

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
POSGRADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

PARTICIPACION DE LOS CANABINOIDES ENDOGENOS
EN LA REGULACION DEL SUEÑO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

PRESENTA LA BIOLOGA

MARINA MARTINEZ VARGAS

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MA. DE LA LUZ NAVARRO ANGULO

MEXICO, D. F.

ENERO 2005

m. 340331



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Doctorado en Ciencias Biomédicas

FACULTAD DE MEDICINA

pdcb/grad/158Jur/2004

ING. LEOPOLDO SILVA
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACION
ESCOLAR DE LA UNAM.
PRESENTE.

Por medio del presente me permito informar a usted que en la reunión del Comité Académico del Doctorado en Ciencias Biomédicas que se llevo a cabo el día 24 de mayo del presente año, se acordó designar el siguiente jurado para examen de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la alumna. **MARTINEZ VARGAS MARINA**, con número de cuenta 8526476-4 con la tesis titulada: **"PARTICIPACIÓN DE LOS CANABINOIDES ENDOGENOS EN LA REGULACION DEL SUEÑO"**, dirigida por la Dra. María de la Luz Navarro Angulo.

PRESIDENTE: DR. LEON CINTRA McGLONE
SECRETARIO: DRA. MARIA DE LA LUZ NAVARRO ANGULO
VOCAL: DR. GABRIEL ROLDAN ROLDAN
VOCAL: DR. JAVIER VELÁSQUEZ MOCTEZUMA
VOCAL: DR. RAUL AGUILAR ROBLERO
SUPLENTE: DRA. SELVA RIVAS ARANCIBIA
SUPLENTE: DR. ALFONSO MARTÍN DEL CAMPO

Afentamiento
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 11 de junio de 2004.

Dr. Gabriel Roldán Roldán
Responsable
Facultad de Medicina

Dr. J. Javier Espinosa Aguirre
Coordinador
Doctorado en Ciencias Biomédicas.

C.c.p. Biol. Francisco Javier Incera, Jefe de la Unidad de Administración del Posgrado.
Tutor(a) Dra. María de la Luz Navarro Angulo.
Coordinación de Doctorado

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora, Dra. Ma. de la Luz Navarro, por todo el apoyo para la realización de éste trabajo, pero principalmente por su confianza y amistad incondicional.

A mi Comité Tutorial, integrado por la Dra. Ma. de la Luz Navarro, el Dr. Javier Velázquez Moctezuma y el Dr. Mauricio Díaz Muñoz, por su asesoría, comentarios y observaciones de gran utilidad para el desarrollo de éste trabajo.

A los integrantes de mi jurado para examen de Doctorado: El Dr. León Cintra McGlone, la Dra. Ma. de la Luz Navarro, el Dr. Gabriel Roldán Roldán, el Dr. Javier Velázquez Moctezuma, el Dr. Raúl Aguilar Roblero, la Dra. Selva Rivas Arancibia y el Dr. Alfonso Martín del Campo, por sus valiosos comentarios acerca de éste trabajo.

A mis dos razones de seguir superándome en la vida: Xchel y Mexitli Atzin González Martínez, por todo su amor, confianza y lindas sonrisas que me regalan cada día de su bella existencia y me hacen muy feliz.


A mi esposo y amigo M. en Ciencias Biológicas, Rubén González Rivera, por su apoyo, confianza y amor que me ha dado desde hace ya muchos años y que estoy segura que contaré con él, por el resto de mi vida.

A toda mi familia, desde mi hermana Graciela hasta el pequeño Gabo, porque a pesar de tantos sucesos familiares, el estar con cada uno de ellos me da tranquilidad y siento todo su apoyo para continuar mi camino. Gracias Gelita y Armando por todo su apoyo.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Marina Martínez Vargas

FECHA: 24. 01. 05

FIRMA: 

De una manera muy especial, a mi hermano Rodolfo, que junto con su familia me ha apoyado incondicionalmente y a puesto toda su confianza en mí, la cual nunca defraudaré.

A mi hermana y amiga, Egrith, que junto con su familia me han brindado muchísimo apoyo. Gracias Linda, Jorge, Lili y Yady.

A todos y cada uno de mis cuñados y concuñas que me han apoyado en momentos difíciles. En especial Daniel, Ceci y Berny.

Este trabajo se lo dedico de una manera muy, muy especial a la persona a quien le debo la vida y me apoyó en todo lo que estuvo a su alcance, toda su vida. Se que le hubiera dado muchísimo gusto verme llegar a esta meta. Por siempre guardaré su recuerdo muy dentro de mí. A mi madre Sra. Sofía Vargas Serrano.

PRESENTACIÓN

"Participación de los Canabinoides Endógenos en la Regulación del Sueño"

Tesis realizada en el Laboratorio de Neuroinfecciones, del Grupo de Neurociencias, Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la U.N.A.M., por la Bióloga Marina Martínez Vargas, bajo la dirección de la Dra. Ma. de la Luz Navarro Angulo.

El desarrollo de ésta tesis fue apoyado por beca del doctorado, otorgada por CONACYT, DGEP y por los donativos de PAPIIT IN233199 e IN219201 y de CONACYT 42060 y 43331.

ÍNDICE

Página

| | |
|--|-----------|
| LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS | 6 |
| I. RESUMEN | 9 |
| I.1 ABSTRACT | 11 |
| II. INTRODUCCIÓN | 13 |
| III. CANABINOIDES Y MARIJUANA | 13 |
| 3.1 Receptores a cannabinoides..... | 15 |
| 3.2 Cannabinoides endógenos..... | 19 |
| IV. ESTADOS DE VIGILANCIA | 23 |
| 4.1 Características conductuales | 25 |
| 4.1.1 Vigilia (VIG) | 25 |
| 4.1.2 Sueño de ondas lentas (SOL)..... | 25 |
| 4.1.3 Sueño de movimientos oculares rápidos(sMOR) | 25 |
| 4.2 Características polisomnográficas en los estados de vigilancia..... | 26 |
| 4.2.1 VIG..... | 26 |
| 4.2.2 SOL..... | 27 |
| 4.2.3 sMOR..... | 28 |
| Eventos tónicos..... | 29 |
| Eventos fásicos..... | 29 |
| 4.3 Neuroanatomía..... | 30 |
| 4.3.1 VIG..... | 30 |
| 4.3.2 SOL..... | 31 |
| 4.3.3 sMOR..... | 32 |
| 4.4 Neurotransmisores..... | 33 |
| 4.4.1 Serotonina (5-HT)..... | 33 |

| | |
|---|----|
| 4.4.2 Noradrenalina (NA)..... | 34 |
| 4.4.3 Acetilcolina (ACh)..... | 35 |
| 4.4.4 Dopamina (DA)..... | 37 |
| 4.4.5 Histamina..... | 37 |
| 4.4.6 Glutamato..... | 37 |
| 4.4.7 Adenosina..... | 38 |
| 4.4.8 Ácido gama amino butírico (GABA)..... | 39 |
| 4.4.9 Péptidos..... | 40 |
| 4.4.10 Endocannabinoides..... | 42 |
| | |
| V. RITMOS BIOLÓGICOS Y RITMOS CIRCADIANOS | 42 |
| | |
| VI. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 44 |
| | |
| VII. HIPÓTESIS..... | 45 |
| VIII. OBJETIVOS..... | 45 |
| 8.1 Objetivo General..... | 45 |
| 8.2 Objetivos específicos..... | 45 |
| | |
| IX. METODOLOGÍA..... | 46 |
| 9.2 Sujetos experimentales..... | 46 |
| 9.3 Variaciones diurnas..... | 46 |
| 9.3 Privación de sueño..... | 46 |
| 9.3.1 Privación de sueño total por 24 hrs..... | 46 |
| 9.3.2 Privación selectiva de sueño MOR..... | 47 |
| 9.4 Obtención de tejidos y preparación de muestras..... | 47 |
| 9.5 Cuantificación del CB1..... | 48 |
| 9.5.1 Cuantificación de la proteína..... | 48 |
| 9.5.2 Cuantificación del RNAm..... | 49 |
| 9.6 Análisis Estadístico..... | 50 |

| | |
|---|-----------|
| X. RESULTADOS..... | 81 |
| 10.1 Detección y cuantificación del receptor CB1..... | 81 |
| 10.2 Detección y cuantificación del RNAm del receptor CB1..... | 81 |
| 10.3 Expresión diurna del receptor CB1 en puente de rata a nivel de proteína..... | 52 |
| 10.4 Expresión diurna del receptor CB1 en puente de rata a nivel de RNAm..... | 53 |
| 10.5 Expresión del receptor CB1 en puente de rata con privación de sueño total durante 24 hrs y 2 hrs de rebote..... | 56 |
| 10.6 Expresión del RNAm del receptor CB1 en puente de rata con privación de sueño total durante 24 hrs y 2 hrs de rebote..... | 56 |
| 10.7 Expresión del receptor CB1 en el puente de rata privada selectivamente de sMOR durante 24 hrs y tras el efecto del rebote de sueño por 2 hrs | 59 |
| 10.8 Expresión del RNAm del receptor CB1 en puente de rata con privación de sMOR por 24 hrs y ratas con rebote de sueño por 2 hrs..... | 61 |
| XI DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES..... | 63 |
| XII PERSPECTIVAS | 67 |
| XIII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 69 |
| XIV ARTÍCULOS ANEXOS Y TRABAJOS EN CONGRESOS..... | 89 |

LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS

| | |
|---------------|--|
| 2-AG | 2-arachidonilglicerol |
| 5-HT | Serotonina |
| AA | Ácido araquidónico |
| AC | Adenilato ciclasa |
| ACh | Acetilcolina |
| AMP | Monofosfato de adenosina |
| AMPc | Monofosfato cíclico de adenosina |
| ANA | Anandamida |
| ChAT | Acetilcolintransferasa |
| Ca | Calcio |
| CB1 | Receptor a Canabinoides 1 (central) |
| CB2 | Receptor a Canabinoides 2 (periférico) |
| EEG | Electroencefalograma |
| EMG | Electromiograma |
| EOG | Electrooculograma |
| FAAH | Hidrolasa de las amidas de los ácidos grasos (por sus siglas en inglés) |
| FRB | Formación reticular bulbar |
| FRP | Formación reticular pontina |
| FTG | Campo tegmental gigantocelular |
| GABA | Ácido gama amino butírico |
| HPLC | Cromatografía de líquidos de alta resolución |
| Hz | Hertz |
| i.c.v. | Intracerebro ventricular |
| K | Potasio |
| l.c.r. | Líquido cefalorraquídeo |
| LC | Locus coeruleus |

| | |
|--------------|--|
| LDT | Núcleo tegmental laterodorsal |
| MAPK | Proteína Kinasa Activadora de Mitógenos |
| NA | Noradrenalina |
| NDR | Núcleo dorsal del rafe |
| NMDA | N-Metil D-aspartato |
| NR | Núcleos del rafe |
| NSQ | Núcleo supraquiasmático |
| OLE | Oleamida |
| P1 | Primer precipitado |
| P2 | Segundo precipitado |
| PCPA | Paraclorofenilalanina |
| PGO | Ondas ponto genículo occipitales |
| PPT | Núcleo tegmental pedúnculo pontino |
| RNAm | Ácido mensajero ribonucleico (Por sus siglas en inglés) |
| RT-PCR | Transcripción reversa y amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (Por sus siglas en inglés) |
| sMOR | Sueño de movimientos oculares rápidos |
| Sn2 | Segundo sobrenadante |
| SNC | Sistema nervioso central |
| snMOR | Sueño no MOR |
| SNP | Sistema nervioso periférico |
| SOL | Sueño de ondas lentas |
| SR141716-A | [N-(piperidine-1-yl)-s-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide hydrochloride] |
| TA | Temperatura ambiente |
| TMN | Núcleo tubero mamilar |
| VIG | Vigilia |
| VIP | Péptido vasoactivo intestinal |
| VLPO | Núcleo preóptico ventrolateral |
| VTA | Área ventral tegmental |
| Delta 9 -THC | Delta9-Tetrahidrocannabinol |

| | |
|---------------|-------------|
| μg | Microgramos |
| μl | Microlitros |
| μV | Microvolts |
| θ | Theta |

I. RESUMEN

La marihuana es la droga de abuso ilícita más comúnmente utilizada en el ámbito mundial con fines recreativos. Las investigaciones sobre su principal componente psicoactivo, el Δ^9 -tetrahidrocanabinol, permitieron el descubrimiento de los receptores a cannabinoides CB1 y CB2, así como el mapeo de los receptores CB1 en el sistema nervioso central y la descripción de los diferentes mecanismos moleculares y celulares de las acciones de los cannabinoides. La identificación de los ligandos naturales (endocannabinoides) a estos receptores ha dado lugar al planteamiento de un sistema de cannabinoides endógeno, del cual apenas se está explorando su papel fisiológico.

En este trabajo nos enfocamos en la participación del sistema de cannabinoides endógenos en la regulación del sueño. En particular analizamos el cambio en la expresión de los receptores a cannabinoides.

Previamente, nuestro grupo había reportado que la anandamida, primer endocanabinoide descrito, presenta una variación a lo largo de las 24 hrs del día en el puente de la rata, siendo mayor su concentración en las horas de oscuridad y menor en las horas de luz. Por tal motivo, nuestro primer objetivo fue determinar si el receptor a cannabinoides CB1 presenta una variación a lo largo de las 24 hrs del día en esta estructura, y si ésta expresión se ve modificada al alterar el ciclo sueño-vigilia. Medimos la expresión del receptor CB1 tanto a nivel de proteína (Western-blot), como de RNAm (RT-PCR), en puente de rata, a lo largo de las 24 hrs del día, con evaluaciones cada 4 hrs. Obteniendo los siguientes resultados: La expresión del receptor CB1 presenta variaciones diurnas, siendo su máxima expresión a las 13:00 hrs para la proteína y a las 21:00 hrs para el RNAm y su mínima expresión a las 01:00 hrs y 09:00 hrs respectivamente.

También analizamos los niveles de proteína y RNAm del receptor CB1 en puentes de ratas privadas de sueño total por 24 hrs y en puentes de ratas que fueron privadas por 24 hrs de sueño total más dos horas de rebote de sueño. Observamos que el rebote de sueño, a diferencia de la privación, incrementa significativamente los niveles de proteína, mientras que disminuye los niveles de RNAm.

Con esto sugerimos que la expresión génica del receptor CB1 está modulada por el ciclo luz-oscuridad y por el sueño, siendo una evidencia más de que el sistema de endocannabinoides participa en la modulación del sueño.

1.1 Abstract

Marijuana, the common name of *Cannabis sativa*, is the illicit drug more commonly used in the world. The studies about $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol ($\Delta 9$ -THC), its principal psychoactive component, led the discovery of the CB1 and CB2 cannabinoid receptors in the last decades as well as the identification of the natural ligands (endocannabinoids) to these receptors. CB1 receptor is localized in central nervous system and testis and most of the psychotropic effects of marijuana are mediated by its binding to this receptor. All this recent knowledge has given place to research found on the anatomical and physiological description of an endogenous cannabinoid system.

In this work, we focus our interest in the involvement of the cannabinoid system on the sleep regulation. Particularity analyzed the effect of sleep deprivation on CB1 receptor expression.

We had previously reported that the concentration of anandamide, the first endocannabinoid described, exhibits variations throughout the 24 hrs of the day in the pons of the rat, with a higher concentration in the hours of darkness and minor in the hours of light. Due to this fact, our main aim was to determine if the CB1 receptor exhibits variations throughout 24 hrs of the day in this structure, and if its expression is modified by altering the sleep-wake cycle.

We analyzed the CB1 receptor expression as protein (Western-blot), and as mRNA (RT-PCR), in pons of the rat throughout 24 hrs of the day, with evaluations every 4 hrs. Our data suggest that the expression of CB1 gene depends on diurnal variations, with a maximum expression at 13:00 for protein and 21:00 hours for mRNA, and a minimum expression at 1:00 and 9:00, respectively.

We also analyzed CB1 receptor protein and mRNA levels in the pons of rats deprived of total sleep for 24 hours and in rats with a 24 hrs period of sleep

deprivation plus a 2 hours period of sleep rebound. Unlike sleep deprivation, sleep rebound increased significantly CB1R protein, while decreasing mRNA.

These facts suggest that CB1 receptor gene expression is modulated by the dark-light cycle and by the amount of sleep displayed by the subject, giving further evidence for the involvement of the endocannabinoid system in the modulation of sleep.

II. INTRODUCCIÓN

Muchas de las drogas, como la marihuana, la morfina y el opio, poseen la capacidad de modificar la fisiología del cerebro.

El consumo o la administración repetida de estas drogas psicoactivas conllevan a la adicción. Por siglos estas drogas han sido utilizadas con fines religiosos o místicos, recreacionales y terapéuticos, por lo tanto fueron descritas como "drogas del espíritu". Por ejemplo la referencia más temprana de la marihuana, data del año 2737 A.C. con el emperador Chino Sheng Nung quien la denominó como la "liberadora del pecado" (Ray y cols., 1996, tomado de Oscar Prospéro y cols., 1999).

III. CANABINOIDES Y MARIJUANA

La marihuana, nombre común de la planta *Cannabis sativa*, es la droga de abuso ilícita más comúnmente utilizada a nivel mundial con fines recreativos. Ha sido usada por más de 4,000 años tanto con fines terapéuticos como recreativos. En Estados Unidos, un 55% de jóvenes adultos han tenido alguna experiencia con dicha droga (Prospéro-García y cols., 1999). En 1996 se realizó una encuesta en hogares ubicados en zonas urbanas de la República Mexicana, en adolescentes de 12 a 17 años, siendo la marihuana la droga más usada (2.4 % de hombres y 0.45% de mujeres), excluyendo al tabaco y al alcohol. Los índices de consumo se han incrementado principalmente en Tijuana, Cd. de México y Guadalajara. (Medina Mora y cols., 2003).

Las flores y las hojas de la *Cannabis sativa* secretan una resina que contiene cerca de 426 compuestos químicos de los cuales aproximadamente 60 son compuestos terpenofenólicos conocidos como cannabinoides, los cuales tienen propiedades psicoactivas. Los cannabinoides se localizan en toda la planta pero en mayor concentración en las flores (Ameri, 1999). El principal componente

psicoactivo de la marihuana es el $\Delta 9$ -Tetrahidrocannabinol ($\Delta 9$ -THC), descrito en 1964 por Gaoni y Mechoulam, el cual, es el principal responsable de los diversos efectos farmacológicos originados por el consumo de la cannabis.

El elevado consumo de esta droga es debido, principalmente a los efectos placenteros que induce el $\Delta 9$ -THC, entre los que se incluyen: sensación de bienestar, relajación, reducción en la percepción al dolor, mejoría en el estado de ánimo, euforia, mejoría del apetito y aumento del deseo sexual. Sin embargo también provoca efectos adversos o no placenteros tales como deterioro en el aprendizaje, problemas en la memoria de corto plazo, reduce la coordinación y la actividad motora, provoca pérdida de atención, disminución en la temperatura corporal; en los hombres disminuye los niveles de testosterona y la espermatogénesis y en las mujeres altera el ciclo menstrual (Grotenhermen, 2003).

Dentro de los efectos observados a consecuencia de la administración de la droga, importantes para el presente estudio, se ha reportado que incrementa la somnolencia subjetiva, el sueño de ondas lentas (SOL) y hay algunos reportes que señalan que incrementa la fase de sueño de movimientos oculares rápidos (sMOR) (Feinberg y cols, 1975 y 1976).

Las propiedades de la cannabis que ha planteado su uso terapéutico, incluyen analgesia, relajación muscular, sedación, inmunosupresión, mejoramiento del humor, estimulación del apetito, antiemesis, disminución de la presión intraocular, broncodilatación, neuroprotección e inducción de apoptosis en células cancerígenas (Grotenhermen, 2003).

Los efectos psicotrópicos y vasculares, los cuales pueden variar en función de la dosis, ruta de administración y vulnerabilidad del individuo, así como el estigma de cannabis como una droga recreacional y adictiva, son los principales obstáculos para legalizar el empleo de la marihuana con fines terapéuticos, a pesar de sus potenciales efectos benéficos (Grotenherman, 2003).

Se sabe que al fumar un cigarrillo de marihuana el $\Delta 9$ -THC es rápidamente absorbido y convertido en los pulmones y en el hígado en un metabolito conocido como 11-hidroxi- $\Delta 9$ -THC; el cual es más potente que el $\Delta 9$ -THC y atraviesa más rápido la barrera hematoencefálica. Finalmente el 11-hidroxi- $\Delta 9$ -THC se convierte en el hígado en varios metabolitos inactivos, entre ellos el 11-no-carboxi- $\Delta 9$ -THC, uno de los metabolitos más abundantes encontrados en plasma y orina 2 a 3 días después de haber fumado solamente un cigarro de marihuana (Ameri, 1999).

Los productos de la cannabis, comúnmente son inhalados (fumarse un cigarrillo de marihuana) o administrados oralmente (cápsulas de dronabinol o marinol, nombre genérico del $\Delta 9$ -THC); pero existen mucho más rutas de administración que han sido probadas con fines terapéuticos, por ejemplo la ruta rectal (supositorios), la vía dermal o la sublingual, gotas en los ojos para disminuir la presión intraocular, aerosoles e inhalación con vaporizadores para evitar los daños secundarios al ser fumada (Grotenhermen, 2003).

3.1 Receptores a cannabinoides

Cuando se descubrió el componente psicoactivo de la marihuana, surgieron diversas interrogantes. Una de ellas fue averiguar el mecanismo por el cual dicha molécula actúa en el sistema nervioso central (SNC). En un principio se creyó que sus efectos eran debido a una alteración membranal, gracias a su naturaleza lipofílica. Esta especulación fue finalmente resuelta cuando se observó una inhibición funcional de la adenilato ciclasa (AC), después de adicionar $\Delta 9$ -THC a células de neuroblastoma (Howlett y Fleming, 1984), sugiriendo así que se activaba un receptor metabotrópico. Posteriormente, en 1988, Devane y cols, observaron la unión específica de agonistas marcados radioactivamente en membranas celulares de cerebro de rata, postulando que la mayoría de los efectos del $\Delta 9$ -THC eran mediados por un receptor de membrana específico. Pero fue

hasta 1990, cuando Matsuda y cols., describieron el primer receptor a cannabinoides, denominado CB1. El CB1 es uno de los receptores más abundantemente expresados. Su distribución ha sido caracterizada en el cerebro de rata (Herkenham y cols., 1990, Tsou, 1998) y de humano (Westlake, 1992 y Glass, 1997).

Los efectos psicomotores de las drogas canabimiméticas son consistentes con la distribución del receptor CB1, el cual está altamente expresado en áreas del SNC que juegan un papel importante en la ejecución y coordinación de la motricidad, tales como los núcleos basales, el cerebelo y la neocorteza (Herkenham, 1991 y Matsuda, 1993).

En los núcleos basales (sustancia negra, globo pálido y estriado -núcleo caudado y putamen-) se localiza la mayor densidad del CB1. En el estriado se ha observado que la activación del receptor CB1 tiene un papel neuromodulador, inhibiendo la liberación de glutamato (Gerdeman G, 2001; Ameri, 1998).

En el sistema límbico (el hipocampo, la amígdala y el hipotálamo) se observa una densidad un poco menor del CB1. Estas estructuras participan en la integración de la memoria y en el control de las emociones. La alta concentración del CB1 en el hipocampo nos permite dar sustento a los efectos farmacológicos provocados por los cannabinoides, sobre el aprendizaje y la memoria.

El CB1, también se localiza en el núcleo acumbens, el cual está asociado con el sistema de reforzamiento o recompensa mediada por el cerebro, y puede estar mediando el afecto adictivo de la marihuana (Wise RA, 1998, Wise RA, 2000).

Finalmente, en la médula espinal y el tallo cerebral, la densidad de los receptores CB1 es baja (Herkenham, 1991, Tsou 1998). Sin embargo se asocian con algunos efectos conductuales de la cannabis, por ejemplo, la percepción del dolor, disminuida por el $\Delta 9$ -THC (Ameri, 1999), el vértigo (complejo nuclear vestibular), así como la regulación del sueño.

Los mecanismos de acción inducidos por cannabis, para la analgesia, incluyen acciones espinales y supraespinales mediados por serotonina (5-HT) y noradrenalina (NA), por lo que su acción antinociceptiva está estrechamente relacionada con el sistema monoaminérgico. Respecto a su efecto en sueño también parece que se lleva a cabo inhibiendo la liberación de NA (Gerdeman, 2000).

Los receptores CB1 además se localizan en el sistema nervioso periférico (SNP), así como en diversos órganos y tejidos, por ejemplo en algunas glándulas endocrinas, en leucocitos, en el bazo, corazón y en tractos reproductivos, urinarios y gastrointestinales: como el epidídimo, la próstata, los testículos, las células espermáticas, los ovarios, los oviductos y el útero. También se ha detectado en carcinomas prostáticos y mamarios (Schuet y cols., 2002).

El receptor CB1, es un miembro de la super familia de receptores metabotrópicos, es decir, está acoplado a proteínas G (Matsuda, 1990). Está formado por siete dominios transmembranales con tres dominios intracelulares y tres extracelulares. Posee un grupo amino terminal extracelular y un grupo carboxilo terminal intracelular. Al activarse inhibe a la AC, impidiendo con ello la conversión de trifosfato de adenosina (ATP) a monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) (Ameri, 1999). Los receptores CB1, además, están acoplados a canales iónicos: negativamente a canales de Ca^{++} tipo N y Q y algunos a canales de potasio (k^+) tipo N, y positivamente a canales de K^+ rectificantes; por lo que su activación parece modular la excitabilidad y la liberación de neurotransmisores.

Asimismo, se ha observado que la activación del receptor CB1 puede secuestrar a las proteínas G de un reservorio común y por lo tanto evitar que otros receptores acoplados a proteínas G lleven a cabo su señalamiento, inhibiendo así la liberación del ácido gama amino butírico (GABA), de NA, de acetilcolina (ACh) y de glutamato entre otros (Gerdeman, 2000). Por otro lado, se ha observado que

inhibe el señalamiento de los receptores de somatostatina y los α -adrenérgicos (Vázquez y Lewis, 1999).

También movilizan el ácido araquidónico (AA) y cierran los canales iónicos del receptor a serotonina tipo 3 (5-HT₃).

A partir de lo anterior, se puede concluir que los cannabinoides vía receptor CB₁, inhiben la transmisión sináptica en el SNC. Esta inhibición es altamente efectiva debido a dos factores: por un lado, los receptores CB₁ están presentes en altas cantidades en las terminales presinápticas, en relación con el soma y por otro lado, la activación de los canales de K⁺ por los cannabinoides, amplifican la inhibición presináptica de los canales de Ca²⁺ por reducción en la duración del potencial de acción.

Se ha descrito otro receptor a cannabinoides denominado CB₂ el cual fue clonado originalmente de células de bazo, en 1993 por Munro y cols. Su distribución está restringida a la periferia (células inmunes, bazo, pulmón, hígado, riñones y timo). Su localización en células inmunes, sugiere que participa en la inmunosupresión mediada por los cannabinoides (Klein y cols., 1998). Pertenecer a la misma familia de receptores con siete dominios transmembranales e interactúan al igual que el CB₁ con proteínas G.

Se ha descrito otro receptor a cannabinoides que es una variante del CB₁ conocida como CB_{1A}, teniendo una distribución idéntica al CB₁ (Shire y cols., 1995).

La tolerancia farmacológica observada después de la exposición prolongada a la marihuana o a los cannabinoides sintéticos, parece ser debido a un decremento significativo en la densidad de los receptores a cannabinoides y parece tener más bien una base farmacodinámica más que farmacocinética. Por ejemplo, estudios hechos por Romero y cols. en 1998, muestran que la exposición prolongada al Δ^9 -THC provoca un decremento en su unión al receptor CB₁. Es decir, una regulación a la baja (down-regulation), sin presentar cambios en su RNAm. Por

otro lado, estudios hechos por Rinaldi y cols. 1998, y Haleh y cols., 1999, muestran que agonistas del receptor CB1 (CP 55,940, WIN 55,212-2, methanandamida y $\Delta 9$ -THC) inducen internalización del receptor sin ningún decremento en el número de receptores, así como desensibilización. Cada agonista canabinoide varía en su eficiencia para causar internalización. También observaron que el antagonista al receptor CB1, el SR141716-A, tiene efectos opuestos a los observados por los agonistas, promueve la externalización del receptor de un reservorio preexistente intracelular a la superficie celular, por lo que se le considera un agonista inverso.

3.2 Canabinoides endógenos

Al igual que la descripción de los receptores a los opioides en los años 70s, permitió el descubrimiento de un grupo de moléculas endógenas con acciones similares a las de la morfina en el cerebro (las encefalinas y las endorfinas), la identificación de los receptores a canabinoides dio lugar a la búsqueda de los ligandos endógenos que ocupan dicho receptor. Así, en 1992, el grupo de Mechoulam reportó el aislamiento del primer ligando endógeno para el receptor CB1, que causa efectos parecidos a los producidos por los canabinoides, por lo que se le dio el nombre de endocanabinoide, se trata de la arachidonylethanolamida, conocida como anandamida (ANA) (Devane y cols., 1992, Di Marzo, 1994).

En 1995 se identificó otra molécula endocanabinoide: el 2-arachidonylglycerol (2-AG) (Mechoulam y cols., 1995, Sugiura y cols., 1995, Stella y cols., 1997).

Al igual que el 2-AG, la ANA es de naturaleza lipídica, ambos funcionan como neurotransmisores no clásicos, debido a que no son almacenados dentro de vesículas sinápticas. Más bien, son producidos a demanda a través de la conversión enzimática de fosfolípidos componentes de la membrana. Son

liberados de la célula inmediatamente después de su producción (Piomelli Y cols., 2000).

La ANA es un lípido extraído originalmente de cerebro de cerdo, posteriormente se identificó en cerebro de vaca, oveja, rata y humano. Se localiza en altas concentraciones en áreas del SNC donde se encuentra gran cantidad del receptor CB1 (Felder y cols., 1996; Glass y cols., 1997), tales como el hipocampo, la sustancia negra, la amígdala, el hipotálamo, el estriado, el cerebelo, la corteza cerebral y en menores concentraciones en el tálamo y el séptum. También se ha detectado en plasma y regiones periféricas como el testículo (Wang y cols., 1983; Felder y Glass, 1998). Tiene una mayor afinidad por el receptor CB1 que por el CB2.

Los efectos de ANA a nivel celular, son similares a los del $\Delta 9$ -THC; a bajas concentraciones disminuye la actividad de la AC, disminuyendo a su vez la concentración del AMPc (Childers, 1996).

Los efectos conductuales de ANA son similares a los del $\Delta 9$ -THC pero con menor duración; produce analgesia, inactiva los centros de percepción. Además en nuestro grupo, observamos que interfiere con procesos cognitivos, debido a que deteriora la memoria a largo plazo, sin afectarla a corto plazo. Asimismo hemos observado que incrementa el SOL 2 y el sMOR a expensas de la vigilia (VIG), interfiriendo también con la motricidad (Murillo Rodríguez y cols., 1998). Estos efectos son prevenidos por la administración previa del antagonista al CB1, el SR141716A, (Murillo-Rodríguez y cols., 2001) sugiriendo con esto que los efectos de ANA son mediados por el receptor CB1.

Se ha observado que durante un shock hemorrágico la ANA y el 2-AG pueden ser liberados de macrófagos y plaquetas activando por lo tanto a los receptores CB1, produciendo vasodilatación en músculo liso vascular siendo posiblemente la causa de la hipotermia observada después de la administración de la ANA (Jarai Z y cols., 2001; Di Marzo, 1999).

La enzima que hidroliza a la ANA, se le conoció originalmente como amido hidrolasa de anandamida (AAH, por sus siglas en inglés), pero al ver que también degrada al 2-AG, se le llamó amida hidrolasa de los ácidos grasos (FAAH, por sus siglas en inglés). Se encuentra unida a la membrana celular y puede ser inhibida por AM374. La FAAH, degrada a la ANA formando ácido araquidónico (AA) y etanolamida. El AA, rápidamente se reincorpora a la membrana. *In vitro*, se ha observado que la FAAH puede también actuar de manera inversa, catalizando la formación de ANA a partir de AA y etanolamida (Ameri, 1999).

La FAAH, se localiza en altos niveles en la corteza cerebral, el hipocampo, el cerebelo, la amígdala, el tálamo y algunos núcleos pontinos (Thomas, 1997 y Egertova, 1998), con lo que observamos que no existe una relación directa entre la localización de los receptores CB1 y la FAAH. Basándose en estudios inmunohistoquímicos, se ha observado que la FAAH se expresa en las neuronas, no en la glía. (Egertova, 2003).

En la rata se observan altos niveles de FAAH en el riñón, el testículo, el hígado, el bazo, el útero, el pulmón, el estómago y en el intestino delgado. Y bajos niveles en el corazón y en el músculo esquelético. En el humano su distribución es diferente ya que se localiza en altas concentraciones en el cerebro, el páncreas, el músculo esquelético y el riñón (Giang y Cravatt, 1997).

Como había mencionado anteriormente, el SR141716-A es una molécula que antagoniza los efectos de los cannabinoides y endocannabinoides vía receptor CB1; fue descrita por Rinaldi y cols. en 1994. Bloquea los efectos conductuales y bioquímicos inducidos por los cannabinoides y precipita el síndrome de abstinencia en animales tratados crónicamente con agonistas a cannabinoides. También puede producir efectos opuestos a los agonistas, por lo que se se dice que es un agonista inverso (Bouaboula y cols., 1999, Landsman, 1997). Aumenta las corrientes de Ca^{++} tipo N, inhibe la activación de la proteína cinasa activadora de mitógeno (MAPK). Su administración induce preferencia de lugar, reduce la

La formación y liberación de los endocannabinoides dependen de la estimulación de algunos receptores. Por ejemplo, cuando se estimulan los receptores a Dopamina D2 en el estriado, hay un aumento en la liberación de ANA (Giuffrida y cols., 1999), de la misma forma si se aplican agonistas colinérgicos se observa un incremento en la producción del 2-AG en sorta de rata (Mechoulam y cols., 1998a).

Se sabe que los cannabinoides actúan como neurotransmisores inhibidores retrógrados (Wilson, 2002) y se ha observado que dosis crónicas de Δ^9 -THC y marihuana provocan alteraciones en las propiedades de los receptores a cannabinoides de una manera reversible, por lo que se muestra que la marihuana, sus derivados y los endocannabinoides no son neurotoxinas.

IV. ESTADOS DE VIGILANCIA

El descubrimiento de receptores a cannabinoides y sus ligandos endógenos, estimuló una serie de investigaciones durante la pasada década, acerca de sus funciones en diferentes procesos fisiológicos, una de ellas es su participación en la regulación del sueño. Pero, ¿por que es importante el sueño?

A pesar de que hoy en día no se sabe con exactitud cual es su papel, sabemos que constituye una de las funciones integrativas más sofisticadas en mamíferos superiores y parece que está regulada por una gran variedad de factores humorales endógenos. La importancia de su estudio se pone de manifiesto, no solo al observar las consecuencias de las alteraciones en el dormir sino que también porque se ha mostrado que su ausencia es incompatible con la vida (Everson, 1989; Rechtschaffen, 2002).

El sueño ha atraído la atención de la humanidad desde la antigüedad. Encontramos diversas teorías acerca de su función y mecanismo por ciertos

pensadores tales como Aristóteles e Hipócrates, entre otros; sin embargo, hoy en día no existe una teoría convincente que explique dicho fenómeno. Por muchos años sólo se consideró el aspecto mental de las ensoñaciones, aún a principios del siglo XX, por ejemplo Sigmund Freud (Freud, 1900), sugirió que el papel de los sueños era la expresión de los deseos, con esto decía que los sueños eran indicadores de lo que había en el inconsciente. Asimismo, Pavlov intentó explicar los mecanismos fisiológicos y conductuales del sueño.

Su estudio inicialmente estaba basado sólo en ciertas evaluaciones conductuales, tales como observaciones de posturas y movimientos y de ciertas variables vegetativas como ritmo cardíaco, diámetro de la pupila, temperatura corporal y presión sanguínea, por lo que los resultados obtenidos eran poco claros y poco convincentes. El estudio fisiológico del sueño es más reciente, se podría decir que se inició a partir del advenimiento de la electroencefalografía en 1928 por Hans Berger, lo que permitió determinar si una persona estaba despierta o dormida por medio del registro de la actividad eléctrica cerebral. Más tarde Rechtschaffen, con ayuda del electroencefalograma (EEG), mostró que los estados de vigilia y sueño son acompañados de cambios en la actividad eléctrica de la corteza cerebral. Posteriormente se mostró que existen variaciones sorprendentes durante el sueño antes considerado como homogéneo (Aserinsky y Kleitman, 1953), estableciendo con esto los criterios poligráficos característicos de cada una de las fases del ciclo sueño-vigilia.

Hoy en día para analizar el ciclo sueño-vigilia, nos basamos al menos en el registro de tres medidas fisiológicas: el EEG o actividad cortical, el electrooculograma (EOG) o medida de movimientos oculares rápidos (MORs) y el electromiograma (EMG) o medida del tono muscular (Antrobus y cols., 1993; Próspero-García & Drucker-Collín, 1996). Con ayuda de éstas variables se ha determinado que en los humanos los estados de vigilia, se pueden dividir en diferentes etapas: Vigilia (VIG), SOL formado por cuatro fases: I, II, III, y IV y sMOR.

4.1 Características conductuales de los estados de vigilia

Conductualmente, el sueño en mamíferos se define por ciertas características, tales como, la adopción espontánea de una postura estereotipada, disminución de la movilidad, elevación del umbral para responder a estímulos del medio y reversibilidad con una estimulación supraumbra (Zeppelin, 2000).

4.1.1 Vigilia (VIG)

En la rata, especie utilizada en este estudio, la VIG se divide en dos fases: vigilia activa y vigilia pasiva. En la primera muestran una actividad motora con conductas típicas, es decir, comen, beben, se acicalan y exploran el medio; mientras que en la pasiva se encuentran quietas, con los ojos abiertos y alertas (Corsi-Cabrera, 1983).

4.1.2 Sueño de ondas lentas (SOL)

También conocido como sueño no MOR (snMOR), debido a que en esta fase no se presentan movimientos oculares rápidos. Se caracteriza porque en el organismo, los músculos se encuentran relajados, también hay una relajación en las membranas nictitantes y además la pupila se contrae. En los mamíferos, ésta fase se caracteriza por que se acuestan sobre su costado o vientre; en los gatos, por ejemplo, a esto se le conoce como posición de esfinge.

4.1.3 Sueño de movimientos oculares rápidos (sMOR)

El sMOR, fue descrito en 1953 por Aserinsky y Kleitman, quienes observaron en niños la presencia de movimientos oculares rítmicamente en esta fase.

Posteriormente en la década de los 60's Jouvét observó que el registro del EEG durante esta etapa de sueño era similar al de la vigilia por lo que lo denominó sueño paradójico. En las ratas en esta fase de sueño se presentan movimientos de las orejas, de las vibrisas y de las extremidades, su respiración se vuelve irregular y se presentan apneas de sueño (cortos periodos sin ventilación). Conductualmente la mayoría de los mamíferos adopta una posición conocida como "ovillo" en el que enrollan el cuerpo y apoyan la cabeza en el piso y con los ojos cerrados (Corsi-Cabrera, 1983). Esta fase de sueño se caracteriza principalmente por la presencia de movimientos oculares rápidos, la atonía muscular y la disritmia cardiopulmonar (revisado en Carskadon & Dement, 2000). A esta fase de sueño se le conoce también como sueño desincronizado a diferencia de la sincronía de las ondas del SOL y también suele ser llamado sueño profundo, debido a que se encuentra elevado el umbral para despertar.

4.2. Características polisomnográficas de los estados de vigilancia

4.2.1 Vigilia (VIG)

Cuando los sujetos están despiertos y con los ojos abiertos, se observa un EEG muy rápido y de bajo voltaje. La frecuencia alta refleja un alto nivel de actividad (ondas cerebrales rítmicas de 40 Hz), mientras que el voltaje pequeño se debe a que la descarga es desincronizada.

El EEG alterna entre dos patrones principales: una actividad desincronizada de bajo voltaje (10-30 μ V), rápida (16-25 Hz), y un patrón sinusoidal de 8 a 12 Hz, entre 20 y 40 μ V, que es denominado actividad "alfa" (Carskadon & Dement, 2000). Se observa una actividad theta en el EEG asociada con movimientos corporales, una amplitud alta y variable en el EMG y ocasionalmente movimientos oculares en el EOG (Timo-Iraria y cols., 1970 revisado en Yoshimoto y cols., 1999).

4.2.2 SOL

En los humanos, una vez iniciado el sueño, el EEG cambia progresivamente de un patrón de bajo voltaje y frecuencia rápida, a uno de alto voltaje y frecuencia baja: la fase I del SOL, que ocupa del 2 al 5% del tiempo total de registro, se caracteriza por presentar ondas theta con una frecuencia de 4-8 Hz. y un voltaje de 50-100 μV , presenta un bajo umbral para despertar. En el SOL 2 aparecen en el EEG los denominados husos de sueño con una frecuencia de 8-15 Hz y una amplitud de 50-150 μV , así como los complejos K que consisten en una onda delineada negativamente, seguida de un componente positivo, en esta fase se presentan frecuencias mezcladas de bajo voltaje que ocupan cerca del 45% de la época del registro. En la fase III, se presentan ondas lentas con una frecuencia de 2-4 Hz y una amplitud de 100-150 μV ; esta actividad dura por lo menos 20% pero no más del 50% de la época del registro. Finalmente en la fase IV se presentan ondas delta con una frecuencia de 0.5 a 2 Hz y una amplitud de 100 a 200 μV . Las ondas lentas ocupan más del 50% del registro (Tomado de Hobson, 1995). Estas dos últimas fases constituyen el sueño delta.

Durante el SOL los músculos se encuentran relajados, predominando la actividad parasimpática, disminuyen el ritmo cardíaco, la presión arterial y la respiración, mientras que la actividad gastrointestinal se incrementa, al igual que el umbral para reaccionar ante los diversos estímulos ambientales. Esta fase ocupa los primeros 70 a 90 min del sueño.

Al inicio de esta fase de sueño se presenta una progresiva hiperpolarización en neuronas tálamo-corticales las cuales comienzan a disparar en un modo oscilatorio. Posiblemente algunas llegan a hiperpolarizarse más rápido que otras dando como consecuencia las oscilaciones en el rango de ondas lentas, lo que explica que esta fase se conozca también como sueño de ondas lentas (SOL) (Borbély y cols., 1998). Steriade en 1999, observó que las células glutamatérgicas en la corteza, son las responsables de la actividad lenta, las reticulares talámicas

gabaérgicas generan los husos de sueño y las glutamatérgicas del tálamo la actividad delta.

En las ratas, la actividad neuronal decrece y es posible registrar en el EEG, tres tipos de oscilaciones: principalmente de actividad de bajo voltaje (oscilaciones lentas de menos de un Hz), husos de sueño, (ondas sinusoidales con una frecuencia entre 12 y 14 Hz) y ritmo "delta", ondas de amplitud alta ($>75 \mu\text{V}$), de baja frecuencia (0.5-2 Hz) (Steriade y cols., 1994). Hay una clara ausencia de actividad theta en el EEG del vertex de la rata (Carskadon & Dement, 2000; Timoriraria y cols., 1970). El SOL, en la rata se divide en dos fases I, y II que corresponden a la somnolencia y sueño delta respectivamente.

4.2.3 sMOR

Posteriormente el EEG cambia abruptamente a un voltaje bajo y frecuencia rápida, desincronizado; conocido como sMOR debido a que se presentan en esta etapa movimientos oculares rápidos, este patrón se acompaña de una pérdida de tono muscular, mioclonías y se pierde la capacidad para regular la temperatura corporal. Esta etapa corresponde aproximadamente del 20 al 25% del tiempo total de sueño. En una noche normal de sueño se presentan de 4 a 6 fases de sMOR que se repiten cada 90 a 120 min (Rechtschaffen y Kales, 1968).

En las ratas, en esta fase el EEG se caracteriza por presentar una actividad cortical rítmica, con un voltaje variable entre 50 a 150 μV y con una frecuencia entre 4.0 y 12.0 Hz, conocida como ritmo theta hipocampal (θ). Además de una actividad de bajo voltaje 10-30 μV , rápida 20-50 Hz, una amplitud baja en el EMG y presencia de movimientos oculares en el EOG (Timoriraria y cols., 1970 revisado en Yoshimoto y cols., 1999).

Durante el sMOR se presentan diversos fenómenos clasificados en tónicos, cuando se presentan a lo largo de todo el sMOR y fásicos cuando aparecen en forma esporádica.

Eventos tónicos

Desincronización Cortical: El EEG presenta una activación talámica como resultado de la interacción de los núcleos del puente (PPT y LDT) con los del tálamo. Mecanismo por el cual la actividad del EEG se desincroniza.

Ritmo theta: es originado por la actividad del hipocampo, e influenciado por el tallo cerebral y mediado por el núcleo medial del séptum y cerebro basal anterior. Presenta dos fases: una lenta de 4 a 8 Hz y una rápida de 8 a 12 Hz.

Atonía muscular: Es la pérdida de tono muscular que resulta de la inhibición tónica de las motoneuronas del cuerno anterior espinal por la formación reticular pontomedular. (revisado en Pace-Schott & Hobeon, 2002). Jouvet y colaboradores en 1965, observaron que este evento tónico, involucra al LC y al *locus subcoeruleus*. Describieron que la lesión de estas áreas, en gatos provocaba que al cursar por sMOR, presentáran actividad muscular, con un EEG desincronizado, mostrando una conducta onírica es decir exhibían diversas conductas como levantarse, atacar y huir con movimientos de orientación de la cabeza pero con los ojos cerrados.

Eventos fásicos

Movimientos oculares rápidos, son el resultado de la actividad fásica de las células reticulares y vestibulares que posteriormente excitan a las neuronas oculomotoras. Estos movimientos pueden aparecer en forma vertical, circular u horizontal. Esta característica es la que le da el nombre a esta fase de sueño.

Actividad ponto-genico-occipital (PGO), segundos antes de iniciado el sMOR, se presenta una actividad en forma de espigas de alto voltaje y ondas rápidas de gran amplitud denominadas PGO's, debido a que fueron registradas en gatos a nivel de puente (Jouvet y Michel, 1959), posteriormente a nivel de núcleo

geniculado lateral (Mikiten y cols., 1961) y finalmente a nivel de corteza occipital (Mouret y cols., 1963) (Revisado en Corsi-Cabrera, 1963).

Miclonías, se le conocen de esta forma a las sacudidas musculares durante el sueño, originalmente descritas por Jouvet en 1962, se relacionan con la atonía muscular y participan tres regiones: la formación reticular pontina (FRP), la bulbar (FRB) y las motoneuronas (Siegel, 2000).

4.3 Neuroanatomía

4.3.1 VIGILIA

En la expresión de la vigilia participan diversas regiones anatómicas, entre las que se encuentran la formación reticular oral pontina y del cerebro medio: el diencefalo caudal (hipotálamo posterior, subtálamo y tálamo ventral) y el cerebro basal anterior.

Las primeras observaciones que sugirieron al hipotálamo como centro regulador de la vigilia, fueron realizadas por Von Economo en 1931, él observó que las lesiones en el hipotálamo ocasionaban, ya sea una pérdida de la vigilia, si se lesionaba la parte posterior, o pérdida del sueño si la lesión era en la parte rostral (Jones, 2000). Sin embargo, no se consideró al hipotálamo posterior como responsable de la vigilia, hasta después de los trabajos realizados por Ranson en 1939 y por Hess y Nauta en 1946. Posteriormente ha habido otras evidencias que apoyan al hipotálamo posterior como generador de la vigilia por ejemplo, los registros unitarios de las células del hipotálamo posterior realizados por Findlay y Hayward en 1969.

Se ha observado que el hipotálamo posterior envía proyecciones histaminérgicas difusas a la corteza cerebral y al tálamo, lo cual es considerado como parte importante del sistema activador de la vigilia (Brown y cols., 2001).

Más recientemente se ha involucrado a las neuronas orexinérgicas, localizadas en el hipotálamo lateral, y sus proyecciones hacia el tallo cerebral en la expresión de la vigilia (Piper D. y cols., 2000, Hungs M. y cols, 2001).

Otros grupos celulares que participan en la génesis de la vigilia son el LC (noradrenérgico) y los núcleos del Rafe (NR) serotoninérgicos. Las neuronas de estos núcleos tienen una frecuencia disparo mayor durante esta fase del ciclo sueño-vigilia (McGinty y Harper, 1976).

Además, se sugiere que participan de manera importante en la generación y mantenimiento de la vigilia, la formación reticular medular ventral, pontina central y del cerebro medio, así como los núcleos talámicos mediales, ventrales e intralaminares, el subtálamo posterior, y el cerebro basal anterior; debido a que presentan una actividad eléctrica espontánea mayor durante la vigilia que durante el snMOR y su estimulación induce despertar cortical (revisado en Jones, 2000, Próspero-García 2000 y Pace-Schott & Hobson 2002).

4.3.2 SOL

Diferentes experimentos de estimulación y lesiones de diversas zonas del SNC, han permitido identificar los diversos sustratos que participan en la regulación e instalación del sueño, así las regiones que participan en la generación del SOL son los núcleos del rafe (NR), el cerebro basal anterior, el hipotálamo anterior, el área preóptica, el núcleo del tracto solitario, los núcleos talámicos y la amígdala (Jones, 2000).

En particular se ha implicado en la generación del SOL al núcleo preóptico ventrolateral (VLPO), el cual está formado por dos regiones, una región difusa y una región compacta, la región compacta proyecta al núcleo tuberomamilar (TMN) y podría selectivamente promover el SOL (revisado en Pace-Schott & Hobson, 2002).

Las neuronas GABAérgicas del área preóptica medial proyectan a los núcleos del LC y los NR (Jones y Mühlenthaler, 1999), inhibiendo a su vez a neuronas histaminérgicas del núcleo tuberomamilar inhibiendo así a los grupos celulares que se encargan de mantener la vigilia (Gervasoni y cols., 1998).

4.3.3 sMOR

Hobson y McCarley en 1975, plantearon un modelo denominado de interacción recíproca, el cual, plantea que neuronas colinérgicas y aminérgicas de la unión mesopontina, interaccionan originando una alternancia ultradiana entre la vigilia y el sueño, en mamíferos. Propusieron que el LC (estructura generadora de la vigilia), al estar activo, durante la vigilia, inhibe el campo tegmental gigantocelular (FTG). Y al transitar el individuo de la vigilia al sueño, ocurre una inhibición a la inversa. Posteriormente a éste modelo se le incluyeron nuevos elementos, como es la participación de las células colinérgicas PPT y LDT, las cuales inhiben las neuronas del LC y los NR, provocando desincronización cortical. La participación de estos núcleos se ha fortalecido al lesionarlos reduciendo significativamente el sMOR (Webster y Jones, 1988), o bien estimulándolos provocando un incremento en la cantidad del mismo (Takkar y cols., 1996).

A partir de los 70's se han realizado avances en el estudio del sueño y actualmente se acepta a los núcleos pontinos colinérgicos como generadores del sMOR, por ejemplo, Mansari y su grupo en 1989 y Kayama y cols., en 1992, observaron que al hacer registros de actividad unitaria en las neuronas del complejo PPT/LDT, algunas muestran mayor actividad en vigilia y en sMOR a diferencia del SOL, por lo que se les denominó neuronas VIG/MOR-on y otras tenían una mayor descarga exclusivamente durante el MOR por lo que se les llamó MOR-on. Asimismo, en los núcleos aminérgicos pontinos NDR y LC se han descrito neuronas que cesan su disparo durante el sMOR y son conocidas como MOR-off.

Las neuronas colinérgicas del LDT y PPT actúan para promover el sMOR, activando a las neuronas glutamatérgicas de la formación reticular pontina medial. Todas estas neuronas son inhibidas por células serotoninérgicas, noradrenérgicas y presumiblemente histaminérgicas, dopaminérgicas y orexinérgicas (revisado en Monti & Monti, 2000).

Durante el SOL, las neuronas MOR-off siguen activas tal vez debido a la aferencia de neuronas diferentes a las del tipo MOR-on. La actividad de las neuronas MOR-off puede causar la liberación de NA a través de sus proyecciones colaterales, hiperpolarizándose ellas mismas, lo cual, posiblemente ocasione que las neuronas MOR-off tengan actividad rítmica. Se ha propuesto que las proyecciones noradrenérgicas del LC cercanas a las neuronas MOR-on, ocasionen un incremento de NA en torno a neuronas colinérgicas MOR-on, hiperpolarizando y autoinhibiendo a las neuronas del LC, dando lugar a la desinhibición de las neuronas colinérgicas MOR-on, que conlleva a una activación (revisado en Mallick y cols., 2001).

4.4 Neurotransmisores

En 1969 Jouvét propone la "Teoría Monoaminérgica del sueño". En ella se postula que el SOL es generado por la liberación de Serotonina (5-HT) de las neuronas del núcleo del Rafe Dorsal (RD). Mientras que el sMOR se inicia por la liberación del 5-HT del núcleo del Rafe Caudal (RC) y su ejecución depende de las neuronas noradrenérgicas que se localizan en el núcleo del LC, subcoeruleus y en el Parabraquialis Medialis, que son los encargados de mantener dicha fase.

4.4.1 Serotonina (5-HT)

Con los trabajos de Jouvét en 1969, se consideró que la 5-HT, participaba principalmente en la regulación del SOL, debido a que lesiones de los NR

(serotoninérgicos), producían insomnio. En 1974, Henriksen y cols., observaron que la ausencia de 5-HT produce insomnio en corto tiempo, sugiriendo de alguna manera su participación en la regulación del sueño. Posteriormente en 1976 McGinty y Harper, registrando la actividad unitaria de los NR en gatos en libre movimiento, observaron que la actividad de las células alcanzaban una mayor frecuencia de disparo durante la vigilia, disminuían progresivamente en el SOL y dejaban de disparar durante el SMOR (disparo conocido como MOR-off), estos resultados son contrastantes con la idea original de que la 5-HT juega un papel en la generación del sueño. Actualmente varios estudios muestran que la 5-HT, no juega un papel en el sueño, al menos no directamente. Por ejemplo varios estudios de animales tratados con PCPA (Paraclorofenilalanina, inhibidor de la síntesis de 5-HT), indican que la ausencia de dicho neurotransmisor a largo plazo, no altera la generación del sueño (Prospero García y cols., 1986).

Actualmente, se considera, más bien, que la 5-HT puede estar preparando al cerebro durante la vigilia para que se presente el SOL atenuando los sistemas de activación cortical y promoviendo la acumulación de factores inductores de sueño. La 5-HT, está más relacionada con la regulación de la actividad sensorial y motora durante la vigilia que con el sueño (Jacobs, 1983).

4.4.2 Noradrenalina (NA)

Asimismo la teoría monoaminérgica de Jouvet sugirió que el sistema noradrenérgico del tallo cerebral participaba de manera importante en la generación del SMOR. Sin embargo, se ha observado que las neuronas noradrenérgicas presentan un patrón de disparo MOR-off (Aston-Jones y Bloom, 1981, Prospero-García 2000 y Pace-Schott & Hobson 2002). Esta actividad MOR-off, es registrada en el LC. Cabe mencionar que aunque los estudios iniciales de Jouvet implicaban al LC en la generación de SMOR, estudios más recientes consideran que este núcleo está más implicado con la vigilia (revisado en Jones, 2000). Se ha observado que las neuronas noradrenérgicas proyectan directamente y de manera difusa a la corteza cerebral y la activan. En el año 2001,

Saper y cols., propusieron que los núcleos aminérgicos: TMN, el LC y el núcleo dorsal del rafe (NDR) promueven la vigilia, por efectos excitatorios directos sobre la corteza cerebral y por inhibición de las neuronas promotoras de sueño en el VLPO.

4.4.3 Acetilcolina (ACh)

En la década de los 60's surge la teoría colinérgica del sueño propuesta por Hernández-Peón. Se basa en estudios de inyecciones de cristales de ACh en diversos núcleos cerebrales. En 1949, Moruzzi y Magoun estimularon el tallo cerebral y observaron en el EEG desincronización, con lo que se propone que existe un sistema reticular activador ascendente que es el encargado de controlar la activación cortical (Hernández Peón y cols., 1962), en este mismo año junto con Jouvet, Hernández Peón sugirió que, al menos en parte, este sistema reticular activador era colinérgico basándose en estudios farmacológicos y de lesión en un sitio localizado en el tallo cerebral y es a lo que se le conoce como la "teoría colinérgica del sueño". Esta teoría sugirió que el sueño es un proceso unitario donde el SOL y el sMOR, no son entidades separadas sino una diferente manifestación de los mismos procesos básicos. Asimismo, Hernández-Peón y Chávez Ibarra, en la década de los 60's, reportaron que al aplicar cristales de ACh en el área preóptica medial de gatos, les generaba sueño conductual y fisiológico (Hernández-Peón y Chávez Ibarra , 1969).

La ACh lleva a cabo sus efectos a través de dos tipos de receptores, los muscarínicos (metabotrópicos) y los nicotínicos (ionotrópicos) (Hulme y cols., 1990). A la fecha se ha estudiado su participación en la vigilia (Zolotki y cols., 1999), donde observa que la ACh participa en los procesos de activación cortical durante la vigilia y durante el sMOR, correlacionándose con una elevada concentración de dicho neurotransmisor (Williams y cols., 1994). Los núcleos colinérgicos se encuentran en la formación reticular del tallo cerebral en el núcleo tegmental pedúnculo pontino (PPT), el núcleo tegmental laterodorsal (LDT) y en el cerebro basal anterior (sustancia negra y séptum). Las neuronas colinérgicas del

tallo cerebral, proyectan a regiones subcorticales como son el tálamo, el subtálamo, el hipotálamo, el cerebro basal anterior y el séptum. Asimismo, las neuronas del cerebro basal anterior proyectan de manera amplia a la corteza cerebral y al hipocampo (revisado en Jones, 2000, Prospéro-García 2000 y Pace-Schott & Hobson 2002). En 1998, Cape y Jones, demostraron que al inhibir farmacológicamente las células colinérgicas, se deprimía la actividad rápida, que es característica de la vigilia.

Hobson y cols (1993) observaron que al aplicar agonistas colinérgicos en el FTG, núcleo de la formación reticular pontina, se induce sMOR, por lo que se consideró a esta zona como una parte importante en los mecanismos que llevan a cabo la generación de esta fase.

En 1990 Velázquez Moctezuma había observado que al aplicar dichos fármacos en estriado, corteza y tálamo se induce sMOR, sin embargo existen evidencias que el FTG, no es parte importante de la generación del sMOR, por ejemplo, Shiromani y cols., en 1988 documentaron que las neuronas de dicho núcleo son colinoceptivas y no colinérgicas. Aunado a esto, en 1981 Sastre y cols., y en 1983 Drucker Colin y Pedraza reportaron que al lesionar este núcleo no hay una alteración significativa en el sueño, sugiriendo que ésta estructura participa en la facilitación del sMOR, pero no en su generación.

Existen a la fecha una gran cantidad de evidencias de la participación de la ACh en la generación del sMOR, por ejemplo se ha observado que lesiones neurotóxicas aplicando ácido kaínico en el PPT y LDT inducen la desaparición o la disminución de sMOR, mientras que la microinyección de agonistas colinérgicos en la misma área inducen sMOR; asimismo en 1989, Velázquez-Moctezuma y su grupo encontraron que un agonista al receptor M_2 , el cisdioxolano, al ser inyectado en la formación reticular pontina (FRP) en gatos incrementaba el sMOR. También se ha reportado una mayor liberación de ACh, durante el sMOR (Williams y cols., 1984)

4.4.4 Dopamina (DA)

Se ha propuesto que este neurotransmisor incrementa la vigilia, basándose en que la administración de DA (Benkert y Kohler, 1972) o de agonistas dopaminérgicos (Kafi y Gaillard, 1976), incrementa el tiempo de esta fase. Las neuronas dopaminérgicas están localizadas en la sustancia negra (SN) y en el área ventral tegmental (VTA, por sus siglas en inglés). Además hay una distribución difusa de estas neuronas a través del hipotálamo posterior y del subtálamo. De la sustancia negra se proyectan a través del hipotálamo lateral hacia el neopriado, el cerebro basal anterior, el núcleo accumbens, el séptum, la amígdala y la corteza frontal (revisado en Jones, 2000, Prospéro-García 2000 y Pace-Schott & Hobson 2002).

4.4.5 Histamina

Se ha inferido que este neurotransmisor participa en la génesis de la vigilia debido a la propiedad sedativa de los antihistamínicos, así como a estudios farmacológicos que han mostrado que su administración intracerebroventricular (i.c.v.) ocasiona despertares y alertamiento (Monnier y cols., 1970). Además, lesiones de las fibras histaminérgicas, producen un decremento en la vigilia. Las neuronas histaminérgicas se encuentran en el hipotálamo posterior, pueden recibir proyecciones de la formación reticular del tallo cerebral y proyectan directamente a la corteza cerebral (revisado en Jones, 2000, Prospéro-García 2000 y Pace-Schott & Hobson 2002).

4.4.6 Glutamato

El Glutamato, es el principal neurotransmisor excitatorio y se considera como un indicador de alertamiento, debido a que concentraciones elevadas de él, se asocian con una activación del EEG (Azuma y cols., 1996). Uno de los receptores de glutamato, el N-methyl-D-Aspartato (NMDA), al ser estimulado,

induce un incremento en la actividad de las células corticales (McCormick, 1992). Las neuronas glutamatérgicas se encuentran en la formación reticular del tallo cerebral. El glutamato parece ser el neurotransmisor primario del sistema reticular de activación ascendente, del tálamo y de la corteza cerebral (revisado en Jones, 2000, Prospéro-García 2000 y Pace-Schott & Hobson 2002).

Participa en la regulación del sMOR. El glutamato activa a las neuronas colinérgicas y colinoceptivas del PPT generando un incremento exponencial en la actividad reticular pontina y mesopontina asociada con el inicio del sMOR. Este efecto es mediado a través de la actividad de los receptores kainato, evidencia dada con base a que su efecto es revertido por el ácido sulfónico D- γ -glutamilaminometano, un antagonista específico de estos receptores (Datta, 2002).

4.4.7 Adenosina

Se trata de un nucleósido considerado como factor inductor de sueño, debido a que sus niveles incrementan con la privación de sueño y disminuyen cuando el sujeto recupera el sueño perdido. (Porkka-Heiskanen y cols., 1997). Existen diversos datos que apoyan la participación de dicho neurotransmisor en la modulación del sueño a través de su interacción con sistemas colinérgicos. Actúa a través de receptores posinápticos bloqueando la liberación de otros neurotransmisores, inhibiendo así a las neuronas colinérgicas del tallo cerebral y del cerebro basal anterior. Asimismo, al inhibir la actividad de las células de los núcleos PPT/LDT y del cerebro basal anterior, sugiere que su efecto en el sueño depende en parte de la inhibición de los sistemas colinérgicos que regulan la vigilia y el sueño. En el tálamo y en la corteza, la adenosina hiperpolariza las proyecciones neuronales y puede facilitar la actividad que subyace a la actividad de ondas lentas que se observa en el SOL. La administración exógena de esta molécula o de fármacos que facilitan su acción, ocasionan un incremento en el SOL y un retraso en el sMOR, en ratas y en humanos. Mientras que moléculas antagonistas de adenosina (metilxantinas: cafeína, teofilinas, etc.) reducen el

sueño. Las concentraciones de adenosina en el cerebro basal anterior se incrementan durante la vigilia normal y prolongada y disminuyen con el sueño (revisado en Navarro y cols., 2000).

4.4.8 Acido gama amino butírico (GABA)

El GABA es el neurotransmisor inhibitorio más abundante en el SNC. La distribución de neuronas GABAérgicas son localizadas en el hipotálamo, el núcleo reticular talámico, el área preóptica y el cerebro basal anterior (Gritti y cols., 1997), representan tanto a interneuronas como a neuronas de proyección. Algunas de ellas proyectan hacia el hipotálamo posterior, donde pueden inhibir sistemas activadores localizados en esta región. En el hipotálamo posterior y en el cerebro basal anterior, la liberación de GABA es mayor durante el SOL que durante la vigilia y el SMOR. Las neuronas GABAérgicas del hipotálamo y del cerebro basal anterior también dan lugar a proyecciones ascendentes hacia la corteza. Se han descrito interneuronas corticales GABAérgicas, que son más activas durante el SOL que durante la vigilia, con lo que queda claro que la transmisión GABAérgica es fundamental para que se presente el SOL (revisado en Jones, 2000, Prospéro-García 2000 y Pace-Schott & Hobson 2002).

Sus efectos son llevados a través de dos tipos de receptores GABA A (ionotrópico) y GABA B (metabotrópico), ambos receptores participan en la hiperpolarización asociada con los husos de sueño y el receptor GABA A favorece la generación de ondas lentas. Los principales agentes sedativos e hipnóticos utilizados en la clínica, llevan a cabo su acción a través de su unión al receptor GABA A, como es el caso de las benzodiazepinas.

Se ha observado que las neuronas GABAérgicas del tallo cerebral y cordón espinal, participan en el mecanismo de la atonía muscular, debido a que junto con la glicina, inhiben las motoneuronas somáticas localizadas en el cuerno anterior espinal, produciendo atonía muscular (Maloney y cols., 2000).

También se ha mostrado que las concentraciones de GABA son mayores durante el sMOR comparado con la vigilia en el NDR y que el musímol, agonista GABA_A, aplicado en el NDR incrementa el sMOR, mientras que los antagonistas bicuculina o picrotoxina lo reducen (revisado en Monti & Monti 2000).

4.4.9 Péptidos

En los procesos de la vigilia participan una serie de moléculas de naturaleza peptídica, tales como: el factor liberador de corticotropina, el factor liberador de tirotropina, la sustancia P y la neurotensina. A menudo se colocan con neurotransmisores implicados en la promoción de la vigilia. Las orexinas, también conocidas como hipocretinas son péptidos que han sido relacionados con la generación de la vigilia y la ingesta de alimento, su participación en la regulación del ciclo sueño-vigilia se establece con las observaciones relacionadas con la narcolepsia, uno de los trastornos severos del sueño. Sujetos con ésta enfermedad presentan una desorganización del ciclo sueño-vigilia, con ataques de sueño diurnos, aparición prematura de sMOR, parálisis de sueño, alucinaciones hipnagógicas y cataplexia (atonía muscular provocada por emociones como risa o furia). Actualmente se ha propuesto que las neuronas orexinérgicas están dirigiendo el tono monoaminérgico y el colinérgico durante el ciclo vigilia-sueño con una máxima actividad durante la vigilia y una mínima durante el sMOR (revisado en Hungs & Mignot 2001; Torterolo. 2002).

Por otro lado, entre los péptidos que participan en la generación y mantenimiento del SOL, se encuentran: *la sustancia inductora de sueño* (Zolotowski y cols, 1999), *el péptido inductor de sueño delta* (Schoenenberger y Monnier, 1977), *péptidos muramí* (Martín y cols., 1984), *las interleucinas* (Krueger y cols., 1984), *la cortistatina*, péptido localizado en la corteza cerebral, se ha observado que suprime la actividad neural, además de favorecer la aparición de ondas lentas (de Lecea y cols., 1996). También participan en la aparición de esta fase del sueño *los opioides endógenos*, tales como las encefalinas, las endorfinas y las dinorfinas. Estas moléculas tienen un papel importante en la modulación sensorial y la

analgesia, lo cual podría ser muy importante en el inicio y mantenimiento del sueño. Las encefalinas son secretadas por neuronas de la corteza cerebral y por neuronas que se encuentran relacionadas con el SOL incluyendo el núcleo del tracto solitario, el área preóptica y el NDR en donde se colocan con la serotonina. Así mismo se ha observado que el LC, promotor de la vigilia, es potencialmente inhibido por los péptidos opioides y recibe aferencias encefalinérgicas, el incremento local de péptidos opioides ocasiona una disminución de la vigilia y un incremento del SOL.

Otro de los péptidos que participan en la promoción del SOL es la *galanina*, es un péptido inhibitorio, que junto con el GABA, es liberado por el VLPO, proyecta hacia el LC y el RD, núcleos promotores de alerta, y al hipotálamo.

Otra molécula que participa en la facilitación del SOL es el factor liberador de la hormona del crecimiento, es secretado por las neuronas del hipotálamo, estimula la secreción de la hormona del crecimiento en la pituitaria y parece tener propiedades inductoras de sueño, actuando sobre las neuronas del hipotálamo anterior y del área preóptica. La secreción de la hormona del crecimiento se lleva a cabo durante el SOL, en el primer tercio de la noche (revisado en Jones, 2000, Próspero-García 2000 y Pace-Schott & Hobson 2002).

Asimismo, se ha propuesto la participación de algunos péptidos en la generación del sMOR, uno de ellos es la somatostatina, se ha observado que el bloqueo de los receptores a este péptido reduce el sMOR espontáneo, así como la reducción de dicha fase de sueño en el periodo de rebote posterior a un periodo de privación, mientras que si se administran antagonistas de estos receptores en LC se ocasiona una reducción en el sMOR, por lo que se sugiere que este efecto podría estar mediado aunque sea parcialmente por el sistema noradrenérgico en el LC (Toppila y cols., 2000). Por otro lado, se ha propuesto que el péptido intestinal vasoactivo (VIP), denominado así por haber sido descrito originalmente en el intestino y posteriormente descrito en el SNC de mamíferos, es un potente

inductor de sMOR (Riou y cols., 1982). Posteriormente otros estudios mostraron que la aplicación de LCR extraído de gatos privados de sueño MOR a gatos recipientes inducía sMOR y dicha inducción era abolida si el LCR se pretrataba con anticuerpos anti-VIP (Jiménez-Anguiano y cols., 1995).

4.4.10 Endocannabinoides

Los endocannabinoides, vía receptor CB1, producen efectos similares a los que produce la marihuana, tales como somnolencia. La ANA induce un incremento en SOL y sMOR en la rata, mientras que la OLE solo induce un incremento en el SOL (Prospero García y cols., 2000). Se revisó con más detalle en la sección anterior.

V. RITMOS BIOLÓGICOS Y RITMOS CIRCADIANOS

La frecuencia de los ritmos en la naturaleza tiene un amplio espectro; existen ritmos que oscilan una vez por fracción de segundo (ritmos de actividad eléctrica neuronal), ritmos que oscilan una vez en varios segundos (ritmo respiratorio), hasta ritmos que oscilan una vez al año (ritmo de hibernación). Los ritmos más evidentes en la mayoría de los seres vivos son aquellos que oscilan con una frecuencia cercana a un ciclo por día. Los hábitos de actividad-reposo, ingesta de alimento, de agua, etc., se coordinan con la alternancia del día y la noche y por lo tanto es de esperarse que algunos procesos fisiológicos, psicológicos y bioquímicos también oscilen a una frecuencia similar a la del día solar. Estos ritmos se denominan circadianos, de circa: cerca y diano: día (Halberg, 1959), estas oscilaciones varían entre 22 y 28 hrs; dichos ritmos persisten, al aislar al organismo de señales cíclicas en el ambiente, es decir bajo condiciones constantes ambientales de luz u oscuridad (Rusak B., 1980); cuando las oscilaciones desaparecen en condiciones de ambiente constante se les llama ritmos diurnos.

Los ritmos circadianos expresan la organización temporal de los procesos fisiológicos y conductuales para una óptima adaptación al medio, en particular a los periodos de luz-oscuridad.

Cuando a un organismo se le deja en libre corrimiento (oscuridad continua), se ha observado que sigue presentando ciertas variaciones y el ritmo de estas variaciones no es exactamente de 24 hrs, esto implica que tiene un sistema oscilador que de alguna manera cuantifica el tiempo (Friesen y Block, 1984). En 1993 Pittendrigh denominó a este oscilador reloj biológico. Este oscilador endógeno con funciones de reloj interno es un sistema activo característico de los organismos vivos, del que depende su organización temporal.

La ritmicidad que se presenta en ausencia de estímulos externos indica la presencia de un marcapasos interno que genera la señal circadiana. Mientras que la correspondencia con los periodos de luz-oscuridad, implica la presencia de fotorreceptores con conexiones hacia el marcapasos. El mecanismo biológico que permite medir el tiempo en animales superiores parece residir en los núcleos supraquiasmáticos (NSQ) (Drucker-Colin y cols., 1984; Aguilar-Roblero, 1989).

Los núcleos supraquiasmáticos, se localizan en la base del hipotálamo anterior, justo por encima del quiasma óptico, en posición ventrolateral al receso óptico del tercer ventrículo (Cassone V., 1988; Moore R, 1973).

En los humanos hay una gran cantidad de parámetros que presentan ritmos circadianos, además del ciclo sueño-vigilia, algunos ejemplos son: la temperatura corporal, la cantidad de potasio excretada. Asimismo, se ha observado que la secreción de algunas hormonas que tienen una expresión circadiana, no depende del ciclo sueño-vigilia, por ejemplo el cortisol, el cual presenta su máximo pico de secreción en la últimas horas antes de despertar, este pico se presenta aún privando a los sujetos de sueño. Por otro lado, hay hormonas cuya secreción, depende del ciclo sueño-vigilia, por ejemplo la hormona del crecimiento (GH) y la prolactina. Los máximos picos de secreción de la GH se observan de 1 a 4 hrs,

después del inicio del sueño y representan casi el 70% de la secreción total diaria. Asimismo, se ha observado que hay receptores que ciclan a lo largo de las 24 hrs del día; por mencionar algunos ejemplos, en 1995 Holmes y French reportaron que los receptores a serotonina y corticosteroides presentan un ritmo circadiano en hipocampo. En 1999, Díaz Muñoz y colaboradores observaron que el receptor a ryanodina presenta una modulación circádica en SNC de roedor. En 1982, el grupo de Wirz-Justice (Kafka y cols., 1982) estudiaron las variaciones diurnas de varios receptores cerebrales: alfa y beta-adrenérgicos, muscarínicos, benzodiazepínicos, opiáceos y dopaminérgicos; estos estudios los hicieron en ratas Long-Evans, encontrando variaciones diurnas en todos los receptores estudiados.

Siguiendo con la misma tendencia, estudios hechos por nuestro grupo, muestran que la ANA presenta una variación a lo largo de las 24 hrs, en diferentes estructuras como: hipocampo, puente e hipotálamo. Tomando en cuenta únicamente la concentración en puente, que es la estructura que nos interesa, debido a su relación con el sueño, observamos que ésta presenta su mayor concentración a la 01:00 hrs y su mínima concentración a las 13:00 hrs (Murillo Rodríguez y cols., 2001b).

VI PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En las ratas, a pesar de que son animales policíclicos, el sueño, principalmente el sMOR, se expresa de manera circadiana, teniendo una mayor duración en las horas de luz. Datos previos obtenidos en nuestro laboratorio indican que la ANA, el primer canabinoide endógeno descrito, incrementa esta fase de sueño al unirse a los receptores a cannabinoides CB1. Por otro lado hemos observado que la concentración de ANA en el puente presenta variaciones diurnas, sin embargo, su máxima concentración no coincide con la mayor expresión de sMOR, por lo que nuestro primer interés se enfocó en analizar si la expresión del receptor a cannabinoides CB1 presenta variaciones a lo largo de las

24 hrs. del día y a su vez si dicho perfil coincide con la duración de sMOR. Además nos interesamos en estudiar si la expresión del receptor CB1 se ve modificada al alterar el ciclo sueño vigilia. Con esto, estaríamos analizando a otro nivel la relación del sistema de endocannabinoides con el sueño.

VII HIPÓTESIS

- La expresión del receptor a cannabinoides CB1 presenta una variación a lo largo de las 24 horas del día que está asociada al ciclo sueño-vigilia.

VIII OBJETIVOS

8.1 Objetivo General

Determinar si la expresión de los receptores a cannabinoides CB1, presenta variaciones a lo largo de las 24 hrs del día y analizar si ésta se altera modificando el ciclo sueño-vigilia.

8.2 Objetivos específicos

- a) Analizar la expresión a nivel de proteína y RNAm del CB1 a lo largo de las 24 horas del día en puente de rata.
- b) Analizar el efecto de la privación de sueño total y de la privación selectiva de sMOR sobre la expresión del receptor CB1 en el puente de rata, a nivel de proteína y RNAm.

IX. METODOLOGÍA

9.1 Sujetos experimentales

En todos los experimentos se utilizaron ratas macho adultas, de la cepa Wistar, con un peso entre 250 y 300 g, al inicio del experimento. Se mantuvieron en un ciclo constante de luz/oscuridad 12/12 (luz encendida a partir de las 8:00 A.M), con agua y comida ad libitum.

9.2. Variaciones diurnas

Para observar las variaciones del receptor a cannabinoides CB1 a lo largo de las 24 hrs. del día, se sacrificaron 78 ratas, por decapitación, sin manipulación alguna, a diferentes horas del día: 09:00, 13:00, 17:00, 21:00, 01:00 y 05:00, 10 ratas por punto para analizar el receptor CB1 a nivel de proteína y tres ratas para analizar el CB1 a nivel de RNAm.

9.3 Privación de sueño

9.3.1 Privación de sueño total por 24 hrs

Para analizar si la expresión del receptor a cannabinoides CB1 se modifica al alterar el ciclo sueño-vigilia; se manipularon ratas en grupos de 5 durante una semana por el experimentador quien las privó de sueño. La privación se hizo por manipulación gentil, es decir acicalándolas y sosteniéndolas y al primer indicio de sueño se les despertaba.

Se privaron 22 ratas macho, Wistar de sueño total mediante manipulación gentil durante un periodo de 24 hrs (21:00 – 21:00 hrs), suministrándoles agua y comida *ad libitum*. Posteriormente a 12 de estas ratas se les permitió un rebote de sueño, el cual consiste en que una vez que se privan de sueño total, se les deja

dormir durante dos horas, separadas individualmente. Todas las ratas incluyendo 11 controles fueron sacrificadas por decapitación a las 21:00 hrs.

9.3.2. Privación selectiva de sueño MOR

Asimismo, se privaron selectivamente de sueño MOR a 12 ratas, por medio del método de florero invertido, el cual consiste en colocar a la rata en una plataforma de 7.5 cm de diámetro, elevada 4.5 cm, rodeada de agua. Este método se basa en que las ratas al entrar a la fase de sMOR presentan atonía muscular y por lo tanto caen al agua y se despiertan, por lo que pueden tener SOL pero no sMOR; durante un periodo de 24 hrs (21:00-21:00) suministrándoles agua y comida *ad libitum*. Posteriormente a 6 de estas ratas se les permitió un rebote de sueño de dos horas (19:00-21:00 hrs.) De la misma forma, todas las ratas incluyendo seis controles de caja, es decir sin privación de sueño, se sacrificaron a las 21:00 horas.

Como sabemos toda manipulación provoca estrés por lo que utilizamos como controles de estrés a 12 ratas en las mismas condiciones a las de privación de sMOR, a diferencia de que en este caso se utilizaron plataformas de 17.5 cm de diámetro, con lo cual aseguramos que tuvieran el mismo grado de estrés por las condiciones de privación, que las de plataforma chica pero con todas las fases del ciclo sueño-vigilia.

9.4 Obtención de tejidos y preparación de muestras

De cada una de las ratas los cerebros fueron inmediatamente disectados, separando el puente de cada uno de ellos. Los tejidos fueron preparados para realizar un análisis de western blot o un análisis de RT-PCR.

9.5 Cuantificación del CB1

9.5.1 Cuantificación de la proteína

Para analizar la expresión del receptor CB1, los tejidos fueron homogenizados con un amortiguador formado por fosfatos (PBS), adicionado con inhibidores de proteasas aprotinina y PMSF, utilizando un sonicador de ultrasonido (ultrasonic homogenizer 4710). Posteriormente se centrifugó (600 xg, 10', 4°C), se desechó el primer precipitado. El sobrenadante se sometió a una segunda centrifugación (39,000 xg, 15', 4°C). De este segundo sobrenadante se tomó una muestra (5µl), y del precipitado una muestra de 2µl para realizar una cuantificación de concentración protéica por el método de Lowry (Lowry y cols., 1951).

Electroforesis con gel de poliacrilamida con SDS (SDS- PAGE)

Se preparó un gel de poliacrilamida al 12% adicionado con SDS (Laemmli, 1970) Se mezcló una cantidad correspondiente a 15 µg de proteína, de cada una de las muestras, con amortiguador de proteínas 2x, a una dilución 1:1. Se utilizaron estándares de pesos moleculares (GIBCO BRL), los cuales junto con las muestras se calentaron a 95°C durante 5 min y se centrifugaron a 10,000 r.p.m. durante 10 min. La electroforesis se corrió en un gel de 0.75 mm, a 150 V, hasta que el frente de corrida llegó a aproximadamente 5 mm del borde inferior del gel, aproximadamente 2 hrs.

Inmunoelectrotransferencia

El patrón de proteínas obtenido se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). La transferencia se llevó a cabo a 100 Volts, durante una hora en una cámara de transferencia húmeda. La membrana de nitrocelulosa fue cortada en tiras, correspondientes a cada una de las muestras corridas en el SDS-PAGE; éstas tiras se incubaron en una solución bloqueadora durante 30 min (PBS, Tween 3%,

leche libre de grasas al 10% y suero normal de cabra al 2%) con la finalidad de bloquear sitios inespecíficos. Cada tira se dividió en dos; una se incubó con suero normal de conejo (1:1600) y la otra se incubó con el primer anticuerpo anti-CB1 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) (1:1600), toda la noche a 4°C.

Al día siguiente se hicieron tres lavados con PBS-Tween, 5 min. cada uno; se hizo una incubación con un segundo anticuerpo (IgG peroxidado anti conejo hecho en cabra) (1:2000) durante una hora, a temperatura ambiente (TA). Se lavó nuevamente con PBS-Tween durante 5 min. La reacción antígeno-antiCB1-antiIgG fue reconocida adicionando el sustrato Diaminobencidina (DBA) (0.5 mg/ml en PBS, más 0.3 μ /ml de peróxido de hidrógeno, al 30%), la DBA es oxidada por la enzima peroxidasa, permitiéndonos detectar la presencia de receptores a cannabinoides CB1. La densidad de las bandas fue analizada utilizándole software de Quantity One (Bio-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA).

9.5.2 Cuantificación del RNAm

Extracción del RNA total

Para detectar los cambios en la expresión del RNAm del CB1, se extrajo el RNA total utilizando el método del TRIZOL (Life Technologies, Rockville, MD, USA). En breve, 100 mg de tejido fueron homogenizados en 1 ml de TRIZOL, se le agregaron 200 μ l de cloroformo y se mezclaron en un vórtex. Posteriormente se centrifugaron a 12,000 x g durante 10 min. Se le agregó 0.5 ml de isopropanol a la fase acuosa para precipitar el RNA total. Este se lavó con etanol, se cuantificó por UV y su integridad se analizó en un gel de agarosa al 1%.

Amplificación del RNAm (RTPCR)

Dos μ g de RNA, fueron transcritos en reverse utilizando el sistema One Step System (Life Technologies), basándonos en las recomendaciones del fabricante, tratando previamente a las muestras con DNAsa, libre de RNAsa en

una solución amortiguadora (1U en 10 μ l), por 15 min a temperatura ambiente, con la finalidad de eliminar el DNA que pudiera interferir en la amplificación del RNAm. Se le adicionó 1 μ l de ácido etilen-diamino-tetraacético y se calentó a 65°C por 10 min, para detener la reacción. Se llevó a cabo la transcripción inversa y amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) utilizando una mezcla de enzimas en 25 μ l de amortiguador 2X (0.4 mM de dNTP y 2.4 mM de MgSO₄): 1 μ l de Transcriptasa reversa, MgCl₂ y Taq-polimerasa (ONE-STEP, GIBCO), así como oligonucleótidos específicos para la retrotranscripción y amplificación del mensajero del receptor CB1 (Primer antisentido): 5'-cat cat cat cca cac gtc ag-3' y el primer antisentido: 5'-atg ctg ttg tct aga ggc tg-3'; que corresponden a las regiones 1103-1122 y 1413-1432 del RNAm del CB1 (Matsuda y col., 1990). A 33 ciclos, desnaturalización: 45 s, 94°C, alineación: 45 s, 53°C y elongación: 1 min, 72°C, tal como fue descrito por Porcella y cols., 1998. Para asegurar la calidad del RNA también amplificamos cDNA de Ciclofilina, utilizando primers 5'-aga cgc cgc tgt ctc ttt tcg-3' y 5'-cca cac agt cgg aga tgg tga tc-3', como fue descrito previamente por Aceves y col, 1999.

9.6 Análisis Estadístico

Los resultados son reportados como valores promedio \pm error estándar. Las diferencias significativas fueron obtenidas mediante análisis de ANOVA de una cola, prueba *post hoc* de Bonferroni; considerando una $p < 0.05$ como estadísticamente significativa.

X. RESULTADOS

10.1 Detección y cuantificación del receptor CB1.

Estandarizamos la técnica de inmunoelectrotransferencia, con la cual evaluamos semicuantitativamente la expresión del receptor CB1 en el puente de rata. Se varió la cantidad de proteína utilizada, se probaron diferentes condiciones de bloqueo, se varió la concentración de los dos anticuerpos utilizados, así como el tiempo de incubación de los mismos y el tiempo de revelado. Además de que se probaron las diferentes fracciones obtenidas tales como el primer precipitado (P1), el segundo precipitado (P2) y el segundo sobrenadante (Sn2), para saber si la proteína del receptor que estamos analizando es proteína de membrana (P1 y P2) o proteína soluble (Sn2).

Quedando la técnica estandarizada en las siguientes condiciones:

- Proteína 15 µg
- Bloqueo Leche Nestle-Svelty al 10%, 30 min.
- 1er anticuerpo Anti CB1, hecho en conejo, (1:1600), 12 hrs. 4°C
- 2º anticuerpo AntilgG peroxidado, hecho en cabra, (1:2000), 1 hr, TA
- Revelado DAB (150 µg); 1 min, TA

10.2. Detección y cuantificación del RNAm del receptor CB1

Para realizar un análisis semicuantitativo del RNAm del receptor CB1 se utilizaron 2 µg de RNA total, los oligonucleótidos descritos por Matsuda y col en 1990, y los reactivos recomendados por el fabricante. Variamos la temperatura de alineamiento, así como el número de ciclos de la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Además añadimos un tratamiento con DNasa para evitar que el DNA presente en las muestras pudiera alterar los resultados. También incluimos como control la amplificación de una región del RNAm de la ciclofilina

10.3 Expresión diurna del receptor CB1 en puente de rata a nivel de proteína.

El anti CB1 policlonal reconoció una banda prominente a una movilidad relativa correspondiente aproximadamente a 53 kd, basándonos en los estándares de pesos moleculares utilizados (GIBCO, BRL), la cual corresponde al peso reportado para el receptores a canabinoides CB1. Esta banda desaparece cuando el anticuerpo previamente fue incubado con el péptido usado para elaborarlo (Cayman Chemical Co.), con lo que se determinó la especificidad del antiCB1.

Se obtuvo el patrón de proteínas inmunoreactivas antiCB1 del sobrenadante obtenido del homogenado de puente de rata, a diferentes horas del día. En la Fig 1A, se muestra un Western blot representativo. En cada uno de los carriles (1-6) se observa el resultado de la reacción antígeno-anticuerpo tratado con anti-CB1 (a), y con suero normal de conejo (b) el cual fue nuestro control negativo.

No se detectaron bandas usando el suero normal de conejo a la misma dilución. (1:1600).

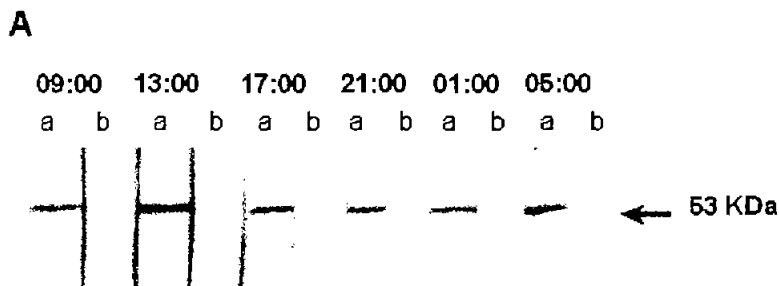
En la figura 1, se observa que la expresión de los receptores a canabinoides CB1, muestra una variación diurna en puente, siendo mayor la expresión a las 13:00 hrs y menor a la 01:00 de la mañana. En general los valores máximos son detectados durante el periodo de luz.

Este mismo análisis se realizó en 10 individuos por cada una de las diferentes horas y las bandas correspondientes a los 53 Kd fueron analizadas densitométricamente para obtener las diferencias estadísticas entre cada grupo, las cuales se muestran en la fig. 1A, donde observamos los valores promedio

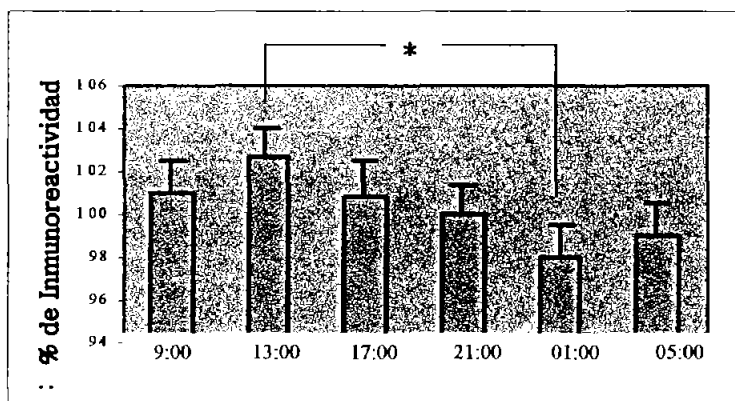
obtenidos por el análisis densitométrico ($n=10$), indicando una diferencia pequeña pero significativa, de cerca del 5% entre las 13:00 y las 01:00 hrs.

10.4 Expresión diurna del receptor CB1 en puentes de rata a nivel de RNAm.

Al usar el RT-PCR para analizar las variaciones del RNAm del CB1 a las mismas horas a las que fue analizada la proteína, observamos que la cantidad de RNAm presenta una variación diurna (Fig. 2a), la cual está desfasada con respecto a la cantidad de proteína observada. Al analizar densitométricamente, cada uno de los fragmentos correspondientes al RNAm tenemos que el máximo de la cantidad del RNAm lo observamos a las 21:00 hrs y el mínimo a las 9:00 hrs, presentándose una diferencia de casi el 15% en ambas horas (Fig. 2b).



B



C

| HORA | 09:00 | 13:00 | 17:00 | 21:00 | 01:00 | 05:00 |
|-------------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------|------------------------|
| CB1 Unidades de densitometría | 101.2 ± 1.5 ^{ab} | 102.5 ± 1.3 ^a | 100.8 ± 1.4 ^{ab} | 100.5 ± 1.4 ^{ab} | 98 ± 1.5 ^b | 99 ± 1.3 ^{ab} |

Fig. 1. Efecto del ciclo luz/oscuridad sobre la expresión del receptor CB1. (A) Fotografía representativa del Western blot del CB1 en puente de ratas a diferentes horas del día, la letra (a), corresponde a la reacción antígeno-anticuerpo con el anticuerpo anti-CB1 (1:1600) y la letra (b) la reacción con el suero normal de conejo preinmune a la misma concentración. (B) Las barras representan el promedio ± e.e. de la densitometría obtenida de la banda de 53 kd en 10 Individuos por punto, obsérvese un incremento estadísticamente significantivo, a las 13:00 hrs vs las 01:00 hrs; P<0.05. (C) Valores a partir de los cuales se construyó la figura B. Las medias con letras diferentes son significativamente diferentes.

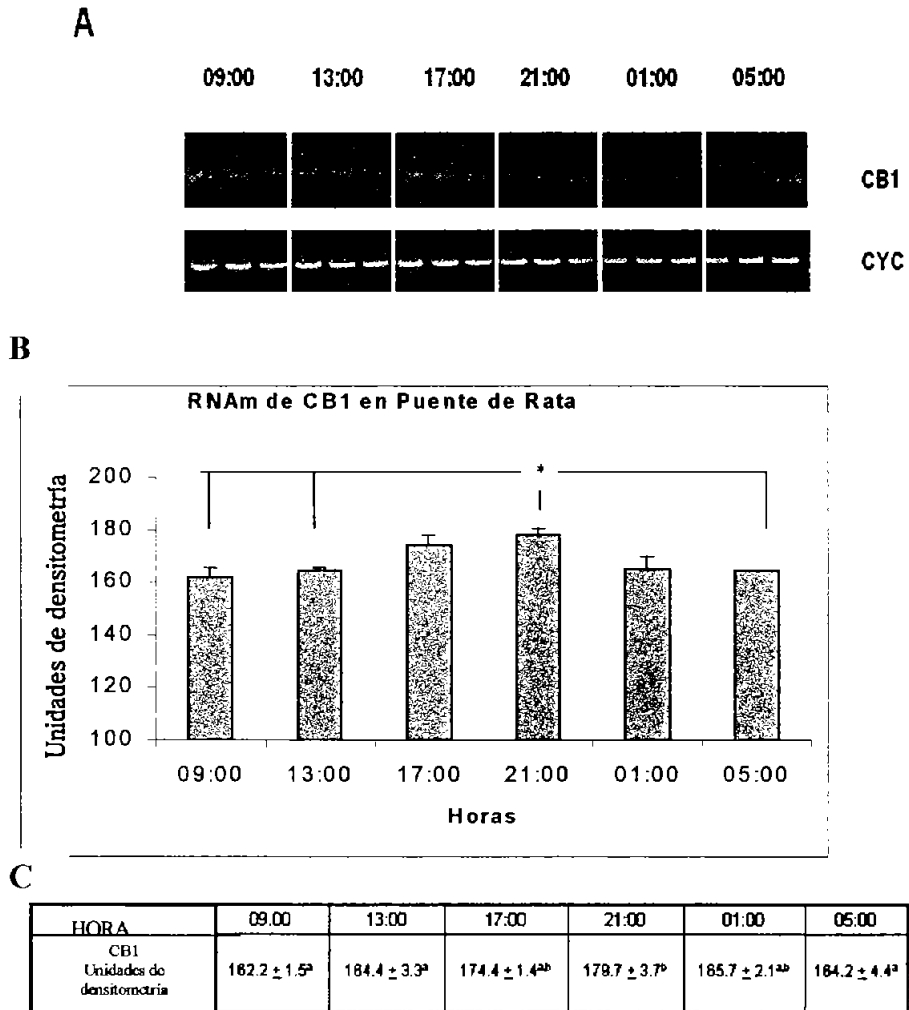


Fig. 2. Efecto del ciclo luz/oscuridad sobre la expresión del receptor CB1 a nivel de RNAm. Amplificación del RNAm del CB1 en puente de ratas a diferentes horas del día (A) Fragmentos del PCR de un gel teñido con bromuro de etidio. El panel superior corresponde al receptor CB1 y el inferior a ciclofilina, utilizada como control. (B) Las barras representan el promedio \pm e.e. de la densitometría obtenida de un negativo del gel teñido con bromuro de etidio, obsérvese un incremento (significativo, estadísticamente) a las 21:00 hrs; $P < 0.05$. (C) Valores a partir de los cuales se construyó la figura B. Las medias con letras diferentes son significativamente diferentes.

10.5 Expresión del receptor CB1 en puente de rata con privación de sueño total durante 24 hrs y 2 hrs de rebote.

Observamos la expresión inmunoreactiva del receptor CB1 en puente de ratas en tres condiciones: controles (C), es decir, ratas con comida, agua y sueño *ad libitum*; ratas privadas de sueño total por 24 hrs (P) y ratas con privación de sueño total por 24 hrs, más un rebote de 2 hrs (R). Es decir que al final de la privación se les permitió dormir *ad libitum*.

Obtuvimos una mayor expresión del receptor CB1, en las ratas con rebote con respecto a las ratas control y a las privadas, siendo este resultado estadísticamente significativo ($p < 0.05$), es decir la privación de sueño total por 24 hrs, no modifica la proteína del CB1 significativamente, sin embargo el rebote de sueño incrementa dicha expresión (Fig. 3).

10.6 Expresión del RNAm del receptor CB1 en puente de rata con privación de sueño total durante 24 hrs y 2 hrs de rebote.

Por otro lado, medimos la cantidad de RNAm en los puentes de ratas con privación total de sueño de 24 hrs y rebote de sueño de 2 hrs. Observamos que la cantidad de RNAm, disminuye después del rebote con respecto a las ratas controles y a las privadas, en contraste con la cantidad de proteína del CB1 (Fig. 4).

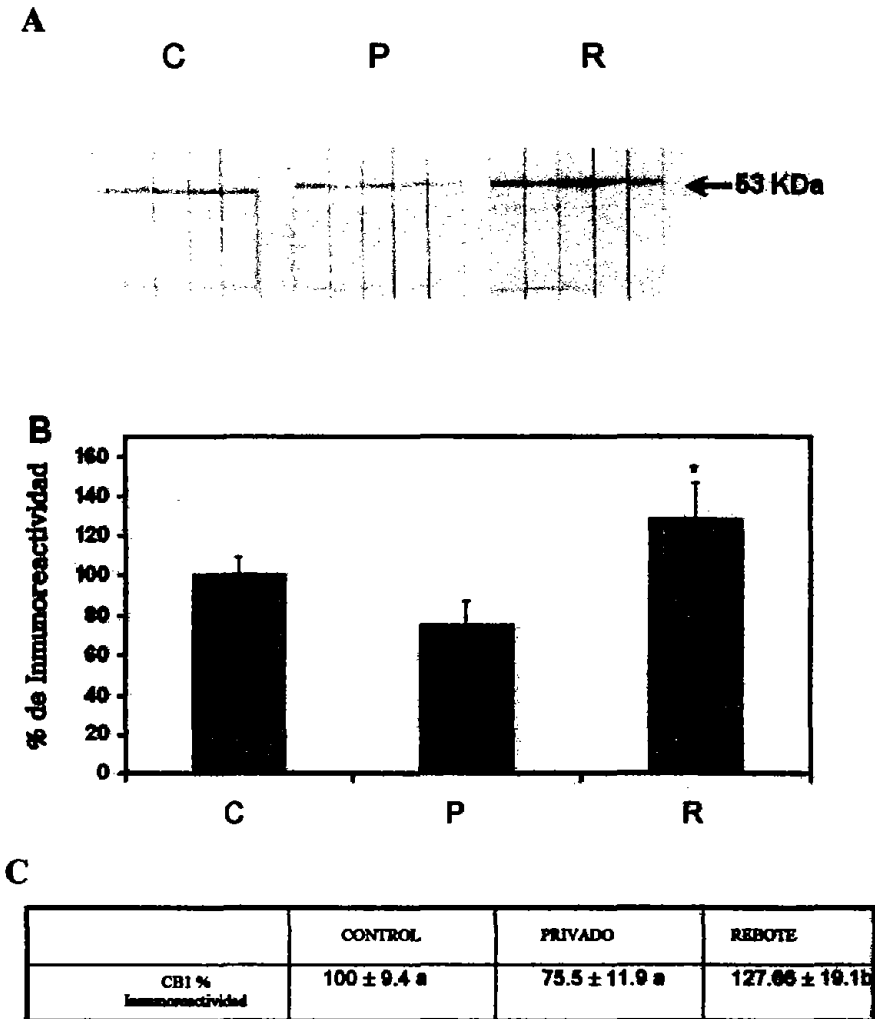


FIG. 3 Efecto de la privación de sueño total por 24 hrs y del rebote de sueño de dos horas sobre la expresión de la proteína del receptor CB1. (A) Fotografía del ensayo de Western blot del receptor CB1, en puentes de ratas controles (C), privadas de sueño total por 24 hrs (P) y privadas de sueño total por 24 hrs, más dos horas de rebote de sueño (R). (B) Las barras representan los valores promedio \pm e.e. de la densitometría obtenida de la banda de 53 Kd. La privación de sueño total, no afecta la expresión de la proteína del CB1, en contraste, el rebote de sueño incrementa significativamente dicha expresión. * $P < 0.05$. (C) Valores a partir de los cuales se construyó la figura B. Las medias con letras diferentes son significativamente diferentes.

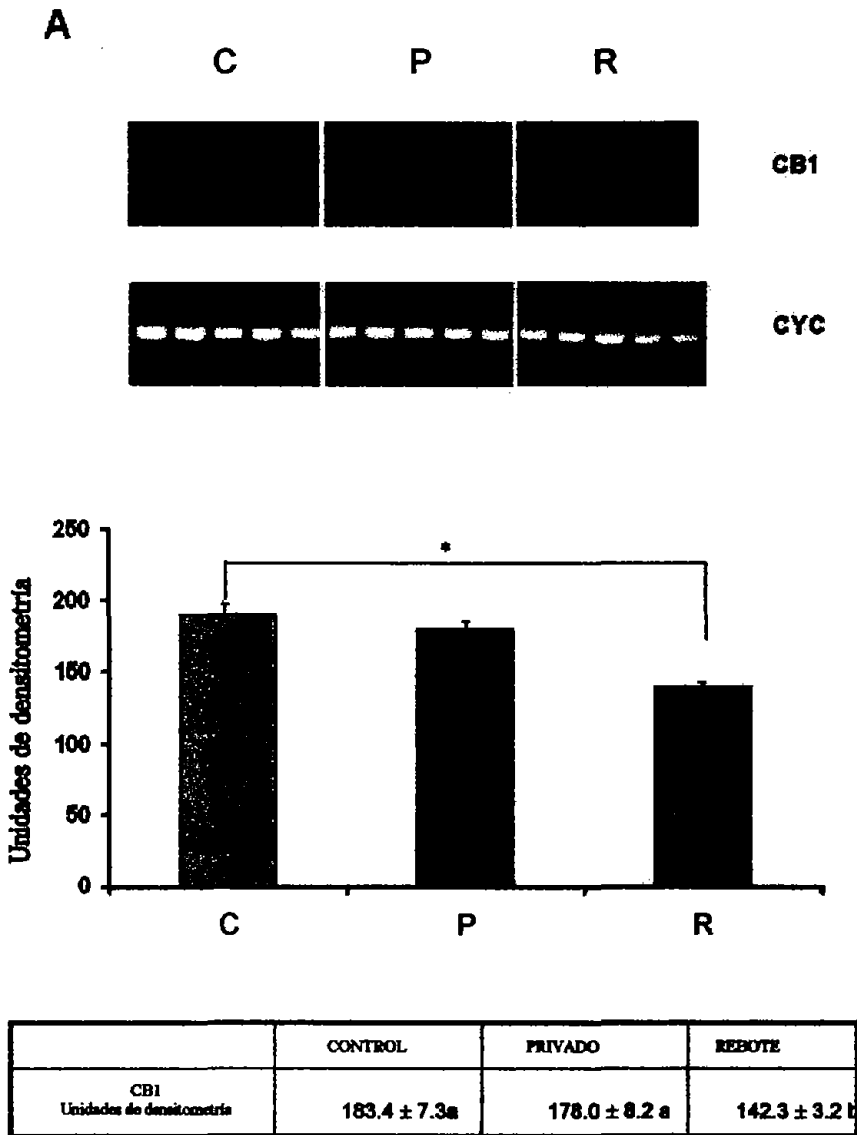


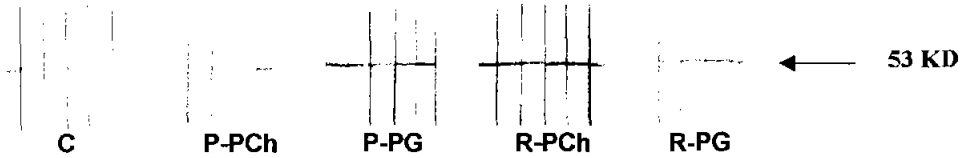
FIG. 4 Efecto de la privación de sueño total por 24 hrs y rebote de sueño de 2 hrs sobre el RNAm del receptor CB1(A) Fragmentos del PCR del gel teñido con bromuro de etidio, del puente de ratas controles (C), privadas de sueño total por 24 hrs (P) y privadas 24 hrs, más dos horas de rebote de sueño (R). El panel superior corresponde al receptor CB1 y el inferior a ciclofilina, utilizada como control. (B) Resultado de la densitometría obtenida de un negativo del gel teñido con bromuro de etidio, observase un incremento significativo estadísticamente en el grupo de rebote; *P<0.05. (C) Valores a partir de los cuales se construyó la figura B. Las medias con letras diferentes son significativamente diferentes.

10.7 Expresión del receptor CB1 en el puente de rata privada selectivamente de sMOR durante 24 hrs y tras el efecto de rebote de sueño por 2 hrs.

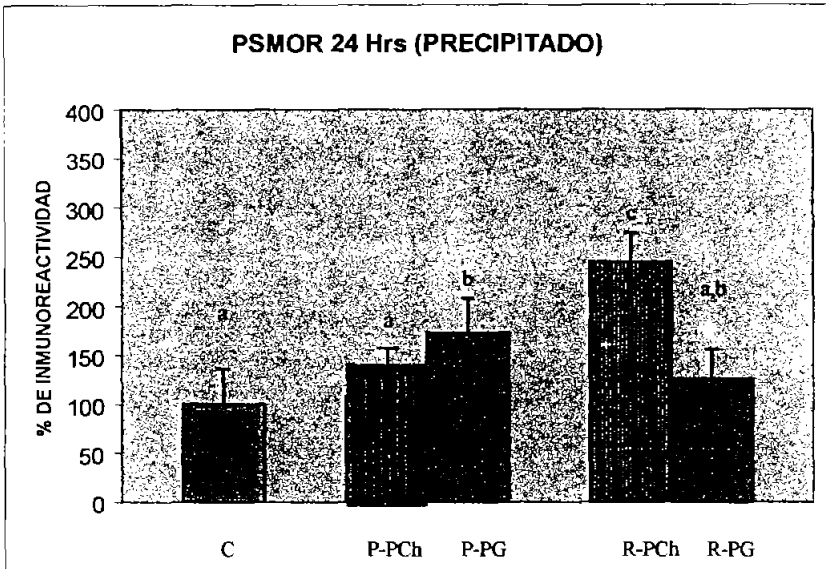
Observamos la expresión del receptor CB1 en puente de ratas en tres condiciones: controles (C), es decir, ratas con comida, agua y sueño *ad libitum*; ratas privadas de sMOR por 24 hrs (Privadas plataforma chica: P-Pch) y ratas con privación de sMOR por 24 hrs más rebote de sueño de dos horas (Rebote de ratas privadas en plataforma chica: R-Pch). Como había mencionado anteriormente la manipulación al privar de sMOR a las ratas induce estrés, por esta razón incluimos grupos de control de estrés (privados con plataforma grande (P-PG) por 24 hrs y privados con plataforma grande más rebote de 2 hrs (R-PG). Estos grupos consisten en ratas mantenidas en las mismas condiciones que las privadas de sMOR, por el método de florero invertido, pero en las que la plataforma es de mayor diámetro con la finalidad de que las ratas puedan dormir en todas sus etapas de sueño. Con esto aseguramos que los resultados obtenidos sean por la privación de sueño, más no por el estrés que ésta ocasiona.

Nuestros resultados indican que la privación de sMOR por 24 hrs no afecta la expresión del receptor CB1, la expresión de la proteína es muy similar tanto en las privadas de sMOR como en las controles de estrés, sin embargo observamos una mayor expresión de dicho receptor en las ratas con rebote de sMOR por dos hrs, siendo este resultado estadísticamente significativo ($p < 0.05$). En los grupos de control de estrés no hubo cambios significativos en la expresión del CB1, por lo que el incremento observado en el rebote, posterior a la privación del sMOR, podemos atribuirlo exclusivamente al efecto del sueño y no al estrés (Fig. 5).

A



B



C

| CB1 % Inmunoreactividad | CONTROL | PRIVADO | | REBOTE | |
|----------------------------|----------------|----------------|------------------|-----------------|---------------|
| | | P-PCh | P-PG | R-PCh | R-PG |
| | 100.0 ± 36.18a | 150.0 ± 20.03a | 172.19 ± 35.33 b | 244.51 ± 29.55c | 125 ± 30.15ab |

FIG. 5 Efecto de la privación selectiva de sMOR por 24 hrs y del rebote de sueño de dos horas sobre la expresión del receptor CB1. (A) Fotografía del ensayo de Western blot del receptor CB1, en puente de ratas controles (C), privadas de sMOR por 24 hrs (P-PCh), control de estrés de privación (P-PG), privadas de sMOR por 24 hrs, en plataforma chica, más dos horas de rebote de sueño (R-Pch) y control de rebote (privadas de sMOR por 24 hrs, en plataforma grande, más dos horas de rebote de sueño) (R-PG) . (B) Valores promedio de la densitometría obtenida de la banda de 53 Kd. La privación de sMOR, no afecta la expresión de la proteína del CB1, en contraste, el rebote de sueño incrementa significativamente dicha expresión. *P<0.05. (C) Valores a partir de los cuales se construyó la figura B. Las medias con letras diferentes son significativamente diferentes.

10.8 Expresión del RNAm del receptor CB1 en puente de ratas con privación de sMOR por 24 hrs y ratas con rebote de sueño por 2 hrs.

Al medir la cantidad de RNAm en el puente de ratas con privación selectiva de sMOR por 24 hrs y ratas con rebote de sueño de 2 hrs, observamos que el RNAm disminuye después del rebote con respecto a las ratas controles y a las privadas, en contraste con la expresión del receptor CB1 (Fig. 6). En los controles de estrés no hay cambios significativos.

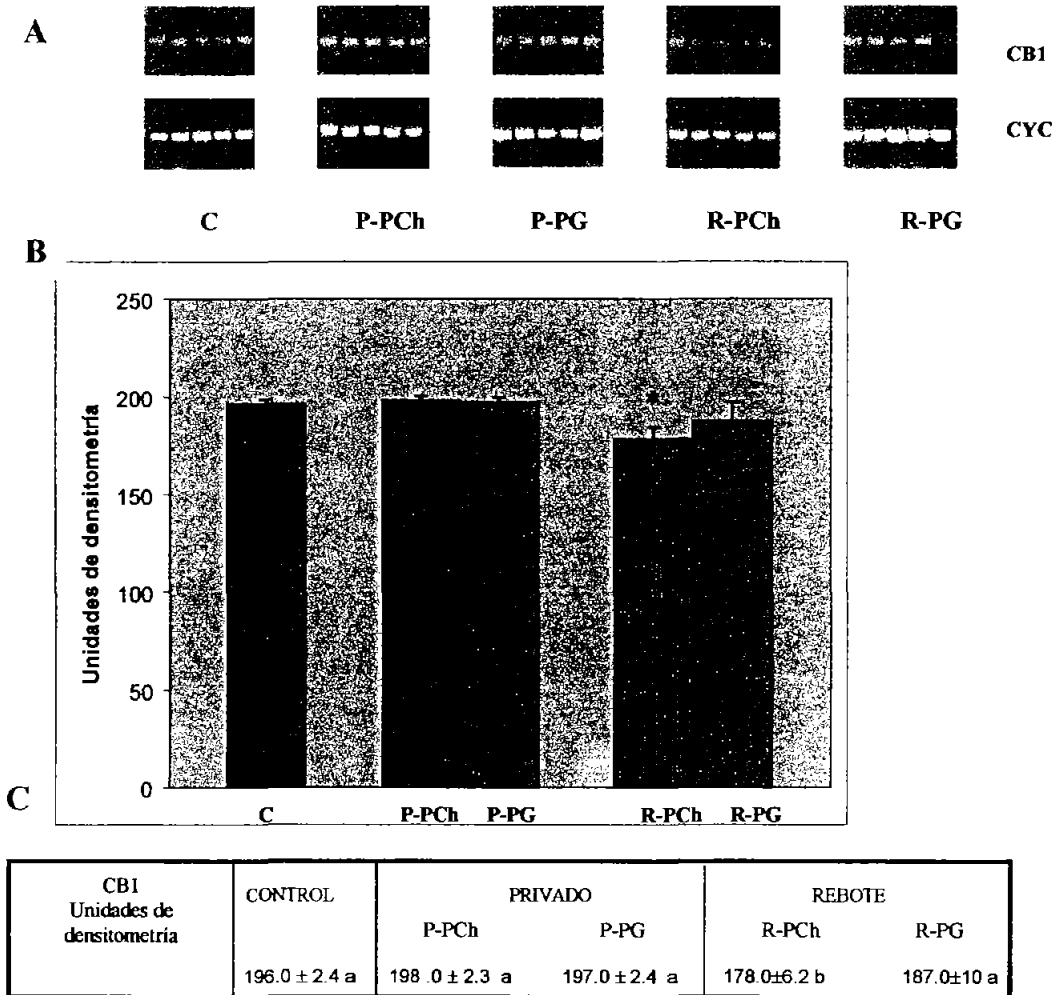


FIG. 6 Efecto de la privación de sMOR por 24 hrs y rebote de sueño de 2 hrs sobre el RNAm del receptor CB1(A) Fragmentos del PCR del gel teñido con bromuro de etidio, del puente de ratas controles (C), privadas de sMOR por 24 hrs (P-PCh), control de estrés de privación (P-PG), privadas de sMOR por 24 hrs, en plataforma chica, más dos horas de rebote de sueño (R-PCh) y control de rebote (privadas de sMOR por 24 hrs, en plataforma grande, más dos horas de rebote de sueño) (R-PG). El panel superior corresponde al receptor CB1 y el inferior a ciclofilina, utilizada como control. (B) Resultado de la densitometría obtenida de un negativo del gel teñido con bromuro de etidio, obsérvese un incremento significativo estadísticamente en el grupo de rebote; *P<0.05. (C) Valores a partir de los cuales se construyó la figura B. Las medias con letras diferentes son significativamente diferentes.

XI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Hoy en día, la función del sistema de endocannabinoides no se ha esclarecido completamente. Sin embargo al describir las variaciones diurnas que presenta su receptor estamos contribuyendo en el entendimiento de la función de dicho sistema. Nuestros datos indican que tanto el receptor CB1 como su RNAm, son expresados bajo un patrón de variación diurna en puente de rata, exhibiendo la proteína una mayor expresión durante la fase de luz, mientras que el RNAm presenta un máximo en las horas de oscuridad.

No es sorprendente encontrar variaciones diurnas en el receptor CB1, en el sentido de que muchos otros receptores presentan una variación a lo largo de las 24 hrs del día; por ejemplo, los receptores dopaminérgicos (Naber y cols., 1981, Wirz-Justice, 1984 y Torner y cols., 1998). A pesar de que la mayoría de los receptores expresan cambios mucho más conspicuos que aquellos que reportamos para el CB1, la variación en dicho receptor, creemos que es suficiente para inducir cambios fisiológicos. Así contribuye potencialmente en los efectos conductuales provocados por los cannabinoides vía dicho receptor. Por lo que podríamos decir que estamos ante un sistema muy sensible capaz de registrar cambios mínimos en su receptor para modular una conducta dada.

Al comparar la expresión del RNAm del receptor CB1 con la proteína, observamos que hay un desfase de aproximadamente 16 hrs. Se han encontrados resultados similares para la vasopresina y su RNAm; los niveles del péptido son altos durante la mañana (Tominaga, 1992), mientras que los niveles del RNAm son altos en la tarde (Burbach, 1988). Por otro lado, se ha reportado un tipo similar de desfase entre los niveles del RNAm y la proteína de la acetilcolintransferasa (ChAT)(Greco, 1999). Los niveles de RNAm de la ChAT, en el cerebro basal, fueron menores durante la vigilia y altos durante el sueño. En contraste la cantidad de la proteína en la misma estructura fue mayor durante la vigilia que durante el sueño.

En las ratas, a pesar de que son animales policíclicos, el sueño, principalmente el sueño MOR, se expresa de manera circadiana, teniendo mayor duración en las horas de luz (Méndez-Díaz y cols., 1999), lo cual concuerda con la mayor expresión del receptor CB1, es decir que la máxima expresión del receptor CB1 corresponde con el periodo máximo de sMOR. Datos previos obtenidos en nuestro laboratorio indican que la ANA, incrementa esta fase de sueño al unirse a los receptores a cannabinoides CB1 (Murillo y cols., 1998). Por otro lado hemos observado que la concentración de dicha molécula en el puente de rata presenta variaciones diurnas con un máximo nivel durante la fase de oscuridad (Murillo y cols., 2001b), sin embargo, su máxima concentración no coincide con la mayor expresión de sMOR, ni con la mayor expresión del receptor CB1, sino más bien está relacionada con niveles bajos del receptor, lo cual podría indicar que hay una regulación hacia la baja del receptor, inducida por el ligando, o bien tal coincidencia puede ser el resultado de los cambios inducidos por los mecanismos del sueño.

La variación de la expresión del receptor, concuerda con datos previos obtenidos en nuestro grupo, indicando que el efecto de la administración de ANA sobre el sueño depende de la hora de la administración. Se ha observado que la ANA produce un decremento en la cantidad de sMOR a las 13:00 hrs, cuando los receptores CB1 están más expresados e incrementan esta fase de sueño a la 01:00 hr, cuando los receptores son más bajos (Quiroz y cols., 2002).

Nuestros resultados indican que la privación de sueño total, no afecta la expresión del receptor CB1 ni sus niveles de RNAm. Sin embargo, el rebote de sueño incrementa significativamente la expresión del receptor CB1, mientras que decrece ligera pero significativamente su RNAm. Varios reportes han mostrado que el receptor y su RNAm no presentan una conducta paralela. Por ejemplo, se ha mostrado que la exposición a largo término de Δ^9 -THC, produce un decremento en la unión al receptor CB1 en varias estructuras cerebrales, mientras que no se observan cambios en su RNAm (Romero y cols., 1998). Parece ser que

la expresión del receptor CB1 está modulada por la vida media de la proteína y por su síntesis. No podemos descartar que el incremento de la proteína, visto en el rebote, sea debido a una disminución en la degradación del receptor y no a un incremento en su síntesis.

Retomando, las ratas que fueron privadas de sueño total por 24 horas, se les permitió un rebote de sueño de dos horas en su periodo activo (21:00 hrs), momento en el cual presentan menor expresión del receptor CB1 y una alta expresión en su RNAm. Con los resultados del rebote de sueño observamos que esta expresión del receptor fue revertida, en ambos niveles. Asimismo observamos que la expresión del receptor CB1 por el rebote de sueño fue cinco veces mayor que los cambios espontáneos obtenidos durante las 24 hrs del día, por lo que podríamos sugerir que la expresión del receptor CB1 se dispara durante el sueño y por lo tanto los endocannabinoides podrían estar regulando alguna función cerebral que se presenta mientras el sujeto esta dormido.

En nuestro grupo hemos comprobado que la privación de sMOR por un periodo de 24 hrs, incrementa el tiempo total de sMOR durante el periodo de rebote de sueño, el cual es prevenido por el SR141716-A (L. Navarro y cols., 2003).

Con los resultados obtenidos de la privación selectiva de sMOR, observamos que dicha manipulación no tiene efecto *per se* sobre la expresión del receptor CB1, ni a nivel de proteína ni de RNAm. Sin embargo, durante la fase de rebote de sueño se incrementa la expresión de dicho receptor a nivel de proteína y disminuye su RNAm significativamente. Este resultado indica que dichos cambios se deben más bien al rebote de sMOR, más que al rebote de SOL.

Finalmente, sabemos que cualquier tipo de privación de sueño, inclusive cualquier manipulación de la rata ocasiona cierto grado de estrés (Ledoux y cols., 1996). El estrés provocado por la privación de sueño podría estar alterando la función de los diferentes mecanismos en el SNC, como podemos observar en

nuestros resultados de privación selectiva de sMOR (Fig. 5, panel B), el control de estrés para la privación (P-PG), provoca un aumento significativo en la expresión del receptor CB1. Sin embargo, los controles de estrés durante el rebote de sueño (R-PG) descartan que las variaciones observadas en la expresión del receptor CB1, sean debidas al estrés que el método ocasiona, basándonos en que la expresión del receptor CB1 en el control de estrés (R-PG) no es diferente significativamente ni al grupo de ratas privadas (P-PG) ni al control (C), por lo que atribuimos que la mayor expresión del receptor CB1 durante el rebote se debe a la mayor cantidad de sMOR presentada durante dicha fase.

Datos previos de nuestro grupo indican que los endocannabinoides modifican el ciclo sueño-vigilia (Murillo y cols, 1998), y que dicho efecto es mediado por el receptor a cannabinoides CB1 (Murillo y cols, 2001). Los resultados aquí presentados fortalecen dicha hipótesis, debido a que señalan que los estados de vigilancia tienen un efecto en el sistema de endocannabinoides modificando la expresión del receptor CB1. Así pues, vemos que hay una interrelación entre el sistema de cannabinoides endógenos y los estados de vigilancia.

Hasta ahora conocemos la expresión del receptor CB1 durante las 24 hrs del día, la variación diurna de algunos de sus ligandos endógenos, entre ellos la ANA, cómo altera dicha molécula el ciclo sueño-vigilia (incrementando el SOL2 y el sMOR a expensas de la vigilia, en la rata), también que dicha molécula decrece la cantidad de sMOR a las 13:00 hrs, cuando los receptores CB1 están más expresados e incrementan esta fase de sueño a la 01:00 hr, cuando los receptores son más bajos, entre otras cosas. Sin embargo nos faltaría por conocer gran parte de cómo funciona el sistema de cannabinoides endógenos, por ejemplo como se encuentran los niveles de los ligandos endógenos cuando se altera el ciclo sueño-vigilia, por privación total de sueño y/o por privación selectiva de sMOR; la funcionalidad de los receptores CB1, basándonos en que la presencia del ligando se ha reportado que provoca una regulación a la baja, es decir un decremento en la unión al receptor CB1, sin presentar cambios en su RNaM (Romero y cols, 1998) o bien inducen internalización del receptor sin alterar el número de

receptores, así como también se ha observado que provocan desensibilización (Rinaldi y cols., 1998 y Hsie y cols., 1999), pero todo esto es en presencia del Δ^9 -THC y de agonistas sintéticos, sin embargo no se conoce qué está pasando con los ligandos endógenos, lo cual sería muy interesante saber para conocer más acerca del sistema de cannabinoides endógenos y su participación en el sueño.

A pesar de que falta mucho por conocer, nuestros resultados nos permiten postular al sistema de cannabinoides endógenos como reguladores y moduladores de los estados de vigilancia

XII. PERSPECTIVAS

Aún queda mucho por investigar acerca del sistema de endocannabinoides y su función sobre el sueño. Con los resultados obtenidos durante este trabajo y por trabajos previos tanto en nuestro grupo como en otros grupos, es muy probable que los cannabinoides endógenos estén participando en la generación y modulación del sueño, vía el receptor CB1.

Básicamente, se necesitarían hacer inmunohistoquímicas e hibridaciones *in situ* a las diferentes horas del día y con privación de sueño MOR, para detectar cuantitativamente los cambios en el receptor a cannabinoides CB1, en otras estructuras relacionadas con sueño.

Hasta ahora sabemos como es la expresión de los receptores a lo largo del día, cómo varía ésta al alterar el ciclo sueño-vigilia, pero no sabemos si el receptor es funcional, por lo que se necesitaría hacer estudios de unión del ligando (binding). Asimismo se necesita medir la cantidad de AMP cíclico en diferentes condiciones: a lo largo de las 24 hrs del día o más específicamente en los dos puntos del día donde encontramos las principales diferencias en la expresión del receptor CB1, es decir a las 13:00 hrs y a las 01:00 hrs; medirlo en privación selectiva de sMOR por 24 hrs y en privación selectiva de sMOR más dos horas de

rebote. Recordando de que se trata de un receptor metabotrópico que está acoplado a una proteína G y al activarse inhibe la AC y a su vez la conversión de ATP a AMPc, por lo que la cantidad de AMPc encontrado nos daría una idea de su funcionalidad.

Podría ser interesante también estudiar su colocación con otros receptores, por medio de inmunohistoquímica de fluorescencia, por ejemplo con los muscarínicos, específicamente el M1 y el M4 con base a que sabemos que la ANA se pega además de los receptores CB1 a los receptores colinérgicos, específicamente a los muscarínicos M1 y M4 (Di Marzo, 2001) y así saber si los endocannabinoides están actuando sobre sustratos específicos neuroanatómicos, responsables de la generación del sMOR.

Como sabemos éste sistema está ampliamente distribuido en el cerebro, por lo que se involucra en una gran cantidad de conductas, lo cual aumenta la gama de estudios que se podrían seguir realizando en torno a dicho sistema para conocer acerca de los muchos efectos que provoca en el organismo. Regulan funciones tales como el sueño, la conducta sexual, procesos vitales como es la ingesta de alimento y el aprendizaje, así como la regulación de la temperatura y la percepción del dolor.

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aceves C, Pineda O, Ramírez CI, Navarro L, Valverde RC (1999) Mammary Type I Deiodinase (M-D1) is dependent on the suckling stimulus. Differential role of norepinephrine and prolactin. *Endocrinol.* 140:2948-2953.

Aguilar-Roblero R. (1989): Estudios morfológicos y funcionales sobre trasplantes del núcleo supraquiasmático fetal. Tesis de Doctorado.

Ameri, A (1999). The effects of cannabinoids on the brain. *Prog. Neurobiol.* 58:315-348.

Antrobus J (1993). Basics of Sleep Behavior. *Sleep Research Society. UCLA & SRS,*

Aserinsky E and Kleitman N (1953). Regulatory occurring periods of eye motility and concomitant phenomena during sleep. *Science* 118:273-274.

Astron-Jones G, Bloom FE (1981). Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuation in the sleep-waking cycle. *J. Neurosci.* 1:876-886.

Azuma S, Kodama T, Honda K, Inoue S (1996). State dependent changes of extracellular glutamate in the medial preoptic area in freely behaving cats *Neurosci Lett* 214:179-182.

Benkert O and Kohler B (1972). Intrahypothalamic and intrastriatal dopamine and norepinephrine injections in relation to motor hyperactivity in the rat. *Psychopharmacol* 24(2):318-325.

Blier P, de Montigny C (1994). Current Advances and trends in the treatment of depression. *Trends Pharmacol Sci.*

Bouaboula M, Dessnoyer N, Carayon P, Combes T, Carellas P (1999) Gi-protein modulation induced by a selective inverse agonist for the peripheral cannabinoid receptor CB2: Implications for intracellular signalization cross-regulation. *Mol Pharmacol* 55:473-480.

Borbély AA; Achermann P; Geering B and Tobler I. (1998) Processes Underlying Sleep Regulation. Watson SJ. (Ed.) *Psychopharmacology: The fourth Generation of Progress*. Versión No. 2, CD ROM. ACNP Inc., Lippincott-Raven, New York.

Brown RE, Stevens DR and Hass HL (2001). The physiology of brain histamine. *Progr. Neurobiol.* 63:637-672.

Burbach JP., Liu B., Voorhuis TA., Van Tol HH. (1988): Diurnal variation in vasopressin and oxytocin messenger RNAs in hypothalamic nuclei of the rat. *Brain Res.* 464:157-160.

Cape EG and Jones BE (1998). Differential modulation of high frequency gamma electroencephalogram activity and sleep-wake state by noradrenaline and serotonin microinjections into the region of cholinergic basal ganglia neurons. *J. Neurosci.* 18 (7):2653-2666.

Carskadon MA and Dement WC (2000). Normal human sleep: An overview. En *Principles and Practice of Sleep Medicine*. Kryger, Roth, Dement (Eds.) WB Saunders Company. USA. pp. 15-25.

Cassone VN, Speh JC, Card JP, Moore RY, Devane WA, Dysarz FA, Johnson MR, Melvin LS and Howlett AC. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 34:605-613.

Childers SR, Deadwyler SA. (1996). Role of cyclic AMP in the actions of cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.* 27;52(6):819-827.

Corsi Cabrera M. (1983). *Psicofisiología del sueño*. Editorial Trillas. México, D.F.

Cravatt BF, Prospero-García O., Siuzdak G., Gilula NB., Henriksen SJ, Boger DL, Lerner RA. (1995): Chemical characterization of a family of brain lipids that induce sleep. *Science* 268:1506-1509.

Daniele Piomelli, Andrea Giuffrida, Antonio Calignano and Fernando Rodríguez de Fonseca (2000) The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends in Pharmacological Science (TIPS)* June Vol. 21 218-224.

Datta S, Spoley EE, Mavanji VK and Patterson EH. (2002) A novel role of pedunculo-pontine tegmental kainate receptors: A mechanism of rapid eye movement sleep generation in the rat. *Neuroscience* Vol. 114 (1): 157-64.

de Lecea J, Criado JR, Prospero-García O, Gautvik KM, Schweltzer P, Danielson P, Dunlop DLM, Siggins GR, Henriksen SJ and Sutcliffe JG. (1996). A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. *Nature* 381:242-245.

Devane WA, Dysarz FA, Johnson MR, Melvin LS and Howlett AC (1988) Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol. Pharmacol* 34:605-613.

Devane, W.A; Hanus, L.; Brever, AS.; Pertwee, R.G; Stevenson, L.A.; Griffin, G.; Gibson, D; Mandelbaum, A.; Etinger, A. y Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258:1948-1949.

Di Marzo V, Bisogno T, De Petrocellis L. (2001) Anandamide: some like it hot. *TIPS* 22:346-349.

Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D. (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*. 15;372(6507):686-691.

Drucker-Colin R, Pedraza JG (1983) Kainic acid lesions of gigantocellular tegmental field (FTG) neurons does not abolish REM sleep. *Brain Res*. 272:387-391.

Drucker-Colin R, Aguilar-Roblero R, García-Hernández F, Fernández-Cancino F, Bermudez Rattóni F. (1984) Fetal suprachiasmatic nucleus transplants: diurnal rhythm recovery of lesioned rats. *Brain Res*. 8;311(2):353-357.

Egertova M, Giang DK, Cravatt BF and Elphick MR (1998). A new perspective on cannabinoid signaling: complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB1 receptor in rat brain. *Proc R Soc Lond* 265:2081-2085.

el Mansari M, Sakai K, Jouvet M. (1989) Unitary characteristics of presumptive cholinergic tegmental neurons during the sleep-waking cycle in freely moving cats. *Exp Brain Res*. 76(3):519-529.

Everson CA, Bergmann BM, Rechtschaffen A. (1969). Sleep deprivation in the rat : III. Total sleep deprivation. *Sleep*. 12(1):13-21.

Feinberg I., Jones R., Walker J., Cavness B.A., and March J. (1975). Effects of high dosage delta-9- tetrahydrocannabinol on sleep patterns in man. *Clin. Pharmacol. Ther*. 17(4):458-466.

Feinberg I., Jones R., Walker J., Cavness C., and Floyd T (1976). Effects of marijuana extract and tetrahydrocannabinol on electroencephalographic sleep patterns. *Clin. Pharmacol. Ther*. 19(6):782-784.

Felder C Ch., Nielsen A, Briley EM, Palkovits M, Priller J, Axelrod J, Nguyen D.N, Richardson JM, Riggan RM, Koppel GA, Paul SM and Becker GW. (1996). Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett* 393: 231-235.

Felder Ch. and Glass M. (1998). Cannabinoid receptors and their endogenous agonists. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38:179-200.

Findlay ALR and Hayward JN (1969). Spontaneous activity of single neurons in the hypothalamus of rabbits during sleep and waking. *J. Physiol.* 20:237-258.

Freud S. (1943): *La interpretación de los sueños*. En Editorial Sudamericana. Obras completas. Vol. 6-7. Buenos Aires, Argentina.

Friesen WO, y Block GD. (1984): What is a biological oscillator? *Am J Physiol* 246: R847-851.

Gaoni Y, and Mechoulam R. (1964): Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J. Am. Chem. Soc.* 86: 1648-1647.

Gerdeman G. and Lovinger D.M. (2001). CB1 cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum. *J. Neurophysiol.* 85(1):468-471.

Gervasoni D, Darracq P, Fort P, Souliere F, Chouvet G and Lippi P (1998) Electrophysiological evidence that noradrenergic neurons of the rat locus coeruleus are tonically inhibited by GABA during sleep. *European Journal of Neuroscience*. Vol 10 964-997.

Giang DK and Cravatt BF. (1997). Molecular characterization of human and mouse fatty acid amide hydrolases. *Procc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:2238-2242.

Giuffrida A, Parson LH, Kerr TM, Rodríguez de Fonseca F, Navarro M, Piomelli D. (1999) Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nat Neuroscience*. 2(4):358-363.

Glass M., Dragunow M. and Faull R.L.M. (1997). Cannabinoid receptor in the human brain: a brain detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neurosci*. 77 (2): 299-318.

Greco MA., McCarley RW., Shiromani PJ. (1999). Choline acetyltransferase expression during periods of behavioral activity and across natural sleep-wake states in the basal forebrain. *Neuroscience* 93:1369-1374.

Gritti I , Maainville L, Mancina M and Jones BE. (1997). GABAergic and other noncholinergic basal forebrain neurons, together with cholinergic neurons, project to the mesocortex and isocortex in the rat. *J. Comp. Neurol* 383 (2):163-177.

Grotenhermen F. (2003) Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cannabinoids. *Clin Pharmacokinet* 42 (4) 327-360.

Halberg F (1959): Physiologic 24-hour periodicity in human being and mice, the lighting regimen and daily routine. En: RB Withrow (De.). *Photoperiodicity and related phenomena in plant and animals A.A.A.S.*, pp 803-878.

Henriksen SJ, Dement W, Barchas J (1974). The role of serotonin in regulation of a phasic event of rapid eye movement sleep: the ponto-geniculo-occipital wave. En: Costa E., Geasa GL, Sandler M. Ed *Advances in Biochemical Pharmacology*. 11:169-179. New York: Raven Press.

Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Jhonson MR, Melvin LS, de Costa BR, and Rice K. (1990) Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87:1932-1936.

Hernández-Peón R, Chavez-Ibarra G, Morgane P, Timo-Lara C (1962). Cholinergic pathways for sleep, alertness and rage in the limbic midbrain circuit. *Acta Neurologica latinoamericana* 8:93-96

Hobson JA (1995). *Sleep*, Scientific American Library.

Hobson JA, Datta S, Calvo JM, Quattrochi J (1993). Acetylcholine as a brain state modulator: triggering and long-term regulation of REM sleep. *Progress in Brain Res.* 98:389-404.

Hobson JA, McCarley RW and Wyzinski PW (1975). Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science* 189:55-58.

Holmes MC, French KL, Seckl JR (1995). Modulation of serotonin and corticosteroid receptors gene expression in the hippocampus with circadian rhythm and stress. *Mol Brain Res*; 28(2):186-192

Howlett A.C., and Fleming R.M. (1984). Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase: Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol. Pharmacol.* 26:532-538.

Hugs M and Mignot E (2001) Hypocretin/orexin, sleep and narcolepsy. *BioEssays* 23:397-408

Hulme EC, Birdsall NJM and Buckley NJ (1990). Muscarinic receptors subtypes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30:633-673.

Hsieh C, Brown S, Derleth C, Mackie K (1999). Internalization and recycling of the CB1 cannabinoid receptor. *J Neurochem.* 73(2):493-501.

Jacobs BL (1993) Frontal CA 5-HT and motor control: a hypothesis, *Trends Neurosci.* 16:346-352.

Jacobs BL and McGinty DJ (1971). Amygdala unit activity during sleep and wakefulness. *Exp. Neurol.* 33:1-15.

Jiménez-Anguiano A, Prospéro-García O, Salín-Pascual R, Drucker-Colín R (1995). Péptidos gastroentéricos en la regulación del Sueño MOR. En: Velásquez-Moctezuma J (ed) *Temas selectos de neurociencias*. Universidad Autónoma Metropolitana. México, 1995. pp: 51-68.

Jones B. (2000): Basic Mechanisms of sleep-wake states. En *principles and practice of Sleep Medicine*, Kryger, Roth, Dement (Eds.) W.B. Saunders Company. Pp:134-154.

Jones BE and Mühlethaler M. (1999). Cholinergic and GABAergic neurons of the basal forebrain: Role in cortical activation. En: *Handbook of Behavioral State Control. Cellular and Molecular Mechanism*. Lydic and Baghdoyan (Eds). CRC Press USA. pp:213-234.

Jouvet. (1969). Biogenic amines and the states of sleep. *Science* 163:32-41.

Jouvet M, Michel F. (1959) Electromyographic correlations of sleep in the chronic decorticate and mesencephalic cat. *CR Seances Soc Biol Fil.* 153(3):422-425

Jouvet M, Jeannerod M, Delorme F. (1965). Organization of the system responsible for phase activity during paradoxal sleep. *CR Seances Soc Biol Fil.* 159(7):1599-1604.

Kafka MS, Wirz-Justice A, Naver D, Moore RY, Benedito MA (1982). Circadian rhythms in rat brain neurotransmitter receptors. *Fed Proceedings* 42: 2796-2801.

Kafi S. and Gaillard JM (1976). Brain dopamine receptors and sleep in the rat: effects of stimulant blockade. *Eur. J. Pharmacol.* 38(2):357-363.

Kayama Y, Ohta M, Jodo E (1992). Firing of possibly cholinergic neurons in rat laterodorsal tegmental nucleus during sleep and wakefulness. *Brain Res.* 569:210-220.

Kayama Y., Ohta M., and Judo E. (1992). Firing of possibly cholinergic neurons in the rat laterodorsal tegmental nucleus during sleep and wakefulness. *Brain Res.* 569:210-220.

Klein TW, Newton C, Friedman H. (1998). Cannabinoid receptor and the cytokine network. *Adv Exp Med Biol.* 437:215-222.

Krueger JM, Karnovsky ML, Martin SA, Pappenheimer JR, Walter J, Biemann K (1984) Peptidoglycans as promoters of slow-wave sleep II. Somnogenic and pyrogenic activities of some naturally occurring muramyl peptides; correlation with mass spectrometric structure determinations. *J Biol Chem* 259:12659-12662.

Landsman RS, Burkey TH, Consroe P, Roeske WR, Yamamura HI. (1997). SR141716A is an inverse agonist at the human cannabinoid CB1 receptor. *Eur J Pharmacol.* 3;334(1):R1-2.

L. Navarro, M. Martínez-Vargas, E. Murillo-Rodríguez, A. Landa, M. Méndez-Díaz and O. Prospéro-García. Potencial Role of the Cannabinoid Receptor CB1 in Rapid Eye Movement Sleep Rebound. *Neuroscience* 120 (2003) 855-859.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Lai YY, Clements JR, Siegel JM (1993) Glutamatergic and cholinergic projections to the pontina inhibitory area identified with horseradish peroxidase retrogradetransport and immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 336:321-330.

Lavoie B, Parent A (1994). Pedunculopontine nucleus in the squirrel monkey: Distribution of cholinergic and monoaminergic neurons in the mesopontine tegmentum with evidence for the presence of glutamate in cholinergic neurons. *J Comp Neurol* 344:190-209.

Ledoux L, Sastre JP, Buda C, Luppi PH, Jouvet M (1996) Alterations in c-fos expression after different experimental procedures of sleep deprivation in the cat. *Brain Res* 735:108-118.

Lerner RA., Siuzdak G., Prospéro-García O., Henriksen SJ., Boger DL., y Cravatt BF. (1994): Cerebrodiene: a brain lipid isolated from sleep deprived cats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9505-9508.

Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, Lin X, Qui X, deJong PJ, Nishino S, and Mignot E. (1999). The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell* 98:365-376.

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, y Randall RJ, (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.

Maloney KJ, Mainville L and Jones BE (2000) c-Fos Expresión in GABAergic, Serotonergic and Other Neurons of the Pontomedullary Reticular Formation and Raphe after Paradoxical Sleep Deprivation and Recovery. *The Journal of Neuroscience*, June 15, 20 (12): 4669-4679.

Mallick BN, Kaur S and Saxena RN (2001) Interaction between cholinergic and GABAergic neurotransmitters in and around the Locus Coeruleus for the induction and maintenance of rapid eye movement sleep in rats. *Neuroscience* Vol. 104, No. 2, pp. 467-485)

Martin SA, Karnovsky M L, Krueger JM, Pappenheimer JR, Biemann K (1984) Peptidoglycans as promoters of slow-wave sleep I. Structure of the sleep-promoting factor isolated from human urine. *J Biol Chem* 259: 12652-12658.

Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein, M, Young A, and Bonner TI. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346:561-564.

Matsuda LA, Bonner TI, Lolait SJ (1993). Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J. Comp Neurol* 22;327(4):535-550

Mendelson W.B. and Basile A.S. (1999). The hypnotic actions of oleamide are blocked by a cannabinoid receptor antagonist. *Neuroreport* 10: 3237-3239.

Moore RY. (1973). Retinohypothalamic projection in mammals: A comparative study. *Brain Res.* 49: 403-409.

McCormic DA. (1992). Neurotransmitter actions in the thalamus and cerebral cortex and the role un neuromodulation of thalamocortical activity. *Progr. Neurobiol.* 39(4):337-388.

McGinty D, Harper R (1976) Dorsal raphe neurons: depression of firing during sleep in cats. *Brain Res.* 101:569-579.

Mechoulam R, Ben-Shabat, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almong S, Martin BR, Compton DR, Pertwee RG, Griffin G, Bayewitch M, Barg J. and Vogel Z (1995). Identification of an endogenous 2 -monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* 50:83-90

Mechoulam R, Fride E, Di Marzo V, (1998a). Endocannabinoids. *Eur J Pharmacol* 359:1-18.

Mechoulam R, Friede E, Hanus L, Sheekin T, Bisogno T, Di Marzo V, Bayewitch M, Vogel Z (1997) Anandamide may mediate sleep induction. *Nature* 389:25-26.

Medina Mora ME, Cravioto P, Villatoro J, Fleiz C, Galvan Castillo F, Tapia Conyer R. (2003). Consumo de drogas entre adolescentes: Resultado de la encuesta nacional de adicciones, 1998. *Salud Publica, Mex.* 45 suplemento 1 de 2003.

Mendelson WB and Basile AS (1999). The hypnotic actions of oleamide are blocked by a cannabinoid receptor antagonist. *Neuroreport* 10:3237-3239.

Méndez-Díaz M, Jiménez Anguiano A, Navarro L and Próspero García O. (1999) Effects of diurnal variations of cortistatin sleep and memory. *Society for Neuroscience 29 st Annual Meeting*

Mikiten T, Niebyl P and Hendley C. (1961). EEG desynchronization during behavioral sleep associated with spike discharges from the thalamus of the cat. *Fed. Proc.* 327.

Monnier M, Saucer R and Hatt AM. (1970). The activating effect of histamine on the central nervous system. *Int. Rev. Neurobiol.* 12:265-305.

Monti JM and Monti D (2000) Role of dorsal raphe nucleus serotonin 5-HT_{1A} receptor in the regulation of REM sleep. *Life Sciences*, Vol. 66, No. 21, pp 1999-2012.

Munro S, Thomas KL and Abu-Shaar M (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365:61-65.

Murillo Rodríguez E. (1998). Aprendiendo mientras dormimos: el sueño de movimientos oculares rápidos y la memoria. *Psiquis (México)*, vol. 7 num. 5.

Murillo-Rodríguez E, Giuffrida A, Deanaud F, Próspero-García O, Piomelli D (2001b) Diurnal variations of endogenous cannabinoid in CSF and brain of the rat. 33rd Annual Meeting of the Society for Neurosciences, San Diego, California. Abs 805.2.

Murillo-Rodríguez E., García-Sierra Y., Navarro L. and Próspero-García O. (2000). Oleamide and Anandamide modulating sleep via cannabinoid receptor. APSS Ann Meeting. p47.

Murillo-Rodríguez, Sánchez-Alavez, Navarro Luz, Martínez-González, Drucker-Colin, Próspero García. (1998). Anandamide modulates sleep and memory in rats. Brain Research 812:270-274.

Murillo-Rodríguez, E, Piomelli D and Prospero-García O (2001). 33th Annual Meeting of the Society for Neurosciences, San Diego, CA.

Naber D, Wirz-Justice A, Kafka MS, Tobler I, Borbely AA (1981) Seasonal variations in the endogenous rhythm of dopamine receptor binding in rat striatum. Biol Psychiatry 16:831-835.

Navarro L, Murillo-Rodríguez E, García-Sierra Y, Guzmán Marín R, Martínez González D; Cisneros M y Martínez-Vargas M. (2000) La neuroquímica del sueño. En: Tópicos en Psiquiatría Biológica Editores Carlos Torner Aguilar y Javier Velázquez Moctezuma (2000) Sociedad Mexicana de Psiquiatría Biológica Texto Conmemorativo XXX Aniversario)

Pace-Schott & Hobson (2002). Basic Mechanisms of Sleep: New Evidence on the Neuroanatomy and Neuromodulation of the nREM-REM Cycle en: Davis KL, Charney D, Coyle JT and Nemeroff Ch. (Editors) Neuropsychopharmacology The Fifth Generation of Progress An official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology Ed. Lippincott Williams & Wilkins.

Pace-Schott EF and Hobson JA (2002) The neurobiology of sleep: Genetics, cellular physiology and subcortical networks. *Neuroscience* Vol 3 August. Pag. 561-605).

Pittendrigh CS. (1993): Temporal organization reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu Rev Physiol* 55:17-54.

Porcella A, Casellas P, Gessa GL, Pani L. (1998). Cannabinoid receptor CB1 mRNA is highly expressed in the rat ciliary body: implications for the antiglaucoma properties of marihuana. *Brain Res Mol Brain Res.* 15;58(1-2):240-245.

Porkka-Heiskanen T, Strecker RE, Takkar M, Bjorkum AA, Greene RW, McCarley RW (1997). Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness. *Science* 276:1265-1268.

Prospéro García O, Murillo Rodríguez E, Jiménez Anguiano A, Navarro L, Sánchez Alavéz M, Gómez M. Martínez González D, Palomero M. and Drucker Colin R. (1999). Psychometric drugs, marijuana and 5-HT antagonist. En: Lydic R. and Baghdoyan H.A. (eds). *Handbook of behavioral state control: cellular and molecular mechanisms.* Raven Press, New York. 433-442.

Prospéro-García O and Drucker-Colín R (1996). Control neural del ciclo vigilia-sueño: mecanismos neurofisiológicos y neuroquímicos. Factores inductores de sueño. En: Ramos Platón MJ (ed) *Sueño y procesos cognitivos* Ed. SÍNTESIS Madrid.

Prospéro-García O, Jiménez-Anguiano A, Navarro L, Murillo-Rodríguez E, Sánchez-Alavéz M, Méndez-Díaz M, Díaz-Ruiz O, Drucker-Colin R, Palomero Rivero M y González Martínez M (2000). *Neuroquímica del Sueño.* En: Valencia M (ed). *Transtornos en el dormir: diagnóstico y tratamiento,* McGraw-Hill. Interamericana.

Prospéro-García O, Morales M, Arankowsky-Sandoval G, Drucker-Colin R (1986). Vasoactive Intestinal polypeptide (VIP) and cerebrospinal fluid (CSF) of sleep deprived cats restores REM sleep in Insomniac recipients. *Brain Res.* 385:169-173.

Quiroz Torres AM, Montes-Rodríguez C, Galicia O, Martínez-Vargas M, Haro-Valencia R, Navarro L, Prospero-García O (2002). Effects of Anandamide and Oleamide on the Sleep-Waking Cycle Depend on Diurnal Variations. 16th APSS Annual Meeting, Seattle, Washington. *Sleep Suppl* 25:A410.

Radulovacki M, Porter NM, Green RD (1989). Adenosine compound and sleep. En Wauquier A, Dugovic C, Radulovacki M (eds) *Slow Wave Sleep: Physiological, pathophysiological and functional aspects*. Raven Press. New York pp 243-256.

Ranson S.W., (1939): Somnolence caused by hypothalamic lesions in the monkey. *Arch. Neurol. Psychiat.* 49:1

Ray, O and Ksir, C., (1996): *Drugs, Society, and Human Behaviour*, 7th ed., Mosby, Boston, chaps 16 and 17.

Rechtschaffen A and Kales A. (1968). *A Manual of Standardized Terminology Techniques and Scoring System for Sleep Stages of Human Subjects*. BIS. BRI.UCLA. Los Angeles. U.S.A.

Rinaldi-Carmona, M, Barth F, Héaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martínez S, Marvani J, Néliat G, Caput D, Ferrara P, Subiré P, Brelière JC, Le Fur G (1994). SR141716A a potent and selective agonista of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett* 350:240-244.

Rinaldi-Carmona M, Le Duigou A, Oustric D, Barth F, Bouaboula M, Carayon P, Casellas P, Le Fur G. (1998) Modulation of CB1 cannabinoid receptor functions

after a long-term exposure to agonist or inverse agonist in the Chinese hamster ovary cell expression system. *J Pharmacol Exp Ther.* 267(3):1038-1047.

Riou F, Cespuglio R, Jouvét M (1982). Endogenous peptides and sleep in the rat III. The hypnogenics properties of vasoactive intestinal polypeptide. *Neuropeptides* 2:265-277.

Romero J, Berrendero, F, Manzanares J, Pérez, A, Cocheró J, Fuentes JA, Fernández-Ruiz JJ, and Ramos JA (1998). Time-course of the cannabinoid receptor down-regulation in the adult rat brain caused by repeated exposure to delta-9 tetrahydrocannabinol. *Synapse* 30: 298-308.

Rusak B: Vertebrate behavioral rhythms. In Aschoff (1980). J (ed): *Handbook of behavioral Neurobiology*. Vol 4. Biological Rhythms. New York, Plenum, pp 182-214.

Saper CB, Chou TC and Scammell TE (2001) The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness. *TRENDS in Neurosciences* Vol. 24 No. 12 pp. 726-731

Sastre JP, Sakai K, Jouvét M (1981). Are the gigantocellular tegmental field neurons responsible for paradoxical sleep? *Brain Res* 229:147-161.

Schoenenberger GA and Monnier M. (1977). Characterization of a delta-electroencephalogram (-sleep)-inducing peptide. *Proc. Natl Acad. Sci.* 74(3):12882-12886.

Shire D, Carillon C, Kaghad M, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Caput D, Ferrara P. (1995) An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. *J Biol Chem.* 24;270(8):3726-3731.

Shiromani PJ, Armstrong DM, Gillin JC. (1988). Cholinergic neurons from the dorsolateral pons project to the medial pons: a WGA-HRP and choline acetyltransferase immunohistochemical study. *Neurosci Lett.* 95:19-23.

Shiromani PJ, Scammel, Sherin JE and Saper C. (1999). Hypothalamic regulation of sleep. En: *Handbook of Behavioral State Control. Cellular and Molecular Mechanism.* Lydic and Baghdoyan (Eds.). CRC Press U.S.A. pp: 311-326.

Siegel JM. (2000). Brainstem Mechanisms Generating REM Sleep. En: *Principles and Practice of Sleep Medicine.* Kryger, Roth, Dement (Eds.) WB Saunders Company. USA. pp:112-133.

Smith (1991) en Jones BE (2000). *Basic Mechanisms of sleep-wake states en: Kryeger M. H, Roth T and Dement W. C (2000). (eds). Principles and Practice of Sleep Medicine. Third edition Ed. W. B. SAUNDERS COMPANY Philadelphia U.S.A.*

Stella N, Schweitez P and Piomelli D. (1997). A second endogenous cannabinoid ligand that modulates long-term potentiation. *Nature* 388:773-778.

Steriade M. (1994). Sleep oscillations and their blockage by activating systems. *J Psychiatry Neuroscience.* 19(5):354-358.

Steriade M. (1999). Cellular substrates of oscillations in corticothalamic systems. En: *Handbook of Behavioral State Control. Cellular and Molecular Mechanisms.* Lydic and Baghdoyan (Eds.). CRC Press U.S.A. pp:327-348.

Steriade M. and Llinás R. (1988). The functional states of the thalamus and the associated neuronal interplay. *Physiol. Rev.* 68(3): 649-742.

Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, and Waku K (1995). 2-arachidonoylglycerol: A possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem, Biophys. Res. Comm.* 215:89-97.

Tapia-Conyer R, Medina-Mora ME, Sepúlveda J, De la Fuente R, Kumate J. (1990). The national addictions survey of Mexico. *Salud Publica Mex., Sep-Oct;* 32(5):507-522.

Thakkar M, Portas CM and McCarley RW (1996). Chronic low amplitude electrical stimulation of the laterodorsal tegmental nucleus of freely moving cats increases REM sleep. *Brain. Res.* 723 (1-2):223-227.

Thomas EA, Cravatt BF, Danielson PE, Gilula NB, Sutcliffe JG. (1997). Fatty acid amide hydrolase, the degradative enzyme for anandamide and oleamide, has selective distribution in neurons within the rat central nervous system. *J Neurosci Res*, Dec 15;50(6):1047-1052.

Timo-Iraria (1970), en: Yoshimoto. M; Higuchi H; Kamata M; Yoshida K; Shimizu T and Hishikawa Y. (1999) The effects of benzodiazepine (triazolam), cyclopyrrolone (zopiclone) and imidazopyridine (zolpidem) hypnotics on the frequency of hippocampal theta activity and sleep structure in rats. *European Neuropsychopharmacology* 9, 29-35)

Tominaga K, Shinohara K, Otori Y, Fukuhara C, Inouye ST (1992) Circadian rhythms of vasopressin content in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neuroreport* 3:809-812.

Toppila J, Niittymäki P, Porkka-Heiskanen and Stenberg D. (2000) Intracerebroventricular and locus coeruleus microinjections of somatostatin antagonist decrease REM sleep in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, Vol. 66, No. 4, pp. 721-727)

Tomer C, Sánchez-Hurtado S, Aguilar-Roblero R (1998) Diurnal variations of striatal D2 dopaminergic receptors and its relation with haloperidol-induced catalepsy. *Biol Rhythm Res* 29:538-545.

Tortorolo P. (2002) Hipocretinas: neuropeptidos que regulan la actividad motora y el sueño. *Actas de Fisiología*, 8:71-86)

Tsuo K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 83, 393-411.

Velázquez-Moctezuma J, Gillin JC, and Shiromani PJ. (1989). Effect of specific M₁ Wang PC, Buu NT, Kuchel O. (1983). Conjugation patterns of endogenous plasma catecholamines in human and rat. A new specific method for analysis of glucuronide-conjugated catecholamines. *Genest J. J Lab.*

Velázquez-Moctezuma J, Shiromani PJ, Gillin JC (1990). Acetylcholine and acetylcholine receptor subtypes in REM sleep generation. *Prog Brain Res*; 84:407-413.

Webster HH, and Jones BE. (1988). Neurotoxic lesions of the dorsolateral pontomesencephalic tegmentum-cholinergic area in the cat. II. Effects upon sleep-waking states. *Brain. Res.* 458 (2):285-302.

Williams JA, Comisarow J, Day J, Fibiger HC, and Reiner PB (1994). State-dependent release of acetylcholine in rat thalamus measured by in vivo microdialysis. *J. Neurosci.* 14 (9):5236-5242.

Wilson R. and Nicoll RA. (2002). Endocannabinoid Signaling in the Brain. *Science* 296:678-682.

Wirz-Justice A. (1984) Dopamine receptor rhythms. *Biol Psychiatry*. 19(8):1274-1276.

Wise RA. (1998). Drug activation of brain reward pathways. *Drug alcohol depend*. 51(1-2):13-22

Yoshimoto. M; Higuchi H; Kamata M; Yoshida K; Shimizu T and Hishikawa Y. (1999) The effects of benzodiazepine (triazolam), cyclopyrrolone (zopiclone) and imidazopyridine (zolpidem) hypnotics on the frequency of hippocampal theta activity and sleep structure in rats. *European Neuropsychopharmacology* 9, 29-35)

Zeppelin H, (2000). Mammalian sleep. En: *Principles and practice of Sleep Medicine*. Kryger, Roth, Dement (Eds). W.B.. Saunders Company. U.S.A. pp:82-92.

Zoltoski RK, Cabeza R, de J, and Gillin C. (1999). *Biochemical Pharmacology of Sleep Disorders Medicine*. Chokroverty y Daroff (Eds.). Butterworth Heinemann. U.S.A. pp:63-94.

XIV. ARTÍCULOS ANEXOS Y TRABAJOS EN CONGRESOS

Los resultados del trabajo presentado, se enviaron parcialmente a los siguientes congresos:

- **Martínez-Vargas M.**, Murillo-Rodríguez E., Próspero-García O., y Navarro L. *"Variación Circádica en la Expresión del Receptor CB1 en el puente e Hipocampo de la Rata"* III Congreso Nacional. Sociedad Mexicana para la Investigación Y Medicina del Sueño. A.C. UAM-I-UNAM (Diciembre 1-4, 1999).
- **Martínez-Vargas M.**, (Avalado por Rivas-Arancibia S.), González-Rivera R., Murillo-Rodríguez E., Landa A., Próspero-García O. y Navarro L. *La Expresión del receptor a Canabinoides (RCB1), es Modificada por el Rebote de Sueño*". XLIV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Cd. De Monterrey, Nuevo León. (26-30 Agosto, 2001).
- **Martínez-Vargas M.**, González-Rivera R., Murillo-Rodríguez E., Méndez-Díaz, Próspero-García O. y Navarro L. *"Expresión del Receptor a Canabinoides CB1 (RCB1), Variaciones Diurnas y Efecto de la Privación de Sueño"*. III Congreso Nacional de Sueño 200. Puebla, Puebla, México. (19-22 Septiembre, 2001).
- **M. Martínez-Vargas**, E. Murillo-Rodríguez, R. González-Rivera, A. Landa, J. Velázquez-Moctezuma, O. Próspero-García and L. Navarro. *"Cannabinoid Receptor1 (CB1) Expresión is Modified by Sleep Rebound"*. 15th APSS Annual Meeting. Chicago, Illinois. (Junio 5-10, 2001).
- **M. Martínez-Vargas**, E. Murillo-Rodríguez, R. González-Rivera, A. Landa, J. Velázquez-Moctezuma, O. Próspero-García y L. Navarro. *"Cannabinoid Receptor 1 Increases With the Sleep Rebound"*. Society for Neuroscience 31st Annual Meeting. San Diego, Cal. (Noviembre 10-15, 2001).

- **M. Martínez-Vargas, R. González-Rivera, M. Méndez-Díaz, O. Próspero-García y L. Navarro. "Cannabinoid Receptor 1 (CB1) Expression Increases in Pons After REM Sleep Deprivation Plus Rebound" Society for Neuroscience 32nd Annual Meeting. Orlando, Florida. (Noviembre 2-7, 2002).**

Estancia:

Durante el doctorado realicé una estancia en el laboratorio de Cellular Neurophysiology, National Institute of Health (NIH), National Institute on Drug Abuse (NIDA), Baltimore, Maryland, U.S.A., de Enero a Junio del 2003, en la cual tuve un entrenamiento básico en la preparación de cortes de cerebro, entrenamiento en la técnica de inmunohistoquímica, a nivel de microscopía de luz y de fluorescencia, preparación de muestras para microscopía electrónica. Así como también aprendí a realizar diferentes modalidades de la técnica de hibridación *in situ*, con lo cual mi visión sobre el abordaje de los diversos cambios en el sistema nervioso central se ha ampliado grandemente. Parte de lo realizado durante esta estancia fue realizar inmunohistoquímicas e hibridación *in situ* de cortes sagitales y coronales de cerebros de rata para detectar la presencia del receptor CB1 (Figs. 7, 8, 9, 10, 11 y 12).

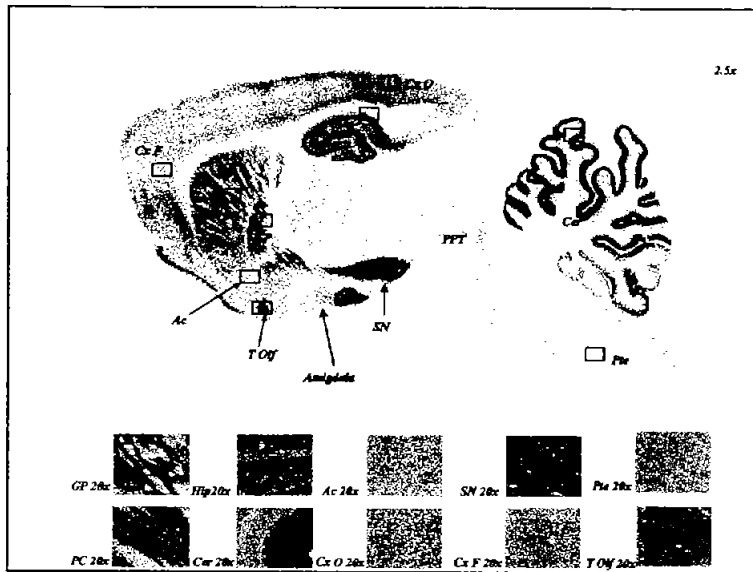


Fig. 7 Corte sagital de cerebro de rata, técnica de inmunohistoquímica para la localización de la proteína del receptor a canabinoides CB1. Cada uno de los recuadros inferiores corresponde a un aumento (20x) de diferentes zonas del cerebro, donde podemos observar la cantidad variable del receptor CB1.

Cx O = Corteza Occipital, Cx F = Corteza Frontal, PC = Putamen Caudado, GP = Globo Pálido, Hp = Hipocampo, Ac = Núcleo acumbens, T olf = Tracto olfatorio, SN = Sustancia Negra, Cer = Cerebelo, Pte = Puente.

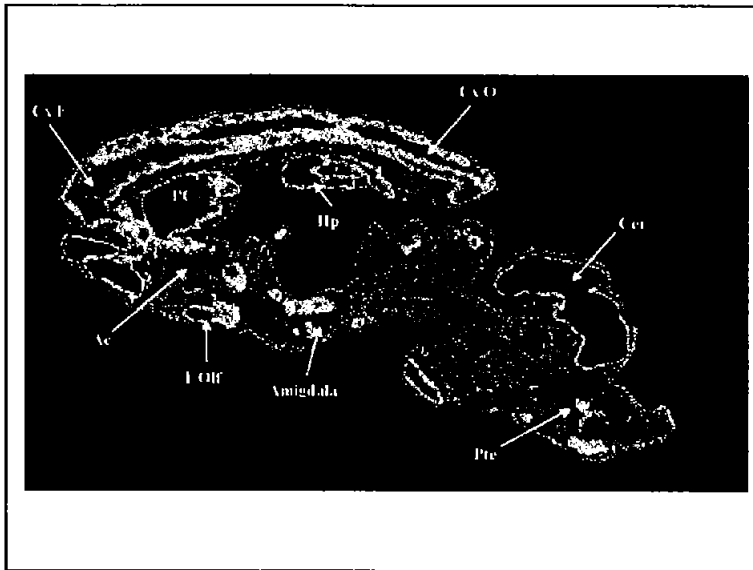


Fig. 8 Corte sagital de cerebro de rata, técnica de hibridación *in situ*, para la localización del RNAm del receptor a cannabinoides CB1. La coloración de azul a rojo indica de menor a mayor cantidad de RNAm respectivamente. Obsérvese la cantidad variable del receptor CB1 en las diferentes zonas del cerebro.

Cx O = Corteza Occipital, **Cx F** = Corteza Frontal, **PC** = Putamen Caudado, **Hip** = Hipocampo, **Ac** = Núcleo acumbens, **T olf** = Tracto olfatorio, **Cer** = Cerebelo, **Pte** = Puente.

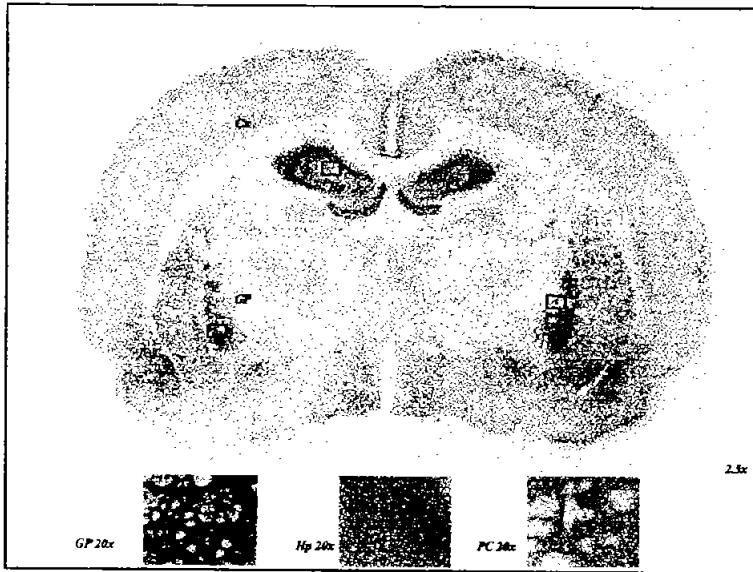


Fig. 9 Corte coronal de cerebro de rata, técnica de inmunohistoquímica para la localización de la proteína del receptor a cannabinoides CB1. Cada uno de los recuadros inferiores corresponde a un aumento (20x) de diferentes zonas del cerebro, donde podemos observar la cantidad variable del receptor CB1. GP = Globo Pálido Hp = Hipocampo, PC = Putamen Caudado,

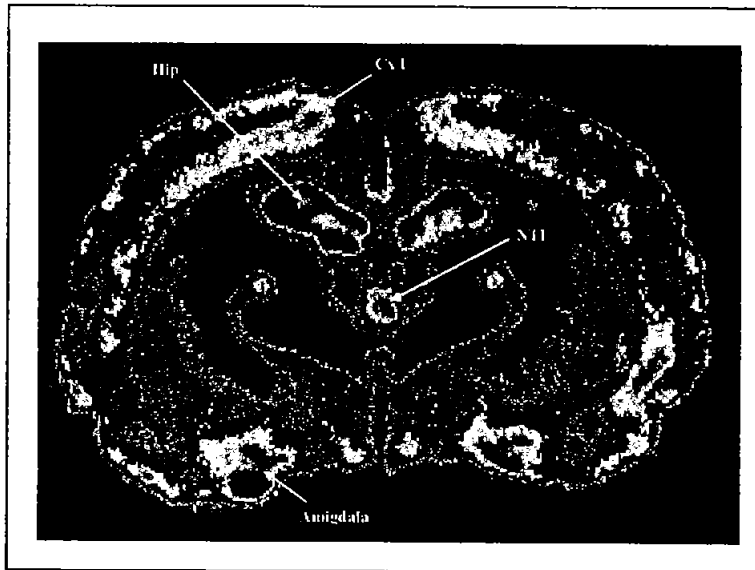


Fig. 10 Corte coronal de cerebro de rata, técnica de hibridación *in situ*, para la localización del RNAm del receptor a cannabinoides CB1. La coloración de azul a rojo indica de menor a mayor cantidad de RNAm respectivamente. Obsérvese la cantidad variable del receptor CB1 en las diferentes zonas del cerebro.

Cx F = Corteza Frontal, Hp = Hipocampo,

NTI = Núcleo Talámico Intermediador dorsal.

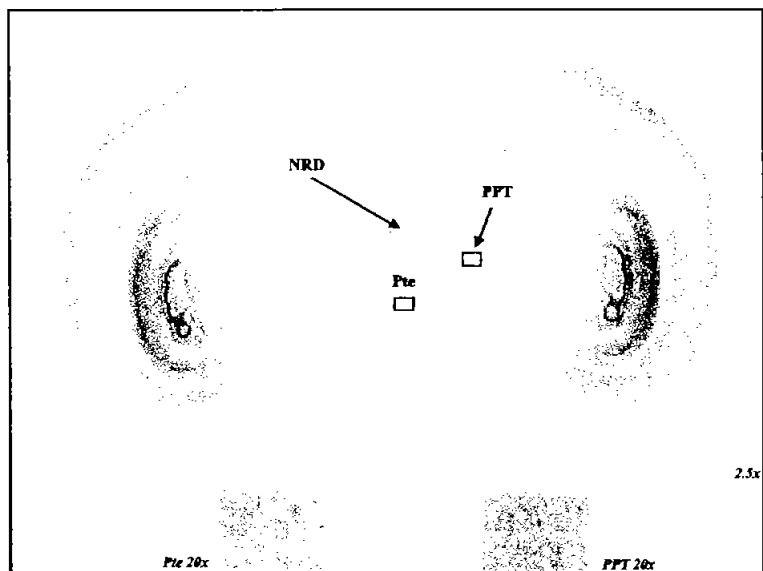


Fig. 11. Corte coronal de cerebro de rata, técnica de inmunohistoquímica para la localización de la proteína del receptor a canabinoides CB1. Cada uno de los recuadros inferiores corresponde a un aumento (20x) de diferentes zonas del cerebro, donde podemos observar la cantidad variable del receptor CB1.

NRD = Núcleo del rafe Dorsal, PPT = Núcleo Tegmental Pedúnculo Pontino

Pte = Puente

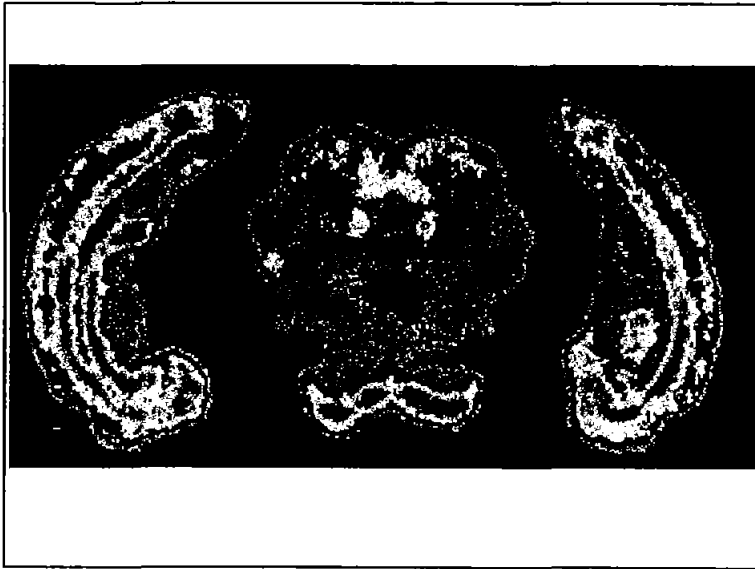


Fig. 12. Corte coronal de cerebro de rata, técnica de hibridación *in situ*, para la localización del RNAm del receptor a cannabinoides CB1. La coloración de azul a rojo indica de menor a mayor cantidad de RNAm respectivamente. Obs+ervese la cantidad variable del receptor CB1 en las diferentes zonas del cerebro.

NRD = Núcleo del rafe Dorsal, PPT = Núcleo Tegmental Pedúnculo Pontino

Pte = Puente

ARTÍCULOS ANEXOS

SLEEP MODULATES CANNABINOID RECEPTOR 1 EXPRESSION IN THE PONS OF RATS

M. MARTÍNEZ-VARGAS,^a E. MURILLO-RODRÍGUEZ,^a R. GONZÁLEZ-RIVERA,^a A. LANDA,^b M. MÉNDEZ-DÍAZ,^a O. PROSPERO-GARCÍA^{a,c} AND L. NAVARRO^a

^aGrupo de Neurociencias, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM, Apdo. Postal 70-260, México City, México 04510

^bDepartamento de Microbiología, Facultad de Medicina, UNAM, México City, México 04510

Abstract—Endocannabinoids seem to play a role in the modulation of sleep. Therefore, we measured cannabinoid receptor 1 (CB1R) protein by Western blot and messenger RNA (mRNA) by reverse transcription-polymerase chain reaction in the pons of rats across the 24-h period. We performed evaluations every 4 h beginning at 00:00 h. Rats were under a controlled light/dark cycle 12:12 (lights on at 06:00 h). Our data suggest that the expression of CB1R gene depends on diurnal variations, with maximum expression at 13:00 h for protein and 21:00 h for mRNA, and minimum expression at 01:00 and 09:00 h, respectively. We also analyzed CB1R protein and mRNA levels in the pons of rats deprived of total sleep for 24 h and in rats with a 24-h period of sleep deprivation plus a 3-h period of sleep rebound. Unlike sleep deprivation, sleep rebound significantly increased CB1R protein while decreasing mRNA. Despite the fact that we used gentle manipulation to deprive the animals of sleep, there may be a potential influence of stress on this effect, too. However, these facts suggest that CB1R gene expression is modulated by the light/dark cycle and by sleep. © 2003 IBRO. Published by Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Key words: pons, sleep deprivation, REM sleep, CB1, circadian rhythms.

Cannabinoids are the psychoactive molecules extracted from the marijuana plant (*Cannabis sativa*). The most active molecule, delta-9-tetrahydrocannabinol (delta-9-THC) binds, to produce its effects, to two types of cannabinoid receptors: CB1R and CB2R (Mechoulam et al., 1998a). CB1R has a preferential distribution in the brain (Gless, 1997; Ameri, 1999). Among marijuana effects are impairment of memory, motor coordination, and self-perception (Mechoulam et al., 1998b). It also increases sleep (Phyk, 1972). Anandamide (ANA), a recently described endogenous lipid that binds to CB1R, mimics the effects of delta-9-THC on several physiological and behavioral variables (Axelrod and Felder, 1998), and increases slow wave sleep and rapid eye movement sleep (REMS) (Murillo-

Rodríguez et al., 1996). These effects are prevented by SR141716A, a CB1R antagonist (Murillo-Rodríguez et al., 2001a), suggesting that ANA effects are mediated by CB1R. Furthermore, oleamide, a lipid that induces several of the cannabinoid effects (Murillo-Rodríguez et al., 2001), and accumulates in the cerebrospinal fluid of sleep-deprived cats (Cravitt et al., 1995) and rats (Basile et al., 1999) induces sleep. This effect is also blocked by SR141716A. Due to the fact that oleamide binds CB1R at micromolar concentrations (Boring et al., 1995), it has been suggested that oleamide exerts an indirect effect on sleep by interacting with the enzyme that degrades ANA, the fatty acid amide hydrolase, thus facilitating ANA activity (Mechoulam et al., 1997).

This study was aimed at investigating whether CB1R expression depends on diurnal variations. To this end, we analyzed whether CB1R gene expression varies along the day in the pons of rats. We have chosen the pons because it has been involved in the generation of sleep, in particular REM sleep, and because there is an expression of CB1 receptor in the brainstem in general (Petit et al., 1996; Biegno et al., 1996) and in the pons in particular (Petit et al., 1996; Gless et al., 1997). Therefore, we evaluated CB1R (protein and messenger RNA (mRNA)) in rats after deprivation of total sleep and after deprivation of total sleep plus 2 h of sleep rebound.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Diurnal variations

Male Wistar rats (250–300 g) were maintained under a controlled dark-light cycle (12:12, lights on at 06:00 h) with food and water *ad libitum*. A total of 78 rats were killed by decapitation at different hours: 06:00, 13:00, 17:00, 21:00, 01:00, and 09:00 h, with 10 rats per point to analyze CB1R protein and three to analyze CB1R mRNA.

Gentle deprivation of sleep. Rats were housed in groups of five, and they were manipulated (gentle touching and holding) over 1 week by the experimenter, who deprived them of sleep the day of the experiment. During the sleep deprivation, the main stressor is the experimenter touching them and holding them when they show the first behavioral sign of drowsiness.

Deprivation of sleep. Twenty-two male Wistar rats (250–300 g) were sleep deprived by gentle manipulation for 24 h with food and water *ad libitum*. Half of them were allowed to have a 2-h period of sleep rebound upon the completion of this period. Rats were individually housed after sleep deprivation to encourage sleep. In addition, an observer frequently detected signs of sleep during these 2 h. All rats (including 11 control rats) were killed by decapitation at 21:00 h. Brains were immediately dissected to isolate the pons. Tissues were prepared for Western blot or reverse transcription-polymerase chain reaction analysis (RT-PCR).

Corresponding author. +52-5623-2809; fax: +52-5623-2241. E-mail address: opeg@servidor.unam.mx (O. Prospero-García).
Abbreviations: ANA, anandamide; CB1R, cannabinoid receptor 1; delta-9-THC, delta-9-tetrahydrocannabinol; mRNA, messenger ribonucleic acid; REMS, rapid eye movement sleep; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction.

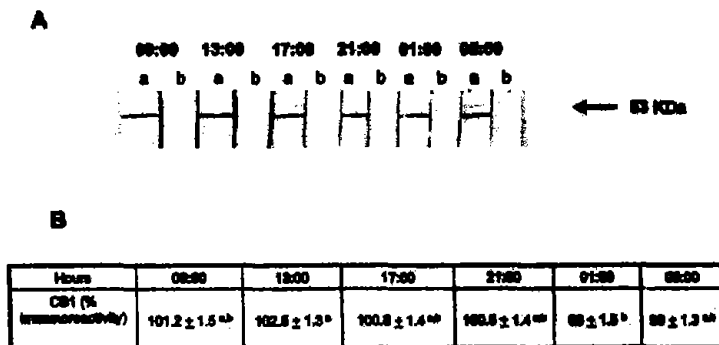


Fig. 1. Effect of light/dark cycle on CB1R expression. (A) Western immunoblotting of CB1 receptor in the rat pons at different hours of the day (lane 1–6). For each lane, letter (a) corresponds to antigen-antibody reaction with anti CB1 and letter (b) with protease rabbit serum. (B) Data represent mean \pm S.E.M. of densitometry obtained for the 83-kDa band. A modest but significant increase is evident at 13:00 h. Means with the same footnote letter are not significantly different. Means with different letters are significantly different; $P < 0.05$.

Western blotting

To assess CB1R protein expression, tissues were homogenized with phosphate-buffered saline (PBS) and protease inhibitors and centrifuged at 600 \times g, 4 °C, for 10 min. Supernatant was centrifuged at 39,000 \times g, 4 °C, for 15 min. Twelve percent analytical SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was performed as described elsewhere (Laemmli, 1970). Briefly, resuspended precipitate of tissue homogenates (15 μ g protein) were mixed 1:1 with sample Laemmli buffer and heated (105 °C, 5 min) prior to loading on a 0.75-mm thick gel. Samples were subjected to electrophoresis (150 V, 2 h) and gels were transferred onto nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) at 100 V for 1 h at 4 °C. The membrane was incubated with 3% PBS-Tween, 10% nonfat dry milk, and 2% goat normal serum for 30 min at room temperature, followed by incubation with anti-CB1R (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) 1:1000 overnight at 4 °C. The blot was washed with PBS-Tween (3 times, 5 min/each), then incubated for 1 h at room temperature in a 1:2000 dilution of goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase conjugate, and developed with diaminobenzidine (0.5 mg/ml in PBS plus 0.3 μ l/ml 30% H₂O₂). Density of bands was analyzed using Quantity One software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

RNA extraction

To detect changes in CB1R mRNA expression, total RNA was extracted using the TRizol method (Life Technologies, Rockville, MD, USA). In brief, 100 mg of tissue was homogenized in 1 ml of TRizol; 200 μ l of chloroform was added and mixed in a vortex. Two phases were obtained by centrifugation at 12,000 \times g for 10 min. The aqueous phase was recovered and 0.5 ml of isopropanol added. Total RNA was obtained by centrifugation at 12,000 \times g for 10 min. Its integrity was confirmed by running an aliquot on a 1% agarose gel.

RT-PCR

RNA (2 μ g) was reverse transcribed using One Step System (Life Technologies) according to manufacturer's recommendations, adding a step of DNase treatment. Briefly, 2 μ g of total RNA was incubated with DNase (RNAse free), 1 U in 10 μ l of the appropriate buffer solution, for 15 min at room temperature, adding 1 μ l of

25 mM ethylenediaminetetraacetic acid, and heating at 65 °C for 10 min to stop the reaction. This mixture was used for RT, adding 25 μ l of buffer 2X (0.4 mM of each dNTP, 2.4 mM MgSO₄), 1 μ l reverse transcriptase/thermostable aquaticus polymerase mixture, MgCl₂, CB1R antisense primer: 5'-ctcgtctctcaggagctg-3' (10 μ M, 1 μ l), and water to adjust to 80 μ l. RT was performed at 42 °C for 30 min and stopped by heating 5 min to 94 °C. PCR conditions were as follows: CB1R sense primer: 5'-catatctctctcaggagctg-3'; CB1R antisense primer: 5'-ctcgtctctcaggagctg-3'; 33 cycles; denaturing: 45 s, 94 °C, annealing: 45 s, 53 °C and elongation 1 min, 72 °C, as described by Porcella et al. (1998). We also amplified cyclophilin cDNA to assess RNA quality. We used primers, 5'-agagccgctgctctcttctg-3' and 5'-ccacccagctggagctggctg-3', as previously described (Acasus et al., 1999). In all assays, RNA samples without RT were run to exclude DNA contamination.

Statistical analyses

Results are reported as mean values \pm S.E.M. Significant differences were obtained through one-way analysis of variance and Tukey's HSD, a post hoc test, considering $P < 0.05$ statistically significant.

RESULTS

Polyclonal Anti CB1R (1:1000) recognized a band of approximately 83 kDa in the supernatant of the pons homogenate. No bands were detected using rabbit normal serum at the same dilution. This band disappeared when the antibody was previously incubated with the peptide used to raise antibodies (Cayman Chemical Co.).

When tissues obtained at different hours of the day were analyzed, diurnal changes in CB1R expression were detected, with maximum values during the light period. Fig. 1b shows the mean value obtained by the densitometry analysis ($n=10$), indicating a difference of about 5% between 13:00 and 01:00 h. In addition, we used RT-PCR to analyze variations in CB1R mRNA at the same hour and found a difference of almost 15% in the expression at 21:00 vs. 9:00 h (Fig. 2).

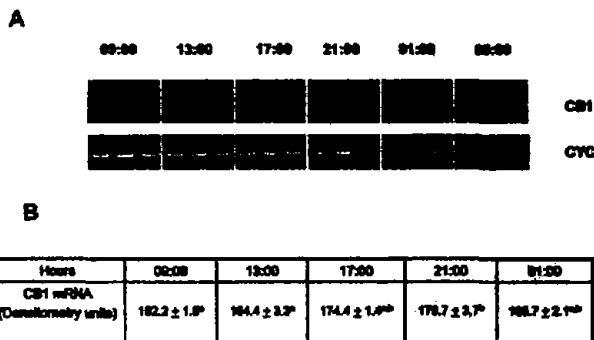


Fig. 2. Effect of light/dark cycle on mRNA of CB1R. Amplification of CB1 receptor mRNA in the rat pons at different hours of the day. (A) Ethidium bromide-stained gel of PCR fragments. Upper panel corresponds to CB1R and lower panel to cyclophilin. (B) Quantification by densitometry of a negative of an ethidium bromide-stained gel. Data are presented as mean of densitometry units ± S.E.M. A modest but significant increase is evident at 21:00 h. Means with the same footnote letter are not significantly different. Means with different letters are significantly different; $P < 0.05$.

Total sleep deprivation did not significantly modify CB1R protein, but it was highly increased by sleep rebound (Fig. 3). In contrast, mRNA levels were decreased after sleep rebound (Fig. 4).

DISCUSSION

Endocannabinoids are a family of lipids whose function has not been completely understood. By describing diurnal

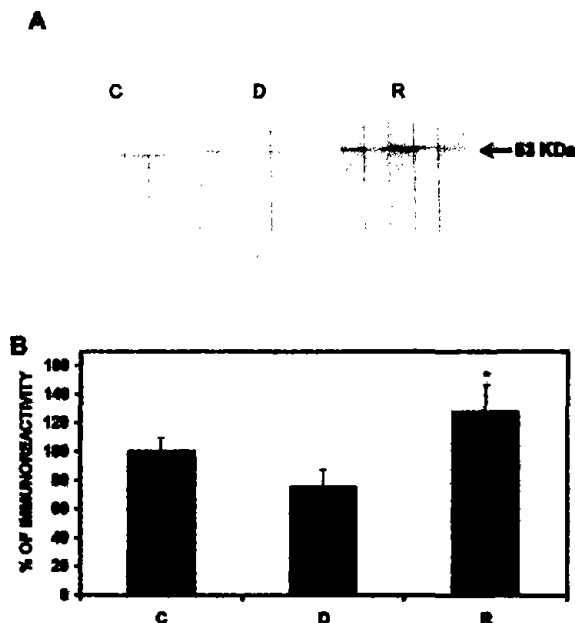


Fig. 3. Effect of sleep deprivation and sleep rebound on CB1R expression. (A) Western immunoblotting of CB1 receptor in the rat pons of control, C; 24 h of deprivation of total sleep, D; and 24 h of deprivation of total sleep plus 2 h of sleep rebound, R. (B) Mean ± S.E.M. of densitometry obtained for the 63-kDa band. Sleep deprivation has no effect on CB1R expression; in contrast, sleep rebound significantly increases its expression; $*P < 0.05$.

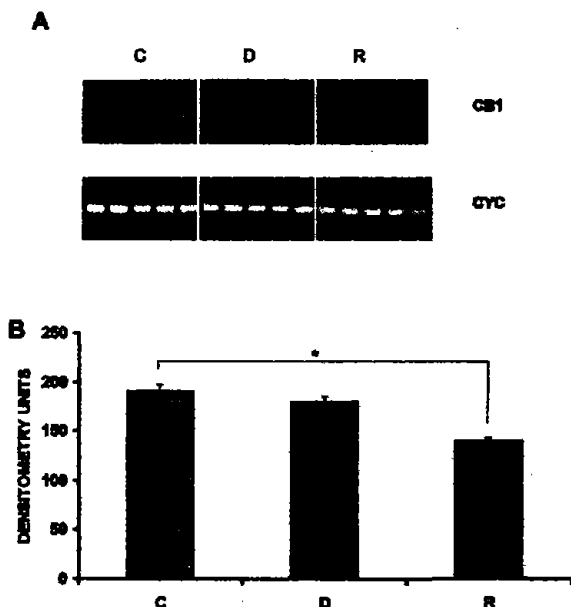


Fig. 4. Effect of sleep deprivation and sleep rebound on CB1R mRNA (A) Ethidium bromide stained gel of PCR fragments of the rat pons of control, C; 24 h of deprivation of total sleep, D; and 24 h of deprivation of total sleep plus 2 h of sleep rebound, R. Upper panel corresponds to CB1R and lower panel to cyclophilin. (B) Quantification by densitometry of a negative of an ethidium bromide-stained gel. Data are presented as mean \pm S.E.M. A significant decrease is evident in the rebound group. * $P < 0.05$.

variations in their receptors, we may shed some light on how the endocannabinoid system functions. To this end, our data indicate that CB1R protein expression undergoes modest but significant diurnal variations in the pons, exhibiting a higher level during the light phase.

This is not a surprising finding, since diurnal variations have been reported for several other receptors. For example, dopaminergic receptors (Naber et al., 1981; Bruinink et al., 1983; Witz-Justlos, 1984; Tomer et al., 1996) and D2 mRNA (Myooh et al., 2001). Most of these receptors undergo much more dramatic changes than those we are reporting for the CB1 receptor. Therefore, we believe that although CB1 receptors are showing this modest variation across the 24 h and this variation is statistically significant, it may be physiologically negligible. Alternatively, we may be observing a very sensitive system that requires no more variation than that to modulate a given behavior. For example, these data agree with other studies in our laboratory indicating that ANA decreases REMS at 13:00 h, when CB1 receptors are higher, and increases this sleep stage at 01:00 h, when the receptors are lower (Quiroz-Torres et al., 2002).

Likewise, CB1 mRNA also undergoes a modest but significant diurnal variation, reaching its maximal level during the dark phase. This pattern suggests a shift of approximately 16 h between mRNA and protein expression. This finding has been previously reported for vasopressin

(mRNA and peptide), indicating that peptide levels are high in the morning (Tominega et al., 1992), whereas mRNA levels are high in the afternoon (Burbach et al., 1986). A similar kind of shift between mRNA and protein levels during the sleep-waking cycle has been reported for choline acetyltransferase (Greco et al., 1999). Choline acetyltransferase mRNA levels, in the basal forebrain, are low during wakefulness and high during REMS. In contrast, enzyme activity is higher during wakefulness than during sleep. In addition, ANA itself shows a diurnal variation in the pons, with a maximum level during the dark phase (Murillo-Rodríguez et al., 2001b), correlating with the slight drop of CB1R expression. These coincidental findings may be a result of changes induced by sleep mechanisms, since we cannot claim that ANA increase induces a down-regulation of CB1 receptors because ANA increase does not precede CB1 decrease.

With all, both the time spent in REMS and CB1R expression are in phase. This means that maximum CB1R expression corresponds with maximum time spent in REMS.

We have also shown that sleep deprivation has no effect on CB1R protein or on its mRNA levels. Nevertheless, the rebound significantly increased CB1R protein while decreasing its mRNA.

We cannot dismiss the idea that this increase was due to a decrease in its degradation and not to an increase of its

synthesis. Several reports have shown that this receptor and its mRNA do not exhibit a parallel behavior. For example, it has been shown that long-term exposure to delta-9-THC produces a decrease in CB1R binding in several cerebral structures, whereas no change, or even an increase, may occur in the mRNA (Romero et al., 1998; Zhuang et al., 1998).

It is worthwhile to mention the strong effect of sleep on CB1 gene expression as compared with the effect induced by the light/dark cycle. In fact, sleep-deprived rats were allowed to sleep rebound during the active period, when control rats showed low CB1 protein expression and high CB1 mRNA expression. All these changes were reversed by sleep rebound. Moreover, changes induced by sleep rebound were at least five times larger than those spontaneous changes depending on diurnal variations, thereby suggesting that the CB1R expression is triggered by sleep and that endocannabinoids regulate cerebral functions that take place while the subject is sleeping.

Finally, although our method of sleep deprivation implies very little inductions of stress, we believe this still may be a major component of the sleep deprivation. There is an extensive literature exploring the potential role of stress in several sleep-deprivation procedures (Ledoux et al., 1999), concluding that stress always accompanies sleep deprivation. Hence, we cannot assure that sleep deprivation is the only cause of increasing CB1 receptor expression during the rebound period; stress may be a cause as well. Further experiments will clarify the role of stress on these changes.

Acknowledgements—Research supported by CONACYT 25128N and PAPPIT IN218201.

REFERENCES

- Aceves C, Pineda O, Ramirez CI, Navarro L, Valverde RC (1999) Mesencephalic Type I Deiodinase (M-O1) is dependent on the stalling stimulus. Differential role of norepinephrine and prolactin. *Endocrinol* 140:2948–2963.
- Ameri A (1990) The effects of cannabinoids on the brain. *Prog Neurobiol* 55:315–346.
- Axrod J, Felder CC (1988) Cannabinoid receptors and their endogenous agonist, anandamide. *Neurochem Res* 23:576–581.
- Beaulieu AS, Hanus L, Mandelblat WB (1999) Characterization of the hypnotic properties of oleamide. *Neuroreport* 10:947–951.
- Bleogno T, Berardino F, Ambrosino G, Cebeira M, Ramos JA, Fernández-Rutz JJ, DiMarzio V (1998) Brain Regional Distribution of Endocannabinoids: Implications for their biosynthesis and biological function. *Biochem Biophys Res Commun* 256:377–380.
- Boring DL, Berkung DA, Howlett AC (1986) Carabodolins, arachidonyl-ethanolamide, and hybrid structures: potential for interaction with brain cannabinoid receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 65:207–210.
- Brundink A, Lohfmanstiger W, Schlumpf M (1983) Ontogeny of diurnal rhythms of central dopamine, serotonin and epinephrine binding sites and of motor activity in the rat. *Life Sciences* 33:31–38.
- Burbach JP, Liu B, Voorhuis TA, Van Tol HH (1986) Diurnal variation in vasopressin and oxytocin messenger RNAs in hypothalamic nuclei of the rat. *Brain Res* 464:187–190.
- Crevett BF, Prospero-García O, Szuzdek G, Glüx NB, Henricson SJ, Boger DL, Lerner RA (1995) Chemical characterization of a family of brain lipids that induce sleep. *Science* 268:1906–1908.
- Glass M, Dreganauer M, Paul RL (1987) Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience* 77:399–516.
- Grace MA, MacCarley RW, Shirovani PJ (1998) Choline acetyltransferase expression during periods of behavioral activity and across natural sleep-wake states in the basal forebrain. *Neuroscience* 88:1369–1374.
- Leemans UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Ledoux L, Basire JP, Buda C, Luppi PH, Jouvet M (1999) Alterations in *c-fos* expression after different experimental procedures of sleep deprivation in the rat. *Brain Res* 736:108–118.
- Mechoulam R, Prida E, Hanus L, Shvoiltz T, Bleogno T, Di Marzo V, Bayewitch M, Vogel Z (1997) Anandamide may mediate sleep induction. *Nature* 388:25–28.
- Mechoulam R, Prida E, Di Marzo V (1998a) Endocannabinoids. *Eur J Pharmacol* 355:1–16.
- Mechoulam R, Hanus L, Prida E (1998b) Towards cannabinoid drug-revisited. *Prog Med Chem* 36:193–243.
- Murillo-Rodríguez E, Sánchez-Alavez M, Navarro L, Martínez-González O, Dauter-Cahn R, Prospero-García O (1998) Anandamide modulates sleep and memory in rats. *Brain Res* 812:279–274.
- Murillo-Rodríguez E, Caloca R, Méndez-Díaz M, Navarro L, Prospero-García O (2001a) Anandamide-induced sleep is blocked by SR141716A, a CB1 receptor antagonist and by U73122, a phospholipase C inhibitor. *NeuroReport* 12:2151–2156.
- Murillo-Rodríguez E, Glüx NB, Delmas F, Prospero-García O, Pilonell D (2001b) Diurnal variations of endogenous cannabinoid in CSF and brain of the rat. 33rd Annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, California. Abstr 605.2.
- Naber D, Witt-Justus A, Kellen MS, Tobler I, Borbély AA (1991) Seasonal variations in the endogenous rhythm of dopamine receptor binding in rat striatum. *Behav Neurosci* 104:321–335.
- Poll DAD, Harrison MP, Olson JM, Spencer RF, Cabral GA (1999) Immunohistochemical localization of the natural cannabinoid receptor in rat brain. *J Neurosci Res* 51:391–402.
- PMK RT, Zarewicz V, Dement WC, Hollister LE (1972) Delta-9-tetrahydrocannabinol and synthetic effects on human sleep patterns. *Clin Pharmacol Ther* 13:428–436.
- Porcile A, Casellas P, Gomez GL, Pani L (1998) Cannabinoid receptor CB1 mRNA is highly expressed in the rat olfactory bulb: implications for the enticulous properties of mivazams. *Brain Res Mol Brain Res* 68:340–346.
- Quirós Torres AM, Montes-Rodríguez C, Galicis O, Martínez-Vargas M, Hara-Valerón R, Navarro L, Prospero-García O (2002) Effects of anandamide and oleamide on the sleep-waking cycle depend on diurnal variations. 16th APBS Annual Meeting, Seattle, Washington. *Sleep Suppl* 25:A476.
- Ramos J, Berardino F, Manzanera J, Pérez A, Cochero J, Fuentes JA, Fernández-Rutz JJ, Ramos JA (1998) Time-course of the cannabinoid receptor down-regulation in the adult rat brain caused by repeated exposure to delta-9-tetrahydrocannabinol. *Synapse* 30:289–303.
- Tombago K, Shrivastava K, Olay Y, Fukuura C, Inoué ST (1992) Circadian rhythms of vasopressin content in the supraoptic nucleus of the rat. *Neuroreport* 3:608–612.
- Torner C, Sánchez-Hueteo B, Aguilar-Roblero R (1998) Diurnal variations of striatal D2 dopamine receptors and its relation with haloperidol-induced cataplexy. *Behav Neurosci* 28:599–616.
- Zhuang SY, Miller J, Galanterova EV, Rhyby MT, Sun L, Hagan RE, Chidlow BR, Desbryer SA (1999) Effects of long-term exposure to delta-9-THC on expression of cannabinoid receptor (CB1) mRNA in different brain regions. *Mol Brain Res* 62:141–148.

POTENTIAL ROLE OF THE CANNABINOID RECEPTOR CB1 IN RAPID EYE MOVEMENT SLEEP REBOUND

L. NAVARRO,^a M. MARTÍNEZ-VARGAS,^a
E. MURILLO-RODRÍGUEZ,^a A. LANDA,^b
M. MÉNDEZ-DÍAZ^a AND O. PROSPÉRO-GARCÍA^{a*}

^aGrupo de Neurociencias, Departamento de Fisiología, Apdo. Postal 70–250, Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F. 04510, México

^bDepartamento de Microbiología, Fac. de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F. 04510, México

Abstract—Sleep is an unavoidable activity of the brain. The delay of the time to sleep (sleep deprivation), induces an increase of slow-wave sleep and rapid-eye-movement (REM) sleep (rebound) once the subject is allowed to sleep. This drive to sleep has been hypothesized to be dependent on the accumulation of sleep-inducing molecules and on the high expression of these molecule receptors. In this study we selectively deprived rats of REM sleep for 24 h by using the flowerpot technique. One group deprived of REM sleep was treated with SR141716A, a cannabinoid receptor 1 (CB1) receptor antagonist and then allowed to sleep for the next 4 h. Two other groups were killed, one immediately after the REM sleep deprivation period and the other after 2 h of REM sleep rebound (REM sleep deprivation plus 2 h of rebound). In both groups we determined the expression of the CB1 receptor and its mRNA. Results indicated that SR141716A prevents REM sleep rebound and REM sleep deprivation does not modify the expression of the CB1 protein or mRNA. However, REM sleep deprivation plus 2 h of sleep rebound increased the CB1 receptor protein and, slightly but significantly, decreased mRNA expression. These results suggest that endocannabinoids may be participating in the expression of REM sleep rebound. © 2003 IBRO. Published by Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Key words: cannabinoid receptor, CB1, sleep deprivation, lipids, arachidonic acid derivatives.

Sleep is modulated by a series of neurotransmitters and neuropeptides (García-García and Drucker-Colín, 1999). Some arachidonic derivatives are also involved in its regulation (Hayashi and Matsumura, 1995). For example, prostaglandin D2 induces slow-wave sleep (SWS); while prostaglandin E2 induces wakefulness (W) (Hayashi and Matsumura, 1995). Recently, we have reported that anandamide (Murillo-Rodríguez et al., 1998) and oleamide (Cravatt et al., 1996), two putative

endocannabinoids also participate in the control of sleep. For example, oleamide increases drowsiness (Prospéro-García et al., 2001) and anandamide increases SWS and rapid-eye-movement sleep (REMS; Murillo-Rodríguez et al., 1998). A commonly used technique to study the function of sleep is sleep deprivation (Rechtschaffen et al., 1989). Among several changes induced by sleep deprivation, including the modifications observed in neurotransmitters and their receptors in the brain of animals of experimentation (Rechtschaffen et al., 1989; Rechtschaffen and Bergman, 2002), is the increase in the total amount of sleep once the subject is allowed to sleep *ad libitum*. This phenomenon is known as sleep rebound and suggests that the brain has to fulfill a specific quota of sleep to be able to cope with the demands of W.

One of the changes that several groups have reported to result from sleep deprivation is the accumulation of molecules in the brain parenchyma or in the cerebrospinal fluid (CSF; Hayashi and Matsumura, 1995; García-García and Drucker-Colín, 1999). For example, oleamide, a lipid with cannabinoid activity (Murillo-Rodríguez et al., 2001b), accumulates in the CSF of sleep-deprived rats (Lerner et al., 1994). Adenosine, a nucleoside with SWS-inducing properties accumulates in the basal forebrain of rats in a fashion depending on the time of sleep deprivation, and it returns slowly to basal levels depending on the time of sleep rebound (Portaka-Helsinki et al., 2000).

Several changes are observed in the subject that is sleep deprived, for example, hypothermia, hypolocomotion and a reduction in pain perception (Rechtschaffen et al., 1989; Hakkı et al., 2001). Typically cannabinoids induce this triad of symptoms (Mechoulam et al., 1998). In addition, sleep deprivation induces memory impairment, sleepiness, hypersexuality (Geese et al., 1995). These changes (with exception of sexual behavior that has not been studied under the effect of endocannabinoids) are also induced by cannabinoids (Ameri, 1999) and endocannabinoids (Murillo-Rodríguez et al., 1998, 2001a). Therefore, we believe sleep deprivation induces a modification in the endocannabinoid system. In fact, our previous work has suggested that the rebound of sleep after 24 h of total sleep deprivation increases cannabinoid receptor 1 (CB1R) protein while decreasing its mRNA (Martínez-Vargas et al., 2003). In order to determine the potential changes in the endocannabinoid system induced by selective sleep deprivation we deprived rats of REMS for 24 h (REMSd) and studied the sleep rebound and the changes induced by a CB1R antagonist, SR141716A. In addition, the changes in the

*Corresponding author. Tel: +52-5556623-2500; fax: +52-556623-2241.

E-mail address: opp@servidor.unam.mx (O. Prospéro-García).
Abbreviations: CB1R, cannabinoid receptor 1; CSF, cerebrospinal fluid; REMS, rapid-eye-movement sleep; REMSd, REMS deprivation for 24 h; REMSd-SR, REMSd plus SR141716A; rt, room temperature; RT-PCR, reverse transcription and polymerase chain reaction; SR-NP, SR14 1716A; SWS, slow-wave sleep; W, wakefulness.

0304-4522/03/1203-855+05\$05.00 © 2003 IBRO. Published by Elsevier Science Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/S0304-4522(03)00338-7

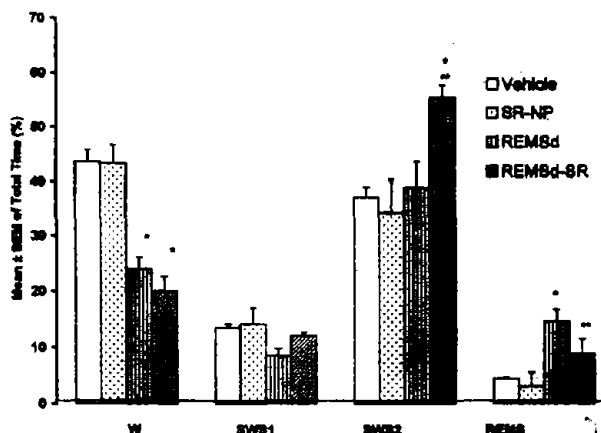


Fig. 1. Effect of SR141716A on REMS rebound. Data represent mean \pm S.E.M. of percentage of time spent in each vigilance state. All rats were recorded for 4 h. SR141716A has no effect in the non-deprived group; however, it was able to partially prevent REMS rebound. * $P < 0.05$ versus vehicle and SR141716A (SR-NP). ** $P < 0.05$ versus REMSd.

increased protein expression, while reducing mRNA expression (Fig. 2)

DISCUSSION

Our results confirm previous observations that REMS deprivation for a period of 24 h increases REMS total time during the recovery period. Other groups as well as ours detected no effect on spontaneous sleep by the blockage of CB1R by SR141716A at the dose used in this study (Mendelson and Basile, 1999; Murillo-Rodríguez et al., 2001a). However, we are showing for the very first time that the SR141716A prevents REMS rebound.

In previous studies we have observed that anandamide, one of the endogenous ligands of the CB1R, increases SWS2 and REMS occurrence, when injected into either i.c.v. or directly to the pedunculo-pontine tegmental nucleus (Murillo-Rodríguez et al., 2001a). This nucleus has been related to REMS generation (Shromani et al., 1998). In both cases, SR141716A blocks this increase. However, in the present investigation we have seen that after REMS deprivation plus SR141716A, SWS2 increases. At present, we have no plausible explanation for this effect; however, it is possible that other mechanism triggered by the

SR141716A or by other endogenous molecules may be responsible for it.

In our previous work (Martínez-Vargas et al., 2003), we have shown that sleep rebound after total sleep deprivation increases CB1R protein while decreasing its mRNA. However, our present data indicate that these changes are a result of REMS rebound rather than SWS rebound.

On the other hand, regarding the decrease of mRNA occurring simultaneously with the increase of the protein, the literature suggests that this receptor and its mRNA do not exhibit a parallel behavior. For example, it has been shown that long-term exposure to Δ -9-tetrahydrocannabinol produces a decrease in CB1R binding in several cerebral structures while no change, or even an increase, may occur in the mRNA (Romero et al., 1996; Zhuang et al., 1996).

We believe sleep deprivation always induces stress (Lédoux et al., 1996). In animals, it is very likely that there is no procedure to overcome the stress concomitant to sleep deprivation. Therefore, REMS rebound may be a result of alleviation of the stressing state or of the debt of sleep itself. In any case, endocannabinoids may be playing a role as sleep inducers, by directly affecting

Table 1. Effects of i.c.v. administration of SR141716A on sleep parameters

| Groups | SWS2 latency | REMS latency | Waking duration | SWS1 duration | SWS2 duration | REMS duration | Waking frequency | SWS1 frequency | SWS2 frequency | REMS frequency |
|----------|-----------------|------------------|-----------------|---------------|---------------|---------------|------------------|----------------|----------------|-----------------|
| Vehicle | 47.3 \pm 15.2 | 74.0 \pm 21.6 | 4.2 \pm 1.0 | 1.0 \pm 0.1 | 3.2 \pm 0.5 | 1.7 \pm 0.8 | 27.8 \pm 2.8 | 28.8 \pm 4.2 | 28.2 \pm 4.7 | 6.2 \pm 1.1 |
| SR-NP | 28.0 \pm 7.6 | 146.6 \pm 40.3 | 4.2 \pm 1.0 | 1.1 \pm 0.1 | 2.8 \pm 0.4 | 1.0 \pm 0.5 | 27.0 \pm 3.1 | 30.8 \pm 5.9 | 33.6 \pm 6.5 | 5.6 \pm 1.6 |
| REMSd | 19.1 \pm 3.8 | 28.2 \pm 4.3 | 2.2 \pm 0.3 | 1.2 \pm 0.1 | 2.8 \pm 0.4 | 2.0 \pm 0.4 | 21.8 \pm 1.3 | 24.8 \pm 2.8 | 34.8 \pm 1.5 | 18.4 \pm 1.9 |
| REMSd-SR | 19.3 \pm 4.1 | 70.6 \pm 15.4 | 2.7 \pm 0.5 | 0.8 \pm 0.1 | 3.7 \pm 0.5 | 1.8 \pm 0.3 | 22.2 \pm 1.6 | 25.0 \pm 2.2 | 36.6 \pm 1.7 | 10.8 \pm 3.0* |

* Statistically different from vehicle and SR-NP.

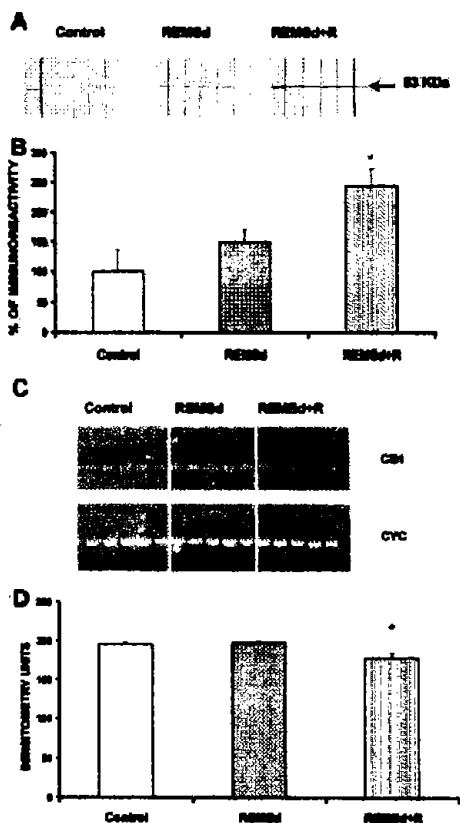


Fig. 2. Effect of REMS deprivation and rebound on CB1R expression. (A) Western immunoblotting of CB1R receptor in the rat pons of control; 24 h of REMS deprivation; and 24 h of REMS deprivation plus 2 h of rebound. (B) Mean \pm S.E.M. of densitometry obtained for the 53 kDa band. (C) Ethidium bromide-stained gel of RT-PCR fragments of CB1R mRNA in the rat pons of control; 24 h of REMS deprivation; and 24 h of REMS deprivation plus 2 h of sleep rebound. Upper panel corresponds to CB1R and lower panel to cyclophilin. (D) Data represent mean \pm S.E.M. of densitometric quantification of CB1R-PCR fragment. Sleep deprivation has no effect on CB1R expression; in contrast, sleep rebound significantly increases CB1R protein, while decreasing its mRNA. * $P < 0.05$.

sleep mechanisms or, alternatively, as sleep enhancers, by acting as anxiolytic substances, whereby the changes in the brain caused by the stressor are reduced.

Our results indicate that the endocannabinoid system is involved in the regulation of REMS rebound, further supporting the notion that endocannabinoids such as anandamide may be modulating REMS generation.

Acknowledgements—This work was supported by grant IN219201 from DGAPA-UNAM to L.N. The authors are indebted to the National Institute on Drug Abuse (NIDA) for generously providing SR141718A.

REFERENCES

- Aceves C, Pineda O, Ramirez-Ci, Navarro L, Valverde-RC (1999) Mammary Type I Deiodinase (M-D1) is dependent on the suckling stimulus: differential role of norepinephrine and prolactin. *Endocrinology* 140:2648–2653.
- Amesl A (1999) The effects of cannabinoids on the brain. *Prog Neurobiol* 58:315–345.
- Cohen HB, Dement WC (1965) Sleep: changes in threshold to electroconvulsive shock in rats after deprivation of "paradoxical" phase. *Science* 150:1316–1319.
- Cravell BF, Prospéro-García O, Skuzdzak G, Gillis NB, Henriksen SJ, Boger DL, Lerner RA (1996) Chemical characterization of a family of brain lipids that induce sleep. *Science* 268:1806–1809.
- García-García F, Drucker-Colín R (1997) Endogenous and exogenous factors on sleep-wake cycle regulation. *Prog Neurobiol* 58:287–314.
- Gessa GL, Paris L, Fadda P, Fratta W (1995) Sleep deprivation in the rat: an animal model of mania. *Eur Neuropsychopharmacol* 1995(5 Suppl):89–95.
- Hayashi O, Matsumura H (1995) Prostaglandins and sleep. *Adv Neurobiol* 5:211–216.
- Heidi OS, Allouf A, Jourdain D, Eschaller A, Dubray C (2001) Effects of rapid eye movement (REM) sleep deprivation on pain. *Brain Res* 909:281–287.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Lédoux L, Sastre JP, Buda C, Luppi PH, Jouvet M (1998) Alterations in *o-fos* expression after different experimental procedures of sleep deprivation in the cat. *Brain Res* 736:108–118.
- Lerner RA, Skuzdzak G, Prospéro-García O, Henriksen SJ, Boger DL, Cravell BF (1994) Corebrodins: a brain lipid isolated from sleep-deprived cats. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:9505–9508.
- Martínez-Vargas M, González-Rivers R, Murillo-Rodríguez E, Lande A, Méndez-Díaz M, Prospéro-García O, Navarro L (2003) Sleep modulates cannabinoid receptor 1 expression in the pons of rats. *Neuroscience* 117:197–201.
- Mechoulam R, Hanus L, Fride E (1998) Towards cannabinoid drugs revisited. *Prog Med Chem* 36:129–243.
- Mendelson WB, Basile AS (1999) The hypnotic actions of oleamide are blocked by a cannabinoid receptor antagonist. *Neuroreport* 10:3237–3239.
- Murillo-Rodríguez E, Sánchez-Alavez M, Navarro L, Martínez-González D, Drucker-Colín R, Prospéro-García O (1998) Anandamide modulates sleep and memory in rats. *Brain Res* 812:270–274.
- Murillo-Rodríguez E, Cabezas R, Méndez-Díaz M, Navarro L, Prospéro-García O (2001a) Anandamide-induced sleep is blocked by SR141718A, a CB1 receptor antagonist and by ω 3122, a phospholipase C inhibitor. *Neuroreport* 12:2131–2138.
- Murillo-Rodríguez E, Giordano M, Cabezas R, Henriksen SJ, Navarro L, Prospéro-García O (2001b) Oleamide modulates memory in rats. *Neurosci Lett* 313:81–84.
- Porcello A, Casellas P, Gessa GL, Paris L (1998) Cannabinoid receptor CB1 mRNA is highly expressed in the rat olfactory bulb: implications for the antipsychotic properties of marijuana. *Brain Res Mol Brain Res* 58:240–245.
- Portica-Helakainen T, Strecker RE, McCarley RW (2000) Brain site-specificity of extracellular adenosine concentration changes during sleep deprivation and spontaneous sleep: an *in vivo* microdialysis study. *Neuroscience* 90:507–517.
- Prospéro-García O, Murillo-Rodríguez E, Martínez-González D, Min-

- dez-Díaz M, Valdez-Moctezuma J, Navarro L (2001) Vegetal marijuana, animal marijuana. *Salud Mental* 24:58–64.
- Rechtschaffen A, Bergmann BM, Everson CA, Kushida CA, Gilliland MA (1969) Sleep deprivation in the rat: X. *Sleep* 12:66–67.
- Rechtschaffen A, Bergmann BM, Gilliland MA, Bauer K (1969) Effects of method, duration, and sleep stage on rebounds from sleep deprivation in the rat. *Sleep* 22:11–31.
- Rechtschaffen A, Bergmann BM (2002) Sleep deprivation in the rat: an update of the 1969 paper. *Sleep* 25:18–24.
- Romero J, Berrando F, Manzanara J, Pérez A, Cochero J, Fuentes JA, Fernández-Ruiz JJ, Ramos JA (1998) Time-course of the cannabinoid receptor down-regulation in the adult rat brain caused by repeated exposure to delta-9 tetrahydrocannabinol. *Synapse* 30: 296–308.
- Shirramani PJ, Armstrong DM, Gillin JC (1988) Cholinergic neurons from the dorsolateral pons project to the medial pons: a WGA-HRP and choline acetyltransferase immunohistochemical study. *Neurosci Lett* 68:19–23.
- Zhuang SY, Kistler J, Grigorenko EV, Kirby MT, Sim LJ, Hapeon RE, Childers SR, Deschayter SA (1998) Effects of long-term exposure to delta-9-THC on expression of cannabinoid receptor (CB1) mRNA in different brain regions. *Mol Brain Res* 62:141–149.

(Accepted 13 April 2003)