                      213
                * *****

xenopus_cb1      ITRPDQTRMDIRLAKTLVLIILVVLIIICWGPLMIMVYDVFVGKINKTIKTVFAFCSVLCLL      300
5U09_corregido  ---DQARMDIRLAKTLVLIILVVLIIICWGPLMIMVYDVFVGKMNKLIKTVFAFCSMLCLL      269
                *:.*****.*****.*****.*** *****.***

xenopus_cb1      NSTVNPIIYALRSKDLRNFACSMFSPCQGTAPLDNSMESDCQ 343
5U09_corregido  NSTVNPIIYALRSKDLRHAFRSMFSPCEGTAPPHHHHHHHHH 312
                *****.*.*** *****.*** .: .: .:

```

Figura 9.- Alineamiento de secuencias aminoacídicas de xCB1 y 5U09 corregido. Los guiones (-) representan aminoácidos de la secuencia de xCB1 ausentes (gaps) en la estructura de 5U09.

Con dicha secuencia de 5U09 corregida y nuestra secuencia aminoacídica de referencia de xCB1, el programa Modeller versión 10.4 (Webb & Sali, 2016) generó 100 modelos de xCB1 donde se seleccionó el modelo con la puntuación más baja de energía al ser evaluados con DOPE (Shen & Sali,

2006) el cual calcula la energía sumando los potenciales estadísticos para todas las interacciones de pares de átomos en el modelo.

Para el caso de xPPAR α se trabajó con la inteligencia artificial Alphafold a través de su interfaz web (Jumper et al., 2021) la cual generó un modelo predictivo de xPPAR α , denominado AF-P37232-F1. Dado que ese modelo presentaba zonas de baja confiabilidad solo fue seleccionado el LBD correspondiente a los aminoácidos 206-474, ya que esta región es la requerida para evaluar la interacción con su ligando.

3.2 Preparación del ligando.

Las estructuras de CBD (CID: 644019) (PM: 314.5 g/mol), GW6471 (CID: 446738) (PM: 619.7 g/mol), Taranabant (CID 11226090) (PM: 516.0 g/mol) y Ácido araquidónico (CID: 444899) (PM: 304.5 g/mol) se obtuvieron de la base de datos de PubChem y fueron preparadas usando el programa LigPrep (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2022) lo que incluyó generar sus estados de ionización a pH $7 \pm 0,2$, y posibles conformeros para cada molécula.

3.3 Preparación de proteínas.

Previo a su utilización, a cada estructura y modelo se eliminaron las moléculas de H₂O para evitar que moléculas no estructurales enmascaren la unión ligando-proteína, también se agregaron cadenas laterales e hidrógenos faltantes y en caso de ser necesario se crearon los puentes disulfuro, junto a los correspondientes estados de protonación de las proteínas a pH $7 \pm 0,2$ utilizando el módulo *Protein Preparation Wizard*, parte del programa Maestro (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2022).

3.4 Generación de grilla.

La grilla para la interacción con las moléculas se generó con el programa Glide (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2022). Los aminoácidos que se seleccionaron como referencia para la realización de las distintas grillas fue obtenida mediante el análisis de las estructuras de los complejos identificando los aminoácidos a menos de 4 Å de cada molécula presente en su estructura, resumidas en la Tabla 2. Se crearon con un tamaño de 20 Å y un centroide (o grilla interna) de 10 Å

Tabla 2.- Información de Proteínas utilizadas en el trabajo.

Proteína	Código PDB	Especie	Resolución	Unido a	Referencia
CB1	5XRA	<i>H. sapien</i>	2.80 Å	CBD	(Tham et al., 2019)
PPAR α	6LX9	<i>H. sapiens</i>	1.4 Å	Ácido araquidónico	(Kamata et al., 2020)
PPAR α	1KKQ	<i>H. sapiens</i>	3.0 Å	GW6471	(Xu et al., 2002)

3.4.1 Bolsillo alostérico xCB1

La ubicación de la grilla en xCB1 se obtuvo del análisis de docking realizados por Tham et al., (2019) donde se determinaron los aminoácidos

que interactúan directamente con CBD a una distancia al menos de 4 Å del ligando, los residuos seleccionados fueron Phe170, Phe286, Leu359 y Phe379.

3.4.2 Bolsillo ortostérico LBD-xPPAR α

En base a que el ácido araquidónico corresponde a un agonista natural de PPAR (O'Sullivan, 2016), se construyó una grilla en base a los residuos de contacto (4 Å) del Acido araquidónico en la estructura de hPPAR α (6LX9) (Kamata et al., 2020) y corresponden a Ile247, Leu253, Ala256, Glu257, Leu260, Val261, Ile278, Phe279, Cys281, Cys282, Gln283, Thr285, Ser286, Tyr320, Phe324, Leu327, Met336, Val338, Ala339, Ile245, Met360, Met361, His446, Val450, Leu466, Tyr470.

3.5 Docking proteína-ligando

Para predecir la interacción xCB1-CBD y xPPAR α -CBD/GW6471 se realizó una simulación de docking proteína-ligando utilizando el programa Glide (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2022), ocupando las grillas definidas para sus respectivas proteínas. Los parámetros de interacción se realizaron manteniendo la proteína rígida y los ligandos como moléculas flexibles con precisión extra (XP).

Los complejos generados se clasificaron en función de las energías de afinidad expresadas en kcal/mol que corresponden al valor de *docking score*. El análisis de las interacciones xCB1-CBD y xPPAR α -CBD/GW6471, y el cálculo de los parámetros energéticos fueron realizados en el programa Glide (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016). Adicionalmente, el ΔG de unión

teórico fue predicho a través del cálculo de energía MM-GBSA utilizando el programa Prime (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2022). Todas las imágenes fueron creadas y visualizadas en PyMOL versión 1.7 (DeLano, 2002).

Para poder validar las grillas se realizaron estrategias de redocking para calcular los docking score y ΔG teórico de las estructuras de referencia de hCB1 (5U09) y hPPAR α (6LX9, 1KKQ), utilizando el programa Glide (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2022), ocupando grillas hechas en base a los residuos de interacción (4 Å) de los ligandos CBD/GW6471 en sus respectivas estructuras.

4. Tratamientos farmacológicos

Con el objetivo de evaluar el efecto de CBD y de GW6471 un bloqueador farmacológico específico de PPAR α en el proceso de neurulación de *Xenopus laevis* se decidió por realizar tratamientos farmacológicos con estos fármacos exclusivamente durante el proceso de neurulación (Figura 10).

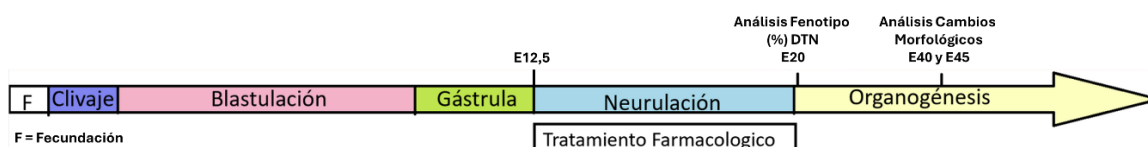


Figura 10.- Representación esquemática del procedimiento realizado para tratamientos farmacológicos. Los tratamientos farmacológicos son realizados exclusivamente durante el proceso de neurulación (E12,5-E20). Al término de los tratamientos en estadio 20 (E20) y en los estadios 40 (E40) y 45 (E45) se realizan inspecciones ópticas y toma de fotografías para analizar los distintos cambios en las muestras.

4.1 Evaluación fenotípica de los tratamientos farmacológicos

4.1.1 CBD

Se incubaron embriones a partir de estadio 12,5 (E12,5) en MMR 10% en una placa de cultivo de 12 pocillos con diferentes concentraciones de CBD disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) (1, 3, 10, 30 y 100 μ M de CBD), y una vez que los embriones llegaron a estadio 20 (E20) fueron sacados del medio de tratamiento, lavados con MMR 10% y dejados en esa solución hasta estadio 45 (E45) (renacuajo). Como control positivo, se ocupó un pocillo con MMR 10% + DMSO 1% y como control negativo se ocupó un pocillo con MMR 10%. El CBD fue proporcionado por el Dr. Fernando Sepúlveda. Los experimentos tienen 3 réplicas experimentales con 8 embriones por pocillo de tratamiento.

4.1.2 GW6471

Se incubaron embriones a partir de E12,5 en MMR 10% en una placa de cultivo de 12 pocillos con diferentes concentraciones: 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 y 100 μ M de GW6471 disuelto en DMSO 1%, un antagonista completo de PPAR α , y una vez que los embriones llegaron a E20 fueron sacados del medio de tratamiento, lavados con MMR 10% y dejados en esa solución hasta E45 (renacuajo). Como control positivo, se ocupó un pocillo con MMR 10%+DMSO 1% y como control negativo se ocupó un pocillo con MMR 10%. Los experimentos tienen 3 réplicas experimentales con 10 embriones por pocillo de tratamiento.

4.2 Análisis y adquisición de imágenes.

El análisis y adquisición de imágenes se realizó en un estéreo microscopio NIKON modelo SMZ25, acoplado a una cámara campo claro Amscope. Se procedió a fotografiar a embriones en E20 (aumento de 1X) y renacuajos de estadio 40 (E40) (aumento de 0.63X) y E45 (aumento de 0.63X), en los cuales se determinó los efectos e implicaciones morfológicas en el proceso de neurulación.

Para la clasificación de fenotipo normal o anormal se realizaron inspecciones ópticas en los estadios 20, 40 y 45 además de un posterior análisis fotográfico. Debido a la heterogeneidad de los fenotipos, características como acortamiento y/o desviaciones del eje anteroposterior, presencia de edemas o corpúsculos, ausencia o disminución en tamaño de ojos fueron clasificados como fenotipo anormal. Con el propósito de cuantificar el EC50 preliminar de CBD, se utilizó el programa ImageJ (Schneider et al., 2012) para determinar el porcentaje de fenotipo alterado.

5. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media \pm error estándar y las diferencias significativas se determinaron mediante ANOVA unidireccional (no paramétrico) con pruebas de comparación múltiple de Dunnett y Bonferroni. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos utilizando el Software GraphPad Prism 8.0.

VI.- Resultados

Objetivo 1: “Evaluar la presencia de transcritos de componentes pertenecientes al SEC como CB1, NAPE-PLD y DAGL α y otros blancos de interés relacionados como PPAR α , PPAR γ y TRPV1 en diferentes estadios asociados al proceso de neurulación de *Xenopus laevis* mediante qRT-PCR”.

1. Perfil de expresión del SEC, TRPV1, PPAR α y PPAR γ en el proceso de neurulación de *Xenopus laevis*.

Los resultados evidencian la expresión de transcritos de CB1, NAPE-PLD, DAGL α , TRPV1, PPAR α y PPAR γ en estadios de neurulación temprana (12,5), intermedia (14) y tardía (20) de *Xenopus laevis*.

Los patrones de migración electroforéticos observados en los diferentes estadios (Figura 11), son similares a los patrones observados en el control positivo de cerebro adulto (CA), demostrando especificidad de los partidores reportados en la Tabla 1.

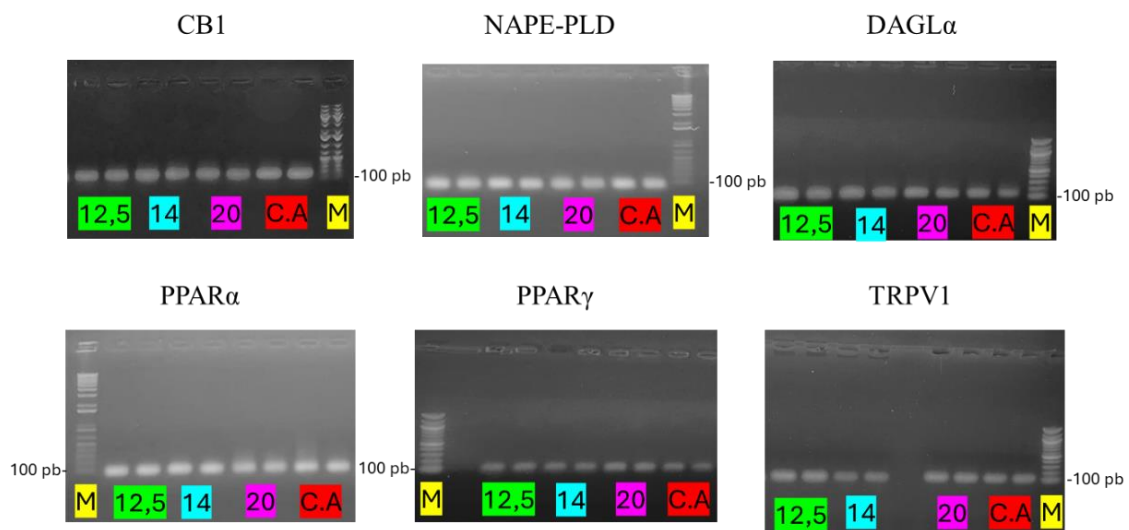


Figura 11.- Electroforesis en gel de agarosa de productos de qRT-PCR. Geles de agarosa con bandas de amplicones revelando la presencia de CB1, NAPE-PLD, DAGL α , PPAR α , PPAR γ y TRPV1 en todos los templados evaluados de *Xenopus Laevis*. (M) marcador de peso molecular 100 pb.

Para la cuantificación por RT-qPCR de CB1, NAPE-PLD, DAGL α , TRPV1, PPAR α y PPAR γ , se determinó el número de ciclos requeridos para amplificar cada gen sobre el ciclo umbral (Ct) en relación con el gen de referencia Sub-1 (Mughal et al., 2018). Los resultados fueron expresados aplicando el método Δ Ct en el cual la cantidad de ADNc fue expresada como X veces sobre la muestra utilizada como referencia Sub-1 (Mughal et al., 2018) y posteriormente se implementó el método $\Delta\Delta$ Ct, normalizando los datos al E12,5 (Figura 12). El Ct es inversamente proporcional al número de copias del templado lo que indica a mayor número de copias de templado, menor Ct medido.

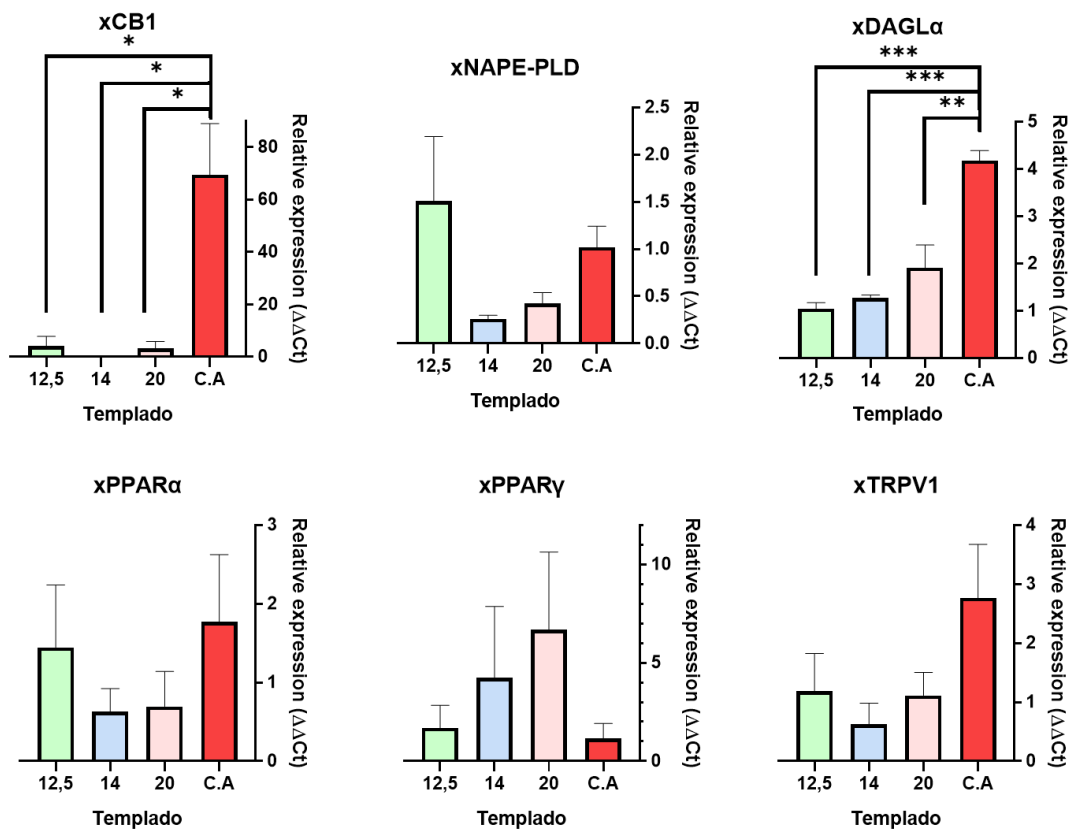


Figura 12.- Patrón de expresión relativa de CB1, NAPE-PLD, DAGLα, PPARα, PPARγ y TRPV1 en todos los templados evaluados de *Xenopus laevis*. La expresión transcripcional de los genes fue normalizada al gen control sub-1. ANOVA de una vía, corrección de Dunnett, (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$). Las barras de error para los datos representan el error estándar.

Los genes CB1 y DAGLα demostraron diferencias estadísticamente significativas de expresión entre neurulación y C.A. Por su parte NAPE-PLD, TRPV1, PPARα y PPARγ no mostraron cambios estadísticamente significativos comparando los diferentes estadios evaluados, pero si se logró detectar la presencia de sus transcritos en todas las etapas evaluadas.

CB1 demostró la presencia de ARNm en estadios neurulativos, siendo considerablemente más baja que en cerebro adulto (Figura 12). A pesar de esto, su promedio de expresión relativa en neurulación no es menor, al ser

comparada con la de los genes estudiados en este trabajo, solamente siendo superado por PPAR γ (Figura 13).

Por otro lado, NAPE-PLD presenta su nivel de expresión más alto en E12,5, siendo incluso mayor que el de cerebro adulto, sin embargo, desciende súbitamente en E14 para posteriormente subir levemente en E20 (Figura 12).

En cuanto a DAGL α , su nivel de expresión en neurulación es más bajo en comparación a cerebro adulto, alcanzando su máximo en E20, aunque este es aproximadamente la mitad de la expresión observada en cerebro adulto.

En el caso PPAR α su mayor expresión relativa durante la neurulación se observa al comienzo de esta en E12,5 siendo muy cercana a la de cerebro adulto. Posteriormente en E14 y E20 su expresión disminuye a aproximadamente la mitad de lo observado en E12,5 (Figura 12).

Por su parte PPAR γ demuestra un mayor nivel de expresión relativa durante la neurulación en comparación con su expresión en cerebro adulto, alcanzando su pico en E20, momento de término del cierre del tubo neural (Figura 12). Además, PPAR γ presenta el mayor promedio de expresión relativa en neurulación entre todos los transcritos evaluados (Figura 13).

Finalmente, TRPV1 demuestra un menor nivel de expresión relativa en neurulación en comparación con cerebro adulto, manteniendo una expresión relativamente constante en los diferentes estadios asociados al proceso de neurulación (Figura 12).

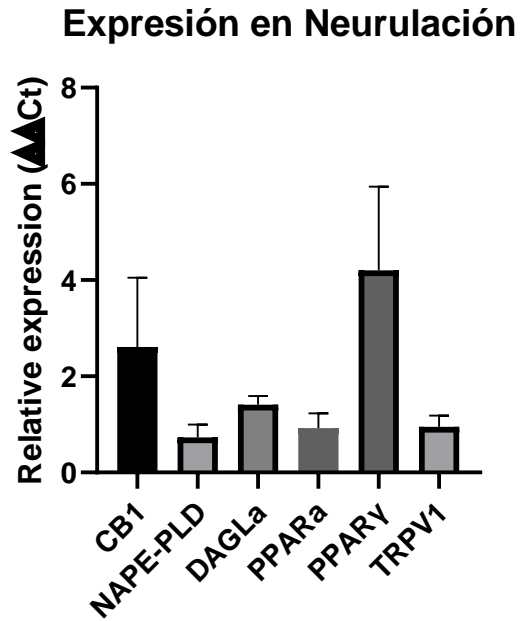


Figura 13.- Patrón de expresión relativa de CB1, NAPE-PLD, DAGLa, PPARα, PPARγ y TRPV1 en Neurulación. Se muestra el promedio de los valores de expresión relativa de los transcritos de interés en neurulación (desde E12,5 – E20). Las barras de los datos representan el error estándar.

Objetivo 2: “Evaluar la capacidad de interacción de xCB1-CBD y xPPAR α -CBD/GW6471 a través de la elaboración de modelos bioinformáticos predictivos”.

2.1 Predicciones computacionales: Modelamiento molecular.

Para evaluar la interacción proteína-ligando de xCB1-CBD, se comenzó por realizar un modelo representativo de xCB1 (Figura 14) utilizando la estructura de hCB1 como molde utilizando Modeller 10.4 (Webb & Sali, 2016). Fueron construidos 100 modelos predictivos de xCB1 siendo elegido el modelo con menor puntuación de energía al ser evaluado con DOPE (Shen & Sali, 2006).

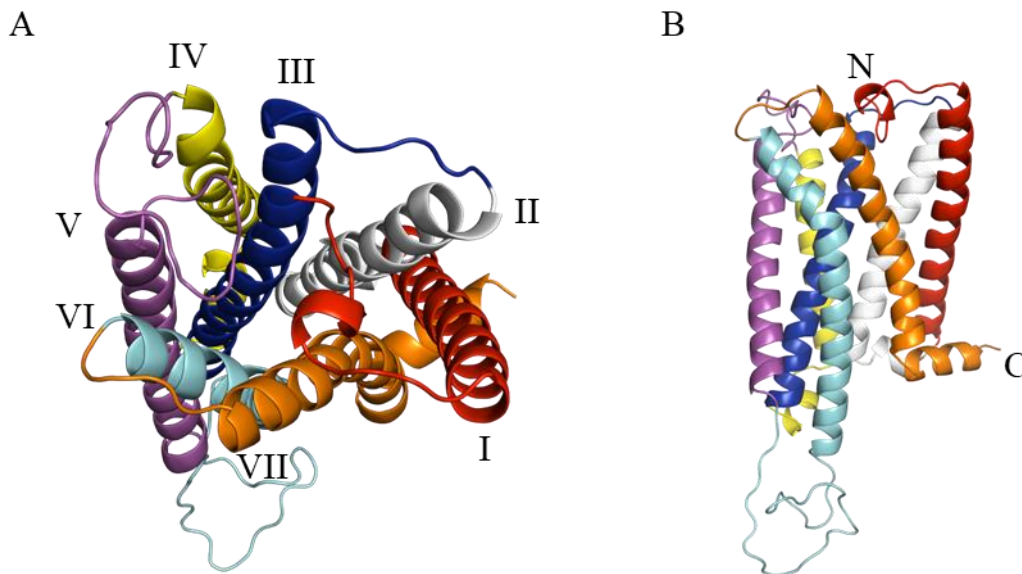


Figura 14.- Modelo predictivo seleccionado de xCB1. A. Vista extracelular de xCB1. B. Vista intermembrana de xCB1. En números romanos se enumeran los dominios transmembrana, (N) extremo N-terminal y (C) extremo C-Terminal.

El modelo de xPPAR α , fue generado por Alphafold (Jumper et al., 2021) el cual se encargó de generar un modelo predictivo de xPPAR α (Figura 15), resultando en la estructura modelo denominada AF-P37232-F1, de la que solo seleccionamos para los análisis posteriores el dominio de unión a ligando (LBD).

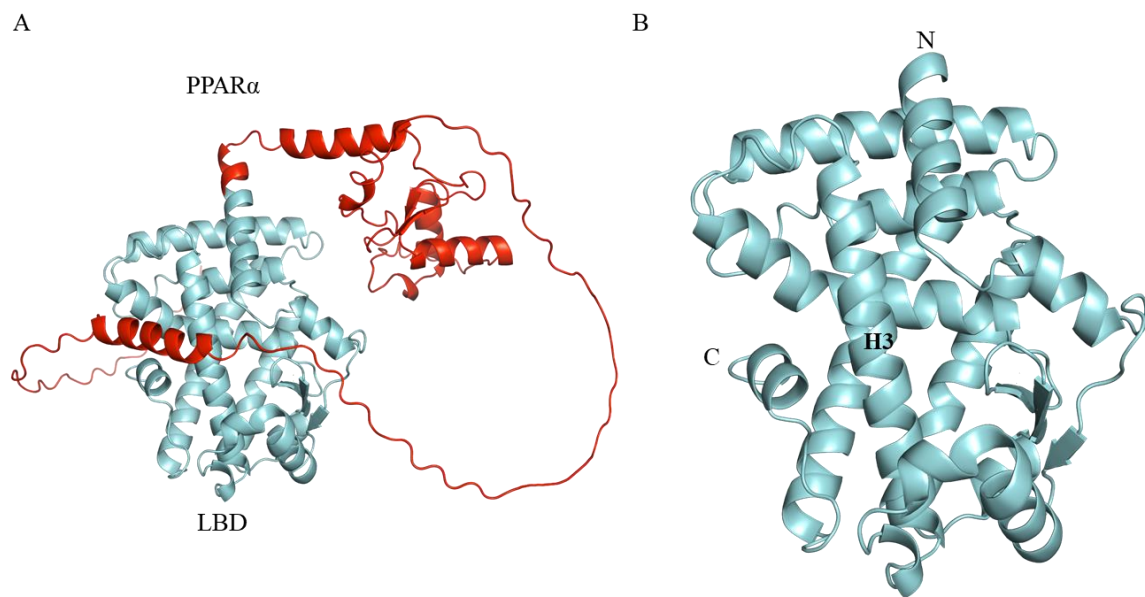


Figura 15.- Modelo predictivo seleccionado de xPPAR α -LBD. A. Representación de xPPAR α completo. En rojo se marcan aminoácidos con un porcentaje de confianza menor a 90% en su modelamiento en Alphafold, además los aminoácidos marcados no constituyen el dominio de unión a ligando en xPPAR α y fueron eliminados del modelo final. B. Representación del dominio de unión a ligando (LBD) de xPPAR α . (N) extremo N-terminal. (C) extremo C-terminal. (H3) hélice alfa 3.

2.2 Simulaciones de Docking molecular y ReDockings

Los docking proteína-ligando fueron realizados ejecutando el programa Glide (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016), usando las grillas correspondientes para cada proteína.

Para seleccionar los complejos de docking molecular elegidos para representar las uniones de xCBD y xPPAR α con los respectivos ligandos ocupados en este trabajo, se seleccionaron los complejos predictivos con menor valor de ΔG de enlace teórico, de entre los complejos con menor puntuación de docking score. Los complejos seleccionados para representar las interacciones proteína-ligando entre xCB1-CBD y xPPAR α -CBD/GW6471 se muestran en la Figura 16. Estos complejos demuestran que CBD es capaz de unirse a xCB1 ubicándose entre sus 7 dominios transmembrana. Para el caso de xPPAR α , CBD y GW6471 se unen a la estructura rodeando a la hélice alfa 3.

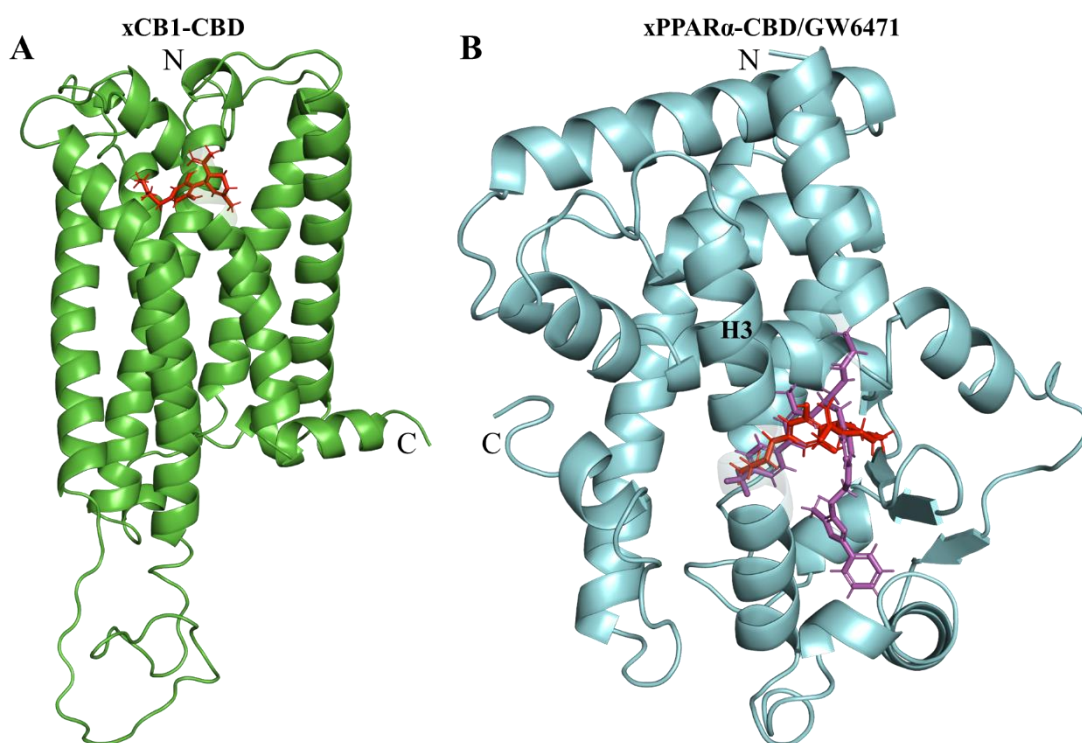


Figura 16: Acoplamiento molecular entre xCB1 unido a CBD y entre xPPAR α unido a CBD y GW6471. A. Interacción representativa entre xCB1 (Verde) y CBD (rojo). B. Interacción representativa entre xPPAR α y CBD (rojo) - GW6471 (magenta). (N) extremo N-terminal, (C) extremo C-Terminal y (H3) hélice alfa 3.

Una vez obtenidos los complejos óptimos, se procede a validar los residuos que se encuentran interactuando con el ligando y los tipos de enlace que forman. Para ello se utilizó el módulo Ligand Interaction Diagram, parte del programa Maestro (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2022), que realizó la caracterización 2D de los distintos complejos (Figuras 17 - B, 18 - B y 20 - B).

En la Figura 17 - A, se compara la estructura hCB1 y nuestro complejo de xCB1 con la energía y orientación más estable, estando unidos a CBD. Ambas estructuras presentan interacciones compartidas con los residuos

Phe170, Leu193, Val196, Thr197, Phe268, Trp279, Trp356, Leu359, Met363, Phe379, Ser383 y Cys386 (Figura 17 - B).

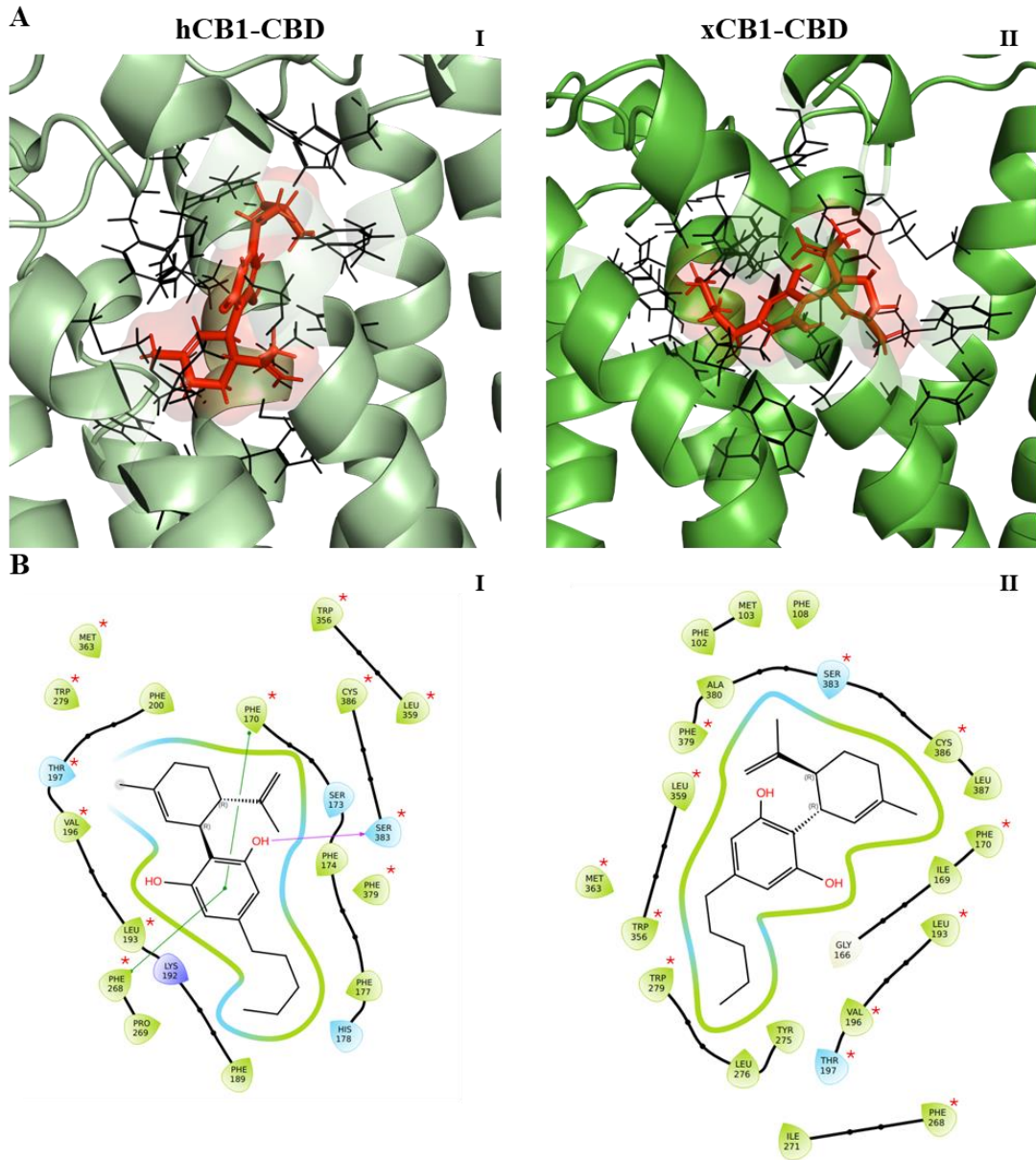


Figura 17: Acoplamiento molecular entre hCB1 unido a CBD y xCB1 unido a CBD. A. Interacción representativa entre hCB1(verde claro)-CBD (rojo) (I) y xCB1 (verde)-CBD (rojo) (II). En líneas negras se muestra la cadena secundaria de los residuos a una distancia de 4 Å de CBD. B. Diagrama 2D de las interacciones identificadas para hCB1-CBD (I) y xCB1-CBD (II). Se muestra de forma esquemática los residuos del sitio de unión a CBD que interactúan con hCB1 y xCB1, coloreados según sus propiedades

fisicoquímicas, verde indica residuo hidrofóbico, celeste indica residuo polar y azul indica residuo con carga positiva. Las flechas indican la direccionalidad del enlace de hidrógeno (puente de hidrógeno), la línea verde indica enlace Pi-Pi y marcados con un * en rojo se remarcan los residuos de interacción comunes entre estructuras.

La estructura xPPAR α demostró capacidad para unirse a CBD (Figura 18, A.II) presentando interacciones compartidas con hPPAR α en los residuos Cys282, Thr285, Ser286, Ile/Met323, Phe324, Leu327, Val330, Met336, Leu337, Val338, Ala339, Tyr340, Ile/Met360 y Met361 (Fig.- 18 - B). El ligando CBD presenta una interacción directa sobre el residuo Thr289 estableciendo un puente de hidrogeno en la estructura de xPPAR α .

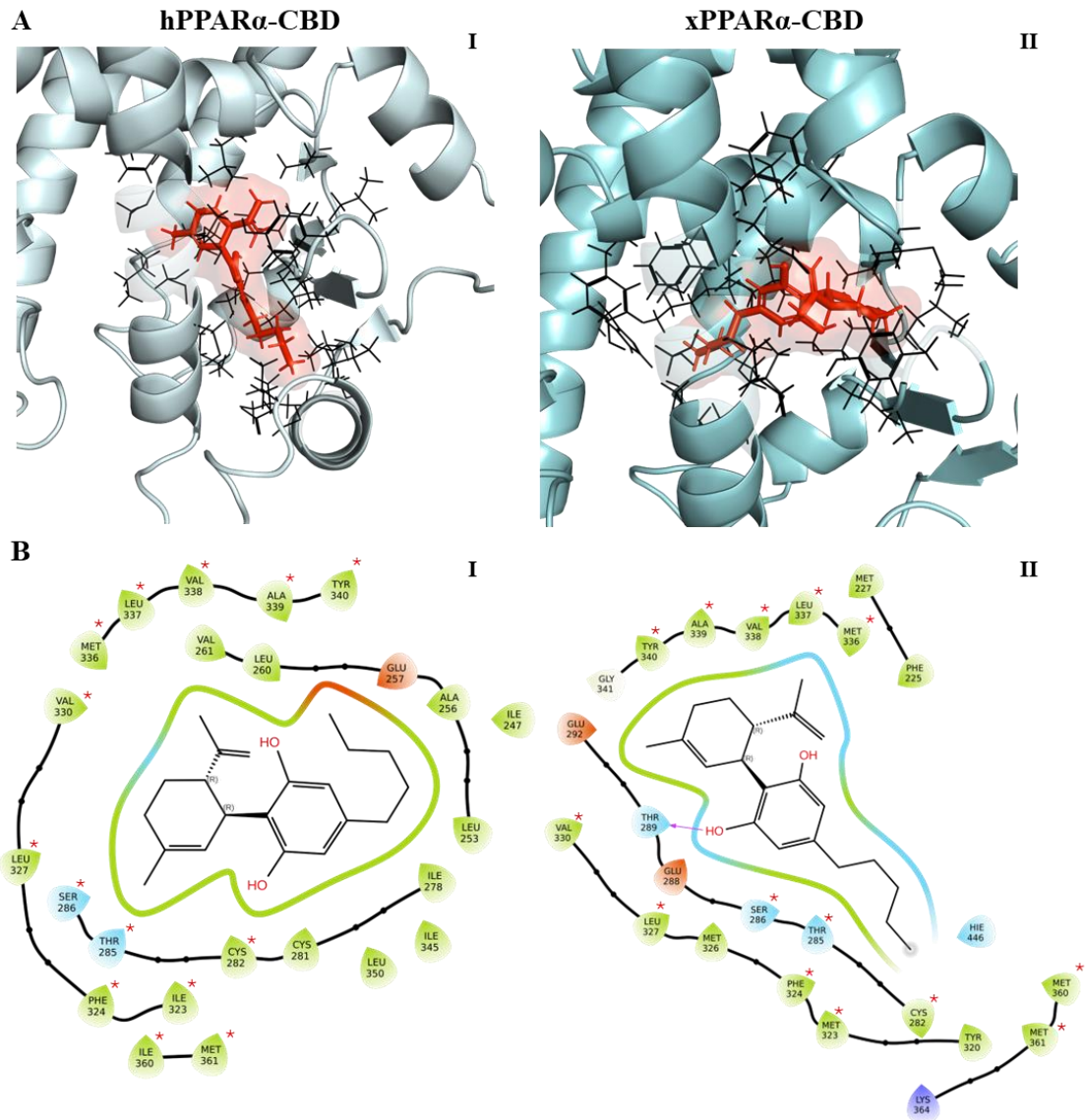


Figura 18: Acoplamiento molecular entre hPPAR α unido a CBD y entre xPPAR α unido a CBD. A. Interacción representativa entre hPPAR α (celeste claro)-CBD (rojo) (I) y xPPAR α (celeste)-CBD (rojo) (II). En líneas negras se muestra la cadena secundaria de los residuos a una distancia de 4 Å de CBD. B. Diagrama 2D de las interacciones identificadas para hPPAR α -CBD (I) y para xPPAR α -CBD (II). Se muestra de forma esquemática los residuos del sitio de unión a CBD que interactúan con hPPAR α y xPPAR α , coloreados según sus propiedades fisicoquímicas, verde indica residuo hidrofóbico, celeste indica residuo polar, azul indica residuo con carga positiva y rojo indica residuo con carga negativa. Las flechas indican la direccionalidad del enlace de hidrógeno (puente de hidrógeno) y marcados con un * en rojo se remarcan los residuos de interacción comunes entre estructuras.

Los resultados del docking score de xCB1 en unión con CBD (Figura 19) fueron similares a los de la estructura de hCB1 unida a CBD, siendo levemente menor xCB1 (-10.6 Kcal/mol para hCB1 y -9.1 Kcal/mol para xCB1).

Por otro lado, el docking score de PPAR α unido a CBD fue de -5.6 Kcal/mol para xPPAR α vs un -7.1 Kcal/mol de hPPAR α .

Los resultados del cálculo de ΔG de enlace teórico a través del método MM-GBSA revelaron que CBD puede unirse a xCB1 con una energía libre de unión de -48.5 Kcal/mol, siendo levemente mayor (más débil) que el ΔG de enlace teórico de la estructura control hCB1 unido a CBD el cual fue de -58.9 Kcal/mol. La estructura de xPPAR α unida a CBD revelo un ΔG teórico sumamente similar al de hPPAR α siendo de -53.2 Kcal/mol para xPPAR α y de -52.5 Kcal/mol para hPPAR α .

A

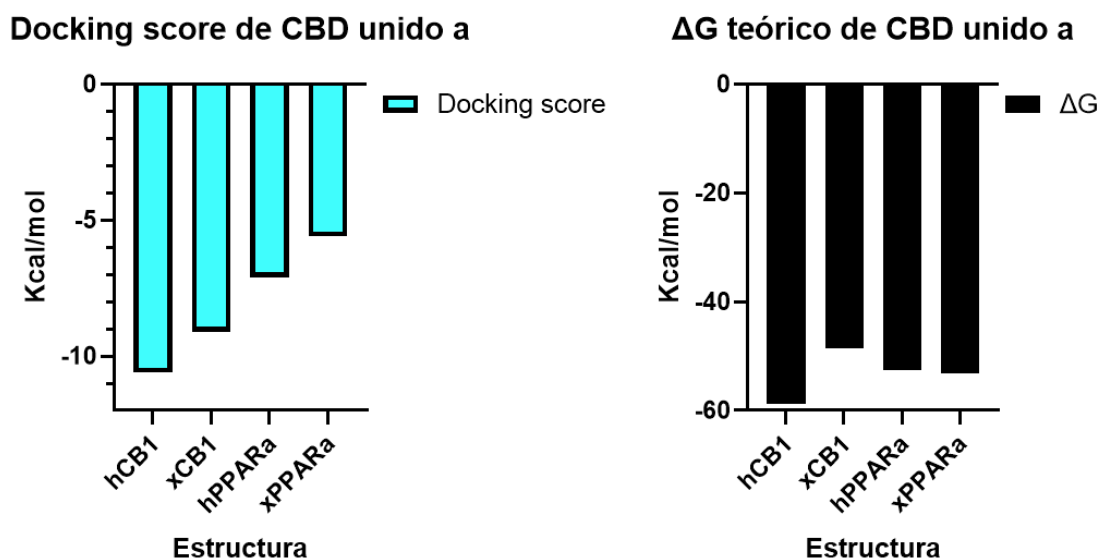


Figura 19: Gráficos de puntuación de Docking score y ΔG teórico de CBD. A. Gráficos de puntuación de Docking score y ΔG de CBD unido a las estructuras predictivas (xCB1 y xPPAR α) y las estructuras control (hCB1 y hPPAR α).

En la Figura 20 - A se observa la estructura control hPPAR α y nuestro complejo de xPPAR α con la energía y orientación más estable, ambos unidos a GW6471. Ambas estructuras presentan interacciones compartidas con los residuos Ile278, Cys281, Cys282, Thr285, Ser286, Thr289, Tyr320, Ile/Met323, Phe324, Leu327, Met336, Val338, Ile345, Met360, Ile/Met361 y Hie446 (Figura 20 - B).

En cuanto a la interacción proteína-ligando entre xPPAR α unido a GW6471 (Figura 20 - C), nuestros análisis revelaron que posee un docking score de -10.3 Kcal/mol para xPPAR α y -8.8 Kcal/mol para hPPAR α .

El cálculo de ΔG de enlace teórico a través del método MM-GBSA revelaron que GW6471 ha demostrado poseer una energía libre de unión por xPPAR α de -105.3 Kcal/mol, menor (más fuerte) que la de hPPAR α siendo de -62 Kcal/mol (Figura 20 - C).

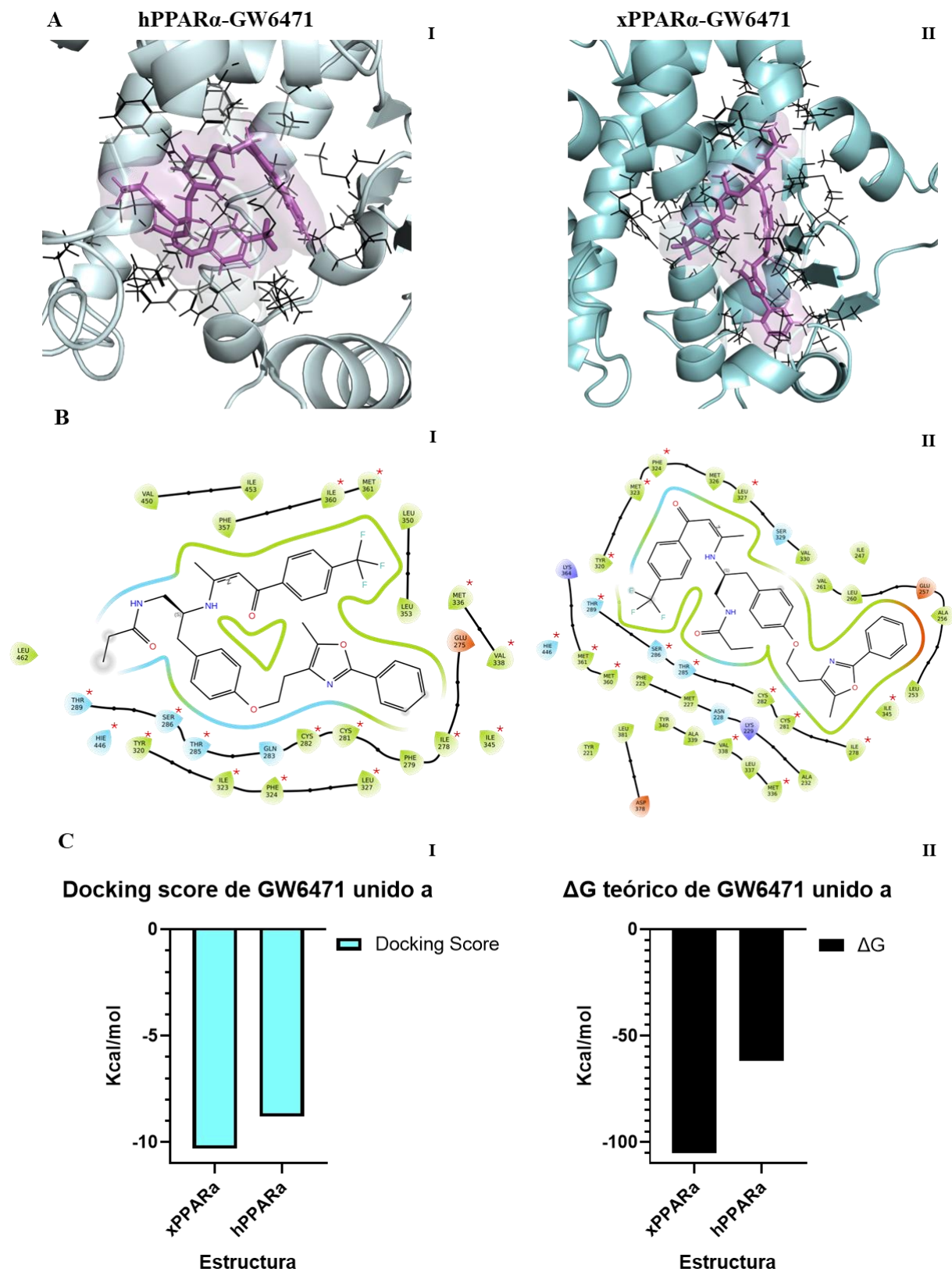


Figura 20: Acoplamiento molecular entre hPPAR α unido a GW6471 y entre xPPAR α unido a GW6471. A. Interacción representativa entre hPPAR α (celeste claro)-GW6471 (magenta) (I) y xPPAR α (celeste)-

GW6471 (magenta) (II). En líneas negras se muestra la cadena secundaria de los residuos a una distancia de 4 Å de GW6471. B. Diagrama 2D de las interacciones identificadas para hPPAR α -GW6471 (I) y xPPAR α -GW6471 (II). Se muestra de forma esquemática los residuos del sitio de unión a GW6471 que interactúan con hPPAR α y xPPAR α , coloreados según sus propiedades fisicoquímicas, verde indica residuo hidrofóbico, celeste indica residuo polar, azul indica residuo con carga positiva y rojo indica residuo con carga negativa. Marcados con un * en rojo se remarcan los residuos de interacción comunes entre estructuras. C. Gráficos de puntuación de Docking score y ΔG de GW6471 unido a la estructura predictiva (xPPAR α) y la estructura control (hPPAR α).

Objetivo 3: “Evaluar el efecto teratógeno de CBD y de GW6471, un bloqueador farmacológico específico de PPAR α en el proceso de neurulación de *Xenopus laevis*”.

3. Tratamientos farmacológicos con CBD y GW6471

Para determinar la participación del sistema endocannabinoide y de PPAR α en el proceso de neurulación de *Xenopus laevis*, se utilizaron los fármacos CBD y GW6471, para evaluar los posibles efectos en etapas tempranas de desarrollo embrionario, específicamente durante los estadios de neurulación (12,5-20) y renacuajo (40-45).

Los ensayos con CBD y GW6471 se realizaron en embriones en E12,5, los cuales fueron incubados en concentraciones crecientes de los fármacos. Los embriones se trataron con estas drogas hasta alcanzar el estadio de neurula tardía (E20). A manera de control se ocuparon pocillos con MMR 10% + DMSO 1 % y a manera de control negativo se ocuparon pocillos con solo MMR 10%.

Los valores asociados a la cuantificación de fenotipo alterado mencionado en la Figura 21 se resumen en las Tablas 3 y 4. Los embriones que fueron tratados con CBD en su mayoría no mostraron cambios morfológicos (cierre incorrecto del tubo) en E20, a excepción de 3 μ M. Renacuajos en E40 en condiciones control y en los pocillos de tratamiento de 1, 3 y 100 μ M mostraron cambios morfológicos, como malformaciones en su eje anteroposterior, presencia de edemas o corpúsculos, ausencia o disminución en tamaño de ojos o muerte. Una vez que los renacuajos llegaron a estadio 45 fue posible observar malformaciones que no habían sido visibles en los estadios anteriores, concentrándose principalmente en los pocillos con

mayor concentración de CBD durante el proceso de tratamiento (Figuras 21 – A y 22).

El tratamiento farmacológico con CBD demostró en E45 diferencias significativas entre el control negativo (MMR 10%) y las concentraciones de 30 y 100 μM . El control positivo (MMR 10% + DMSO 1%) evidenció diferencias significativas con 100 μM y con la concentración de 30 μM evidenció una diferencia marginalmente significativa (Figura 21 - A).

Por su parte, los embriones que fueron tratados con GW6471 mostraron un aumento gradual en la aparición de malformaciones conforme avanzaba su desarrollo, no obstante, no evidenció diferencias estadísticamente significativas al momento de la última evaluación fenotípica en E45 (Figura 21 – B). Además, como se puede observar en la Figura 21 – C en E45, hay una clara diferencia en el porcentaje de anormalidad demostrado por los fármacos en la concentración de 30 μM con un 50 % de anormalidad evidenciado por CBD vs un 10 % de anormalidad demostrado por GW6471.

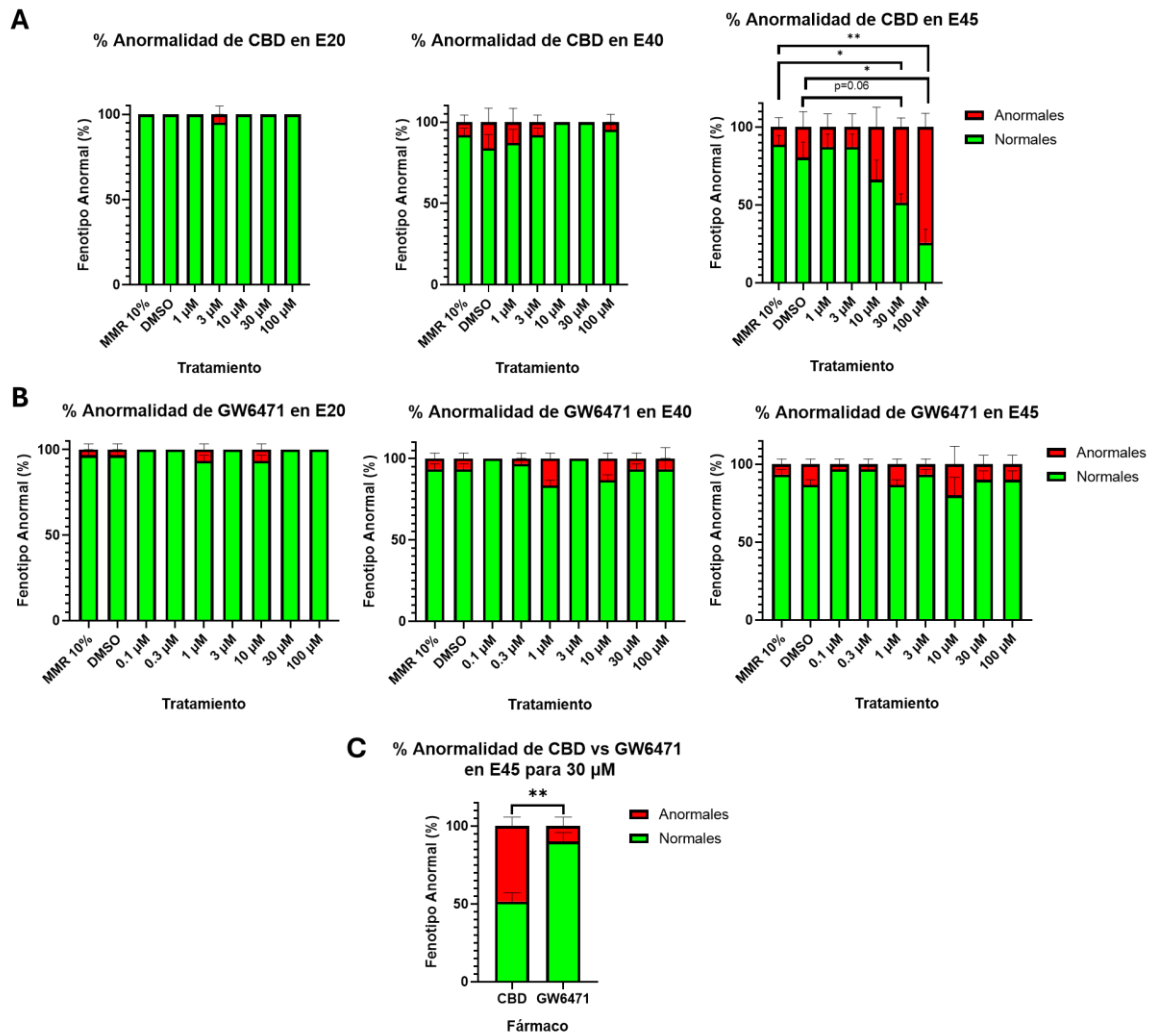


Figura 21.- Histogramas % fenotipo anormal en diversos estadios de desarrollo de *Xenopus laevis*. A. Cuantificación del porcentaje de fenotipo anormal de embriones/renacuajos con concentraciones variables 1 -100 μM de CBD $\text{EC}_{50} = 40.01 \mu\text{M} \pm 10.06$. B. Cuantificación del porcentaje de fenotipo anormal de embriones/renacuajos con concentraciones variables 0.1 -100 μM de GW6471. C. Comparación del porcentaje de anormalidad de renacuajos (E45) tratados con 30 μM de CBD y GW6471. ANOVA de una vía, corrección de Dunnett, (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$). Las barras para los datos representan el error estándar.

Tabla 3.- Porcentaje de embriones con fenotipo alterado en tratamiento con CBD en los diferentes estadios evaluados.

CBD	Porcentaje de anormalidad		
	E20	E40	E45
Tratamiento			
MMR10%	0%	8%	13%
MMR10%+DMSO 1%	0%	17%	21%
1 μ M	0%	13%	13%
3 μ M	4%	8%	13%
10 μ M	0%	0%	33%
30 μ M	0%	0%	50%
100 μ M	0%	4%	75%

Tabla 4.- Porcentaje de embriones con fenotipo alterado en tratamiento con GW6471 en los diferentes estadios evaluados.

GW6471	Porcentaje de anormalidad		
	E20	E40	E45
Tratamiento			
MMR10%	3%	7%	7%
MMR10%+DMSO 1%	3%	7%	13%
0.1 μ M	0%	0%	3%
0.3 μ M	0%	3%	3%
1 μ M	7%	17%	13%
3 μ M	0%	0%	7%
10 μ M	7%	13%	20%
30 μ M	0%	7%	10%
100 μ M	0%	7%	10%

Ambos fármacos demostraron efectos heterogéneos en los embriones/renacuajos que abarcaron desde acortamiento y/o desviaciones del eje anteroposterior, presencia de edemas o corpúsculos, ausencia o disminución en tamaño de ojos, como se muestran en la Figura 22. Los renacuajos sometidos a tratamiento con CBD mostraron efectos fenotípicos significativamente más robustos en comparación con aquellos tratados con GW6471.

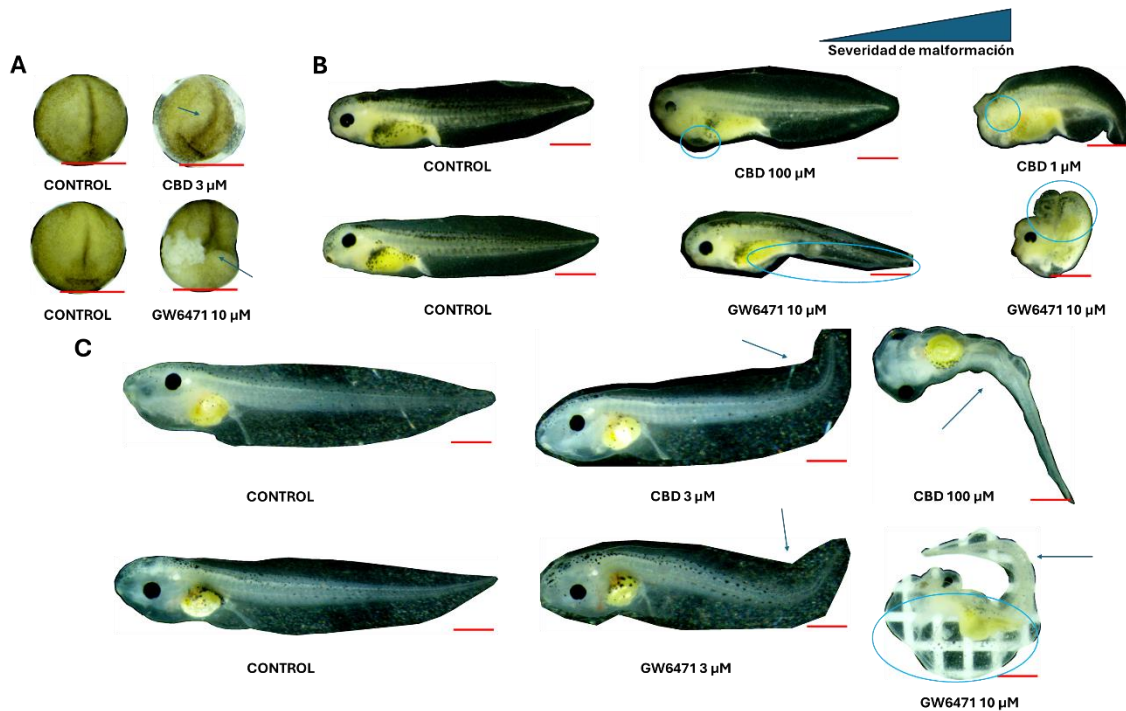


Figura 22: Tratamiento farmacológico con CBD y GW6471 produce DTN. A. Fenotipo morfológico de embriones estadio 20 tratados. B. Fenotipo morfológico renacuajos estadio 40 tratados. C. Fenotipo morfológico de renacuajos estadio 45 tratados. Flechas y circunferencias celestes señalan las malformaciones. Barra de escala de 10 μm .

A través del estudio de fenotipos alterados en base al análisis de los datos obtenidos de CBD, se logró calcular su EC50 preliminar, siendo de $40.01 \mu\text{M} \pm 10.06 \mu\text{M}$ (Figura 23). En contraste, los datos obtenidos de GW6471, no permitieron el cálculo del valor de EC50 debido a la ausencia de un patrón claro en la curva de concentración-respuesta.

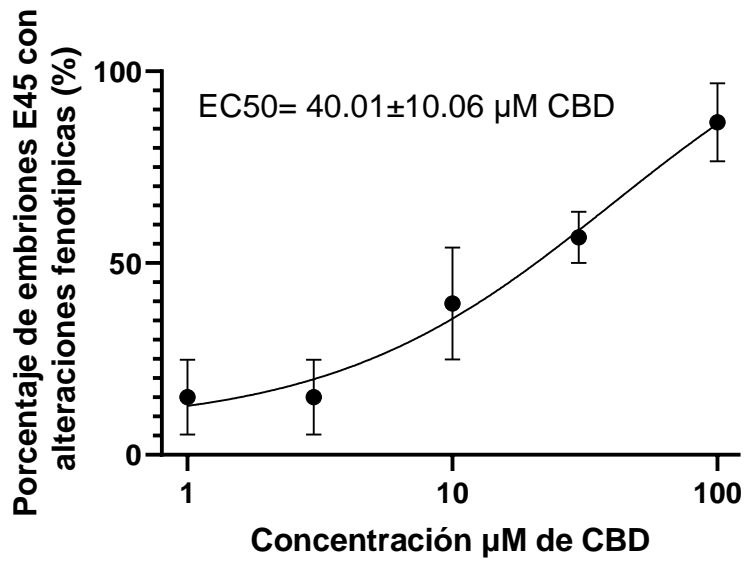


Figura 23: Curva concentración-respuesta del porcentaje de anormalidad de renacuajos en estadio 45 tratados con concentraciones crecientes de CBD (1 μM -100 μM). Las barras para los datos representan el error estándar.

VII.- Discusión

El consumo de *Cannabis sativa* ha aumentado en los últimos años en países como Estados Unidos, (Brown et al., 2017), donde su consumo en mujeres embarazadas es mayor que el de cualquier otra droga ilícita (Volkow et al., 2019). Esta situación es alarmante dado que se ha asociado epidemiológicamente el consumo de marihuana con las principales malformaciones congénitas del SNC, donde se incluyen los DTN en humanos (Reece & Hulse, 2019).

En la actualidad se desconoce el mecanismo que explica como la marihuana afecta en el proceso de cierre del TN, y aunque se han realizado experimentos en modelos animales que nos han permitido comprender un poco acerca de los efectos que el CBD o el THC pueden llegar a producir (Carty et al., 2018; Fish et al., 2019; Gheasuddin & Galea, 2022; Pandelides et al., 2021; Psychoyos et al., 2008), aún hay mucho por esclarecer. Comprender como la señalización endocannabinoide interviene en el proceso de neurulación, es esencial para comprender como los cannabinoides pueden llegar a producir DTN.

1.- Perfil de expresión de componentes del endocannabinoidoma.

El SEC, actualmente llamado endocannabinoidoma (Di Marzo, 2020) corresponde a un sistema de señalización sumamente complejo en el que se encuentran mediadores lipídicos, enzimas como NAPE-PLD y DAGL y proteínas como CB1, PPAR α , PPAR γ y TRPV1

Nuestro trabajo de RT-qPCR demuestra la presencia de todos los transcritos de interés en los distintos templados asociados a las etapas de neurulación evaluadas (Figuras 11 y 12).

A partir de los datos obtenidos de los niveles de expresión relativa de las enzimas NAPE-PLD y DAGL α (relacionadas directamente con la síntesis de endocannabinoides y otras moléculas similares como OEA y PEA) sugerimos que la expresión de estas enzimas en la neurulación de *Xenopus laevis* se debe al gran metabolismo lipídico presente en los embriones (di Marzo, 2011; Mock et al., 2020). Además, nos lleva a pensar en un posible rol biológico de estas enzimas y sus productos en el proceso de neurulación y el neurodesarrollo temprano. Estos hallazgos son consistentes con el trabajo de Psychoyos et al., (2012) en el que los componentes pertenecientes al SEC DAGL α y NAPE-PLD demostraron actividad transcripcional en las etapas de neurulación en modelos de pollo y ratón y donde además detectaron niveles significativos de los endocannabinoides AEA y 2-AG.

Para el caso de CB1 la expresión relativa en neurulación fue más baja a la demostrada en cerebro adulto, lo cual tiene sentido ya que CB1 se considera como el receptor metabotrópico más abundante en el SNC (Howlett et al., 2004; Kendall & Yudowski, 2016); no obstante, su expresión promedio en neurulación sigue siendo considerable, siendo más alta que la de la mayoría de transcritos estudiados en este trabajo (Figura 13). Nuestro trabajo concuerda con Psychoyos et al., (2012) en el que CB1 demostró actividad transcripcional en las etapas de neurulación en modelos de pollo y ratón. Además Migliarini & Carnevali, (2009) también demuestran la presencia de ARNm de CB1 incluso antes de la neurulación en embriones de pez cebra. Estos resultados sugieren un posible rol de CB1 en el proceso de neurulación de *Xenopus laevis* tal como sugiere en su trabajo Mahomed et al., (2023).

En el caso de PPAR α y PPAR γ su presencia en la neurulación de *Xenopus laevis* apoya la idea de que estos receptores participan en la diferenciación celular (O'Sullivan, 2016) y la alta actividad transcripcional de PPAR γ en neurulación comparada a la baja actividad transcripcional en cerebro adulto

se correlaciona con experimentos realizados por Wada et al., (2006) en los que en condiciones fisiológicas encontraron mayores niveles de expresión de PPAR γ en cerebros de embriones de ratón comparados a bajos niveles de expresión en cerebros de ratón adulto. Nuestros resultados (Figuras 12 y 13) sugieren participación de PPAR γ en el proceso de diferenciación neuronal tal como lo plantea Quintanilla et al., (2014).

TRPV1 por su parte, es un canal que al activarse facilita la entrada de iones Ca²⁺ al citoplasma, los principales estudios de este receptor apuntan a la regulación del dolor, no obstante, en la actualidad se piensa que TRPV1 podría desempeñar un papel como regulador de Ca²⁺ durante el desarrollo embrionario (EL Andaloussi-Lilja et al., 2009). Nuestros resultados apoyan esta idea, demostrando expresión relativa de TRPV1 en el proceso de neurulación de *Xenopus laevis*, lo cual contrasta con resultados obtenidos por Son & Ali, (2022) en el que detectan expresión de esta proteína posterior al cierre del tubo neural en el modelo de pez cebra.

2.- Predicciones *in silico* interacciones de CBD-CB1/PPAR α y GW6471-PPAR α .

Los resultados del cálculo de ΔG de enlace teórico a través del método MM-GBSA revelaron que CBD puede unirse a xCB1 y a xPPAR α con una afinidad de -48.5 y -53.2 Kcal/mol respectivamente, lo que nos sugiere que CBD podría unirse de manera favorable estructural y energéticamente a estos receptores.

El porcentaje de identidad entre xCB1 y hCB1 es de un 83% (Figura 7), lo que hace que estructuralmente ambas proteínas conserven características clave para la unión con el modulador alostérico negativo CBD. Esto se

refleja en la afinidad que estos complejos demostraron por el ligando, siendo de -48.5 y -58.9 Kcal/mol para xCB1 y hCB1 respectivamente (Figura 19). Si bien el ligando CBD no se une de la misma manera a ambos complejos, como se puede ver reflejado en la Figura 17 - B (lo cual tiene sentido ya que no son idénticamente la misma proteína), ambos comparten parte de los residuos de unión a CBD lo que concuerda con datos funcionales y predictivos que demuestran que residuos como Phe170, Leu193, Phe379 y Ser383 son críticos para la unión del ligando (Hua et al., 2016, 2017; Tham et al., 2019).

La afinidad predictiva que demostró CBD al unirse a los complejos de xPPAR α y hPPAR α fue sumamente similar, siendo de -53.2 y -52.5 Kcal/mol respectivamente (Figura 19), compartiendo aproximadamente el 50% de los residuos de unión a CBD (Figura 18), indicando que CBD también sería capaz de unirse a estos receptores.

Por su parte GW6471 ha demostrado poseer una afinidad por xPPAR α de -105.3 Kcal/mol (Figura 20 - C) (superando incluso la afinidad por hPPAR α de -62 Kcal/mol) sugiriendo que podría unirse a este receptor de manera estructural y energéticamente favorable. Lo cual es consistente con sus propiedades farmacológicas, ya que se identifica como un antagonista total para hPPAR α . Esta alta afinidad es esperada considerando que hPPAR α y xPPAR α comparten un 81% de identidad (Figura 8), lo que sugiere una conservación significativa de las características estructurales clave que facilitan la unión del antagonista.

GW6471 se unió espacialmente a xPPAR α de manera distinta a como se une en la estructura de hPPAR α obtenida por medio de cristalografía (1KKQ (Xu et al., 2002)) (Figura 20 - B), aun así, comparten gran cantidad de residuos de unión a GW6471. Esto al igual que la manera distinta en la que CBD demostró unirse a xPPAR α y a hPPAR α (Figura 18 - B) puede ser explicado

por la gran amplitud de la cavidad del LBD (Xu et al., 2001) y la flexibilidad de los ligandos. Todos los ligandos se unieron a xPPAR α y a hPPAR α alrededor de H3 (alfa hélice 3).

3.- Tratamiento farmacológico con CBD afecta a la formación del tubo neural.

A través de nuestro trabajo se pudo evidenciar que el CBD administrado durante el proceso de neurulación afecta el cierre correcto del tubo neural de manera dependiente de la concentración en el modelo *Xenopus laevis*, esto nos permite inferir que el CBD altera señalizaciones en néurula que son evidenciadas posteriormente en los renacuajos E45. Este hallazgo concuerda con estudios anteriores en ratones y pez cebra en los que la exposición a altas dosis de CBD durante el desarrollo embrionario provoca alteraciones del desarrollo cerebral y otros efectos teratogénicos (Carty et al., 2018; Fish et al., 2019; Gheasuddin & Galea, 2022). Nuestro trabajo concuerda con el realizado por Carty et al., (2018) en el que la exposición a CBD entre etapas de blástula a larva genero ejes curvos y edemas en embriones de pez cebra (Figura 22).

Los resultados obtenidos en el tratamiento con CBD (Figuras 21 y 22), nos permiten asociar sus efectos (como aparición de fenotipo anormal) a través de la participación de la señalización endocannabinoide. Sin embargo, estos resultados no nos permiten explicar como el CBD afecta al proceso de neurulación.

Cabe recalcar que Pandelides et al., (2021) menciona que en larvas de pez cebra, el tratamiento con CBD altera la transcripción de genes implicados en

la señalización del ácido retinoico, lo que podría explicar parte de los efectos de este fármaco en el proceso de neurulación.

Si bien en los tratamientos farmacológicos con el antagonista selectivo de PPAR α GW6471 se observaron malformaciones en las diferentes concentraciones de fármaco, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre nuestros controles y los tratamientos, sugiriendo que no hay suficiente evidencia para afirmar que GW6471 produce DTN al ser administrado exclusivamente durante la neurulación de *Xenopus laevis*. Hasta ahora nadie había realizado experimentos similares evaluando la participación de PPAR α en el proceso de neurulación en ningún modelo de estudio, por lo que este trabajo aporta información preliminar para futuras investigaciones.

La actividad de los fármacos evaluados en los respectivos receptores es muy probable que ocurra (Figura 17, 18, 19 y 20). Nuestros resultados sugieren que CBD aparenta tener un efecto más robusto y significativo en los fenotipos de los embriones, comparado a los efectos demostrados por GW6471. La robustez de los efectos fenotípicos producidos por CBD en los embriones podría ser explicado por la inespecificidad de esta droga, por lo que probablemente su acción esté mediada por más de un blanco molecular, como puede ser la unión de CBD a CB1 (Figura 17 y 19), a PPAR α (Figura 18 y 19) y potencialmente a PPAR γ y TRPV1, esta es una posibilidad que tiene que ser evaluada en el futuro.

Los datos obtenidos a través de la realización de este trabajo demostraron la presencia en el proceso de neurulación de *Xenopus laevis* de los transcritos de interés pertenecientes al endocannabinoidoma: CB1, NAPE-PLD, DAGL α , PPAR α , PPAR γ y TRPV1, por su parte, los modelos predictivos de xCB1 y xPPAR α nos permiten explicar parcialmente los efectos observados en las Figura 21 y 22, al demostrarnos que son capaces de unirse a CBD y

xPPAR α a GW6471. CBD y GW6471 podrían unirse con parámetros similares a las proteínas tanto humanas como de *Xenopus*. Por último, se evidenció que la administración de CBD en estadios neurulativos de *Xenopus* afecta al cierre correcto del tubo neural de manera dependiente de la concentración. Así también nos reflejó la presencia y participación de la señalización endocannabinoide, mientras que el tratamiento farmacológico con GW6471, no demostró teratogenicidad en los embriones.

VIII.- Conclusión

A través de la realización de este trabajo se pudo evidenciar la presencia en el proceso de neurulación de *Xenopus laevis* de los transcritos: CB1, NAPE-PLD, DAGL α , PPAR α , PPAR γ y TRPV1 pertenecientes al endocannabinoidoma.

CB1 y PPAR α podrían unirse a CBD y PPAR α podría unirse a GW6471 con parámetros similares entre las proteínas humanas y de *Xenopus*.

La administración de CBD durante la neurulación de *Xenopus laevis* afecta el cierre correcto del TN, reflejando la presencia y participación de la señalización endocannabinóide en este proceso. El tratamiento con GW6471, no demostró ser teratogénico al ser administrado durante el proceso de neurulación de *Xenopus*.

IX.- Bibliografía

- Almeida, D. L., & Devi, L. A. (2020). Diversity of molecular targets and signaling pathways for CBD. *Pharmacology Research & Perspectives*, 8(6). <https://doi.org/10.1002/prp2.682>
- Benavides-Rivas, C., Tovar, L. M., Zúñiga, N., Pinto-Borguero, I., Retamal, C., Yévenes, G. E., Moraga-Cid, G., Fuentealba, J., Guzmán, L., Coddou, C., Bascuñán-Godoy, L., & Castro, P. A. (2020). Altered Glutaminase 1 Activity During Neurulation and Its Potential Implications in Neural Tube Defects. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00900>
- Berghuis, P., Rajnicek, A. M., Morozov, Y. M., Ross, R. A., Mulder, J., Urbán, G. M., Monory, K., Marsicano, G., Matteoli, M., Canty, A., Irving, A. J., Katona, I., Yanagawa, Y., Rakic, P., Lutz, B., Mackie, K., & Harkany, T. (2007). Hardwiring the Brain: Endocannabinoids Shape Neuronal Connectivity. *Science*, 316(5828), 1212–1216. <https://doi.org/10.1126/science.1137406>
- Berrendero, F., Sepe, N., Ramos, J. A., Di Marzo, V., & Fernández-Ruiz, J. J. (1999). Analysis of cannabinoid receptor binding and mRNA expression and endogenous cannabinoid contents in the developing rat brain during late gestation and early postnatal period. *Synapse (New York, N.Y.)*, 33(3), 181–191. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2396\(19990901\)33:3<181::AID-SYN3>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2396(19990901)33:3<181::AID-SYN3>3.0.CO;2-R)
- Biggs, J. E., Yates, J. M., Loescher, A. R., Clayton, N. M., Boissonade, F. M., & Robinson, P. P. (2007). Changes in vanilloid receptor 1 (TRPV1) expression following lingual nerve injury. *European Journal of Pain*, 11(2), 192–201. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2006.02.004>
- Bockmann, E. C., Brito, R., Madeira, L. F., da Silva Sampaio, L., de Melo Reis, R. A., França, G. R., & Calaza, K. da C. (2023). The Role of Cannabinoids in CNS Development: Focus on Proliferation and Cell Death. In *Cellular and Molecular Neurobiology* (Vol. 43, Issue 4, pp. 1469–1485). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10571-022-01263-y>
- Borodinsky, L. N. (2017). *Xenopus laevis* as a Model Organism for the Study of Spinal Cord Formation, Development, Function and Regeneration. *Frontiers in Neural Circuits*, 11. <https://doi.org/10.3389/fncir.2017.00090>

- Bouaboula, M., Hilairat, S., Marchand, J., Fajas, L., Fur, G. Le, & Casellas, P. (2005). Anandamide induced PPAR γ transcriptional activation and 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *European Journal of Pharmacology*, *517*(3), 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.05.032>
- Brown, Q. L., Sarvet, A. L., Shmulewitz, D., Martins, S. S., Wall, M. M., & Hasin, D. S. (2017). Trends in Marijuana Use Among Pregnant and Nonpregnant Reproductive-Aged Women, 2002-2014. *JAMA*, *317*(2), 207. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.17383>
- Burren, K. A., Savery, D., Massa, V., Kok, R. M., Scott, J. M., Blom, H. J., Copp, A. J., & Greene, N. D. E. (2008). Gene-environment interactions in the causation of neural tube defects: folate deficiency increases susceptibility conferred by loss of Pax3 function. *Human Molecular Genetics*, *17*(23), 3675–3685. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn262>
- Buschiazio, J., Bruzzone, A., & Alonso, T. S. (2003). Detailed Lipid Analysis of Yolk Platelets of Amphibian (*Bufo arenarum*) Oocytes. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, *297*(2), 189–195. <https://doi.org/10.1002/jez.a.10252>
- Carty, D. R., Thornton, C., Gledhill, J. H., & Willett, K. L. (2018). Developmental Effects of Cannabidiol and Δ^9 -Tetrahydrocannabinol in Zebrafish. *Toxicological Sciences*, *162*(1), 137–145. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx232>
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., & Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, *389*(6653), 816–824. <https://doi.org/10.1038/39807>
- Close, B., Banister, K., Baumans, V., Bernoth, E. M., Bromage, N., Bunyan, J., Erhardt, W., Flecknell, P., Gregory, N., Hackbarth, H., Morton, D., & Warwick, C. (1997). Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. *Laboratory Animals*, *31*(1), 1–32. <https://doi.org/10.1258/002367797780600297>
- Cristino, L., Bisogno, T., & Di Marzo, V. (2020). Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nature Reviews Neurology*, *16*(1), 9–29. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0284-z>

- Davidson, L. A., & Keller, R. E. (1999). Neural tube closure in *Xenopus laevis* involves medial migration, directed protrusive activity, cell intercalation and convergent extension. *Development*, *126*(20), 4547–4556. <https://doi.org/10.1242/dev.126.20.4547>
- Devinsky, O., Patel, A. D., Cross, J. H., Villanueva, V., Wirrell, E. C., Privitera, M., Greenwood, S. M., Roberts, C., Checketts, D., VanLandingham, K. E., Zuberi, S. M., & GWPCARE3 Study Group. (2018). Effect of Cannabidiol on Drop Seizures in the Lennox-Gastaut Syndrome. *The New England Journal of Medicine*, *378*(20), 1888–1897. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1714631>
- Di Marzo, V. (2011). Endocannabinoid signaling in the brain: Biosynthetic mechanisms in the limelight. *Nature Neuroscience*, *14*(1), 9–15. <https://doi.org/10.1038/nn.2720>
- Di Marzo, V. (2020). The endocannabinoidome as a substrate for noneuphoric phytocannabinoid action and gut microbiome dysfunction in neuropsychiatric disorders^[P]_[SEP]. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, *22*(3), 259–269. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2020.22.3/vdimarzo>
- Di Marzo, V., & De Petrocellis, L. (2012). Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *367*(1607), 3216–3228. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0382>
- EL Andaloussi-Lilja, J., Lundqvist, J., & Forsby, A. (2009). TRPV1 expression and activity during retinoic acid-induced neuronal differentiation. *Neurochemistry International*, *55*(8), 768–774. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2009.07.011>
- ElSohly, M. A., & Slade, D. (2005). Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sciences*, *78*(5), 539–548. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.09.011>
- Esposito, G., Scuderi, C., Valenza, M., Togna, G. I., Latina, V., de Filippis, D., Cipriano, M., Carratù, M. R., Iuvone, T., & Steardo, L. (2011). Cannabidiol reduces A β -induced neuroinflammation and promotes hippocampal neurogenesis through PPAR γ involvement. *PLoS ONE*, *6*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028668>
- Fish, E. W., Murdaugh, L. B., Zhang, C., Boschen, K. E., Boa-Amponsem, O., Mendoza-Romero, H. N., Tarpley, M., Chdid, L., Mukhopadhyay, S., Cole, G. J., Williams, K. P., & Parnell, S. E. (2019). Cannabinoids

- Exacerbate Alcohol Teratogenesis by a CB1-Hedgehog Interaction. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52336-w>
- Gerhart, J., & Kirschner, M. (2020). *Normal Table of Xenopus Laevis (Daudin)* (P. D. Nieuwkoop & J. Faber, Eds.). Garland Science. <https://doi.org/10.1201/9781003064565>
- Gheasuddin, Y., & Galea, G. L. (2022). Cannabidiol impairs neural tube closure in mouse whole embryo culture. *Birth Defects Research*. <https://doi.org/10.1002/bdr2.2013>
- Goswami, C., Dreger, M., Otto, H., Schwappach, B., & Hucho, F. (2006). Rapid disassembly of dynamic microtubules upon activation of the capsaicin receptor TRPV1. *Journal of Neurochemistry*, 96(1), 254–266. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03551.x>
- Goswami, C., & Hucho, T. (2007). TRPV1 expression-dependent initiation and regulation of filopodia. *Journal of Neurochemistry*, 103(4), 1319–1333. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04846.x>
- Greene, N. D. E., & Copp, A. J. (2014). Neural tube defects. In *Annual Review of Neuroscience* (Vol. 37, pp. 221–242). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-062012-170354>
- Harkany, T., Guzmán, M., Galve-Roperh, I., Berghuis, P., Devi, L. A., & Mackie, K. (2007). The emerging functions of endocannabinoid signaling during CNS development. *Trends in Pharmacological Sciences*, 28(2), 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.12.004>
- Howlett, A. C., Breivogel, C. S., Childers, S. R., Deadwyler, S. A., Hampson, R. E., & Porrino, L. J. (2004). Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology*, 47, 345–358. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.07.030>
- Hua, T., Vemuri, K., Nikas, S. P., Laprairie, R. B., Wu, Y., Qu, L., Pu, M., Korde, A., Jiang, S., Ho, J.-H., Han, G. W., Ding, K., Li, X., Liu, H., Hanson, M. A., Zhao, S., Bohn, L. M., Makriyannis, A., Stevens, R. C., & Liu, Z.-J. (2017). Crystal structures of agonist-bound human cannabinoid receptor CB1. *Nature*, 547(7664), 468–471. <https://doi.org/10.1038/nature23272>
- Hua, T., Vemuri, K., Pu, M., Qu, L., Han, G. W., Wu, Y., Zhao, S., Shui, W., Li, S., Korde, A., Laprairie, R. B., Stahl, E. L., Ho, J.-H., Zvonok, N., Zhou, H., Kufareva, I., Wu, B., Zhao, Q., Hanson, M. A., ... Liu, Z.-J.

- (2016). Crystal Structure of the Human Cannabinoid Receptor CB1. *Cell*, 167(3), 750-762.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.004>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kamata, S., Oyama, T., Saito, K., Honda, A., Yamamoto, Y., Suda, K., Ishikawa, R., Itoh, T., Watanabe, Y., Shibata, T., Uchida, K., Suematsu, M., & Ishii, I. (2020). PPAR α Ligand-Binding Domain Structures with Endogenous Fatty Acids and Fibrates. *IScience*, 23(11), 101727. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101727>
- Keimpema, E., Barabas, K., Morozov, Y. M., Tortoriello, G., Torii, M., Cameron, G., Yanagawa, Y., Watanabe, M., Mackie, K., & Harkany, T. (2010). Differential subcellular recruitment of monoacylglycerol lipase generates spatial specificity of 2-arachidonoyl glycerol signaling during axonal pathfinding. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(42), 13992–14007. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2126-10.2010>
- Kendall, D. A., & Yudowski, G. A. (2016). Cannabinoid Receptors in the Central Nervous System: Their Signaling and Roles in Disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10, 294. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00294>
- Kozak, K. R., Gupta, R. A., Moody, J. S., Ji, C., Boeglin, W. E., DuBois, R. N., Brash, A. R., & Marnett, L. J. (2002). 15-Lipoxygenase Metabolism of 2-Arachidonoylglycerol. *Journal of Biological Chemistry*, 277(26), 23278–23286. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201084200>
- Krug, R. G., & Clark, K. J. (2015). Elucidating cannabinoid biology in zebrafish (*Danio rerio*). *Gene*, 570(2), 168–179. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.07.036>
- Lam, C. S., Rastegar, S., & Strähle, U. (2006). Distribution of cannabinoid receptor 1 in the CNS of zebrafish. *Neuroscience*, 138(1), 83–95. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.10.069>

- Li, H., Zhang, J., Chen, S., Wang, F., Zhang, T., & Niswander, L. (2018). Genetic contribution of retinoid-related genes to neural tube defects. *Human Mutation*, *39*(4), 550–562. <https://doi.org/10.1002/humu.23397>
- Lindhout, D., Omtzigt, J. G., & Cornel, M. C. (1992). Spectrum of neural-tube defects in 34 infants prenatally exposed to antiepileptic drugs. *Neurology*, *42*(4 Suppl 5), 111–118.
- Lindhout, D., & Schmidt, D. (1986). In-utero exposure to valproate and neural tube defects. *Lancet (London, England)*, *1*(8494), 1392–1393. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(86\)91711-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(86)91711-3)
- Liu, J., Li, H., Burstein, S. H., Zurier, R. B., & Chen, J. D. (2003). Activation and Binding of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ by Synthetic Cannabinoid Ajulemic Acid. *Molecular Pharmacology*, *63*(5), 983–992. <https://doi.org/10.1124/mol.63.5.983>
- LoVerme, J., Russo, R., La Rana, G., Fu, J., Farthing, J., Mattace-Raso, G., Meli, R., Hohmann, A., Calignano, A., & Piomelli, D. (2006). Rapid Broad-Spectrum Analgesia through Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α . *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *319*(3), 1051–1061. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.111385>
- Luo, T., Sakai, Y., Wagner, E., & Dräger, U. C. (2006). Retinoids, eye development, and maturation of visual function. *Journal of Neurobiology*, *66*(7), 677–686. <https://doi.org/10.1002/neu.20239>
- Maccarrone, M. (2017). Metabolism of the Endocannabinoid Anandamide: Open Questions after 25 Years. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00166>
- Mahomed, A., Girn, D., Pattani, A., Wells, B. K., King, C. C., Patel, S., Kaur, H., Noravian, C. M., Sieminski, J., Pham, C., Dante, H., Ezin, M., & Elul, T. (2023). Cannabinoid receptor type 1 regulates sequential stages of migration and morphogenesis of neural crest cells and derivatives in chicken and frog embryos. *Journal of Morphology*, *284*(7). <https://doi.org/10.1002/jmor.21606>
- Michalik, L., Desvergne, B., Dreyer, C., Gavillet, M., Laurini, R. N., & Wahli, W. (2002). PPAR expression and function during vertebrate development. *The International Journal of Developmental Biology*, *46*(1), 105–114.

- Migliarini, B., & Carnevali, O. (2009). A novel role for the endocannabinoid system during zebrafish development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 299(2), 172–177. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.11.014>
- Mock, E. D., Mustafa, M., Gunduz-Cinar, O., Cinar, R., Petrie, G. N., Kantae, V., Di, X., Ogasawara, D., Varga, Z. V., Paloczi, J., Miliano, C., Donvito, G., van Esbroeck, A. C. M., van der Gracht, A. M. F., Kotsogianni, I., Park, J. K., Martella, A., van der Wel, T., Soethoudt, M., ... van der Stelt, M. (2020). Discovery of a NAPE-PLD inhibitor that modulates emotional behavior in mice. *Nature Chemical Biology*, 16(6), 667–675. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0528-7>
- Mughal, B. B., Leemans, M., Spirhanzlova, P., Demeneix, B., & Fini, J.-B. (2018). Reference gene identification and validation for quantitative real-time PCR studies in developing *Xenopus laevis*. *Scientific Reports*, 8(1), 496. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18684-1>
- Nikolopoulou, E., Galea, G. L., Rolo, A., Greene, N. D. E., & Copp, A. J. (2017). Neural tube closure: Cellular, molecular and biomechanical mechanisms. In *Development (Cambridge)* (Vol. 144, Issue 4, pp. 552–566). Company of Biologists Ltd. <https://doi.org/10.1242/dev.145904>
- O’Sullivan, S. E. (2007). Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *British Journal of Pharmacology*, 152(5), 576–582. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707423>
- O’Sullivan, S. E. (2013). Cannabinoid activation of peroxisome proliferator-activated receptors: an update and review of the physiological relevance. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling*, 2(1), 17–25. <https://doi.org/10.1002/wmts.73>
- O’Sullivan, S. E. (2016). An update on PPAR activation by cannabinoids. *British Journal of Pharmacology*, 173(12), 1899–1910. <https://doi.org/10.1111/bph.13497>
- O’Sullivan, S. E., & Kendall, D. A. (2010). Cannabinoid activation of peroxisome proliferator-activated receptors: Potential for modulation of inflammatory disease. *Immunobiology*, 215(8), 611–616. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2009.09.007>
- Pacher, P., Kogan, N. M., & Mechoulam, R. (2020). Beyond THC and Endocannabinoids. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*,

- 60(1), 637–659. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010818-021441>
- Padmanabhan, R., & Ahmed, I. (1996). Sodium valproate augments spontaneous neural tube defects and axial skeletal malformations in TO mouse fetuses [corrected]. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 10(5), 345–363. [https://doi.org/10.1016/0890-6238\(96\)00081-0](https://doi.org/10.1016/0890-6238(96)00081-0)
- Pandelides, Z., Aluru, N., Thornton, C., Watts, H. E., & Willett, K. L. (2021). Transcriptomic Changes and the Roles of Cannabinoid Receptors and PPAR γ in Developmental Toxicities Following Exposure to Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol. *Toxicological Sciences*, 182(1), 44–59. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfab046>
- Pertwee, R. G. (2006). Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. *British Journal of Pharmacology*, 147(S1). <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706406>
- Psychoyos, D., Hungund, B., Cooper, T., & Finnell, R. H. (2008). A cannabinoid analogue of Δ^9 -tetrahydrocannabinol disrupts neural development in chick. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 83(5), 477–488. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20166>
- Psychoyos, D., Vinod, K. Y., Cao, J., Xie, S., Hyson, R. L., Wlodarczyk, B., He, W., Cooper, T. B., Hungund, B. L., & Finnell, R. H. (2012). Cannabinoid Receptor 1 Signaling in Embryo Neurodevelopment. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 95(2), 137–150. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20348>
- Quintanilla, R. A., Utreras, E., & Cabezas-Opazo, F. A. (2014). Role of PPAR γ in the Differentiation and Function of Neurons. *PPAR Research*, 2014, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2014/768594>
- Reece, A. S., & Hulse, G. K. (2019). Cannabis Teratology Explains Current Patterns of Coloradan Congenital Defects: The Contribution of Increased Cannabinoid Exposure to Rising Teratological Trends. *Clinical Pediatrics*, 58(10), 1085–1123. <https://doi.org/10.1177/0009922819861281>
- Reggio, P. (2010). Endocannabinoid Binding to the Cannabinoid Receptors: What Is Known and What Remains Unknown. *Current Medicinal Chemistry*, 17(14), 1468–1486. <https://doi.org/10.2174/092986710790980005>

- Robert, E., & Guibaud, P. (1982). Maternal valproic acid and congenital neural tube defects. *Lancet (London, England)*, 2(8304), 937. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(82\)90908-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(82)90908-4)
- Rosa, F. W. (1991). Spina bifida in infants of women treated with carbamazepine during pregnancy. *The New England Journal of Medicine*, 324(10), 674–677. <https://doi.org/10.1056/NEJM199103073241006>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Sequerra, E. B., Goyal, R., Castro, P. A., Levin, J. B., & Borodinsky, L. N. (2018). NMDA Receptor Signaling Is Important for Neural Tube Formation and for Preventing Antiepileptic Drug-Induced Neural Tube Defects. *The Journal of Neuroscience*, 38(20), 4762–4773. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2634-17.2018>
- Shao, Z., Yin, J., Chapman, K., Grzemska, M., Clark, L., Wang, J., & Rosenbaum, D. M. (2016). High-resolution crystal structure of the human CB1 cannabinoid receptor. *Nature*, 540(7634), 602–606. <https://doi.org/10.1038/nature20613>
- Shen, M., & Sali, A. (2006). Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Science*, 15(11), 2507–2524. <https://doi.org/10.1110/ps.062416606>
- Son, H.-W., & Ali, D. W. (2022). Endocannabinoid Receptor Expression in Early Zebrafish Development. *Developmental Neuroscience*, 44(3), 142–152. <https://doi.org/10.1159/000522383>
- Sun, Y., Alexander, S. P. H., Kendall, D. A., & Bennett, A. J. (2006). Cannabinoids and PPAR α signalling. *Biochemical Society Transactions*, 34(6), 1095–1097. <https://doi.org/10.1042/BST0341095>
- Tham, M., Yilmaz, O., Alaverdashvili, M., Kelly, M. E. M., Denovan-Wright, E. M., & Laprairie, R. B. (2019). Allosteric and orthosteric pharmacology of cannabidiol and cannabidiol-dimethylheptyl at the type 1 and type 2 cannabinoid receptors. *British Journal of Pharmacology*, 176(10), 1455–1469. <https://doi.org/10.1111/bph.14440>
- Todisco, S., Santarsiero, A., Convertini, P., De Stefano, G., Gilio, M., Iacobazzi, V., & Infantino, V. (2022). PPAR Alpha as a Metabolic Modulator of the Liver: Role in the Pathogenesis of Nonalcoholic

- Steatohepatitis (NASH). *Biology*, 11(5), 792.
<https://doi.org/10.3390/biology11050792>
- Turner, S. E., Williams, C. M., Iversen, L., & Whalley, B. J. (2017). *Molecular Pharmacology of Phytocannabinoids* (pp. 61–101).
https://doi.org/10.1007/978-3-319-45541-9_3
- Volkow, N. D., Han, B., Compton, W. M., & McCance-Katz, E. F. (2019). Self-reported Medical and Nonmedical Cannabis Use Among Pregnant Women in the United States. *JAMA*, 322(2), 167.
<https://doi.org/10.1001/jama.2019.7982>
- Wada, K., Nakajima, A., Katayama, K., Kudo, C., Shibuya, A., Kubota, N., Terauchi, Y., Tachibana, M., Miyoshi, H., Kamisaki, Y., Mayumi, T., Kadowaki, T., & Blumberg, R. S. (2006). Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ -mediated Regulation of Neural Stem Cell Proliferation and Differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 281(18), 12673–12681. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513786200>
- Wallingford, J. B., Niswander, L. A., Shaw, G. M., & Finnell, R. H. (2013). The Continuing Challenge of Understanding, Preventing, and Treating Neural Tube Defects. *Science*, 339(6123).
<https://doi.org/10.1126/science.1222002>
- Waning, J., Vriens, J., Owsianik, G., Stüwe, L., Mally, S., Fabian, A., Frippiat, C., Nilius, B., & Schwab, A. (2007). A novel function of capsaicin-sensitive TRPV1 channels: Involvement in cell migration. *Cell Calcium*, 42(1), 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2006.11.005>
- Webb, B., & Sali, A. (2016). Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Current Protocols in Bioinformatics*, 54(1).
<https://doi.org/10.1002/cpbi.3>
- Xu, H. E., Lambert, M. H., Montana, V. G., Plunket, K. D., Moore, L. B., Collins, J. L., Oplinger, J. A., Kliewer, S. A., Gampe, R. T., McKee, D. D., Moore, J. T., & Willson, T. M. (2001). Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator-activated receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(24), 13919–13924. <https://doi.org/10.1073/pnas.241410198>
- Xu, H. E., Stanley, T. B., Montana, V. G., Lambert, M. H., Shearer, B. G., Cobb, J. E., McKee, D. D., Galardi, C. M., Plunket, K. D., Nolte, R. T., Parks, D. J., Moore, J. T., Kliewer, S. A., Willson, T. M., & Stimmel, J. B. (2002). Structural basis for antagonist-mediated recruitment of

nuclear co-repressors by PPAR α . *Nature*, 415(6873), 813–817.
<https://doi.org/10.1038/415813a>

Yanes Calderón, M., Mesa Suárez, M., & Marrero Escobedo, D. (2017). Defecto del tubo neural Neural Tube Defect. In *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología* (Vol. 43, Issue 1). <http://scielo.sld.cu>

Zheng, J. Q., & Poo, M. (2007). Calcium Signaling in Neuronal Motility. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23(1), 375–404.
<https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123221>