

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

VARIACIONES DIURNAS EN LA EXPRESION DEL  
RECEPTOR A CANABINOIDES CB1, EN  
HIPOCAMPO Y PUENTE DE RATA.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

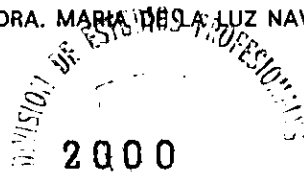
**B I O L O G A**

P R E S E N T A :

**MARINA MARTINEZ VARGAS**



DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARIA DELA LUZ NAVARRO ANGULO



2000

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION PROFESIONALES



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVILA DE  
MEXICO

**MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO**  
**Jefa de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

**VARIACIONES DIURNAS EN LA EXPRESION DEL RECEPTOR A CANABINOIDES  
 CBI, EN HIPOCAMPO Y PUENTE DE RATA**

realizado por **MARINA MARTINEZ VARGAS**

con número de cuenta **8526476-4** , pasante de la carrera de **BIOLOGIA**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
 Propietario

Dra. María de la Luz Navarro Angulo

*[Firma]*

Propietario

Dra. María Luisa Fanjul Peña

*[Firma]*

Propietario

Dra. María Teresa Benitez Rodríguez

*[Firma]*

Suplente

Mtra. en Ciencias Elsa Guadalupe Escamilla Chimal

*[Firma]*

Suplente

Vet. José Luis Arreola Ramírez

*[Firma]*

FACULTAD DE CIENCIAS  
 U.N.A.M.

Consejo Departamental de BIOLOGIA

*[Firma]*

Dra. Edna María Suarez Díaz



DEPARTAMENTO  
 DE BIOLOGIA

**PRESENTACIÓN**

**“ VARIACIONES DIURNAS EN LA EXPRESIÓN DEL  
RECEPTOR A CANABINOIDES CB1, EN HIPOCAMPO Y  
PUENTE DE RATA “**

Tesis realizada en el Grupo de Neurociencias del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la UNAM; por la pasante de Biología Marina Martínez Vargas, bajo la dirección de la Dra. María de la Luz Navarro Angulo.

El desarrollo de esta tesis fue apoyado por CONACYT 25128N y PAPIIT IIN233199.

## AGRADECIMIENTOS

Dedico el siguiente trabajo:

A mi esposo Rubén González Rivera e hijos Xchel y Mexitli Atzin, agradeciendo su comprensión, estímulo y apoyo para dar un paso importante en la trayectoria de mi vida.

A mi madre, aunque no está presente, le agradezco grandemente todo su cariño y apoyo que me brindó, el tiempo que estuvo conmigo y estoy segura que le hubiera gustado compartir estos momentos.

A mis hermanos, de una manera muy especial Rodolfo y Ricardo, que junto con sus familias, me brindaron todo su apoyo, el cual fue de suma importancia para poder concluir este logro.

A mi hermana Graciela, que gracias a su apoyo incondicional durante toda mi vida, pudo ser posible llegar hasta esta meta.

A la Dra. Luz Navarro, por su amistad, así como su asesoría y dirección para realizar esta tesis.

Al Dr. Oscar Prospero García, por su amistad, enseñanza, apoyo y comentarios en mi desarrollo profesional.

A cada uno de los integrantes del grupo de Neurociencias de la Facultad de Medicina U.N.A.M.: Dra. Luz Navarro, Dr. Oscar Prospero, Mónica Méndez, Dolores Martínez, Yunuen García, Marina Cisneros, Margarita Gómez, Oscar Galicia, Eric Murillo y Francisco Sánchez por su amistad e importantes comentarios acerca de este trabajo.

**INDICE GENERAL**

<b>PRESENTACIÓN</b>	<b>i</b>	
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>ii</b>	
<b>INDICE GENERAL</b>	<b>iii</b>	
<b>LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS</b>	<b>iv</b>	
<b>RESUMEN</b>	<b>v</b>	
<b>I</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
	1. RITMOS CIRCÁDICOS	1
	2. SUEÑO	4
	3. CICLO SUEÑO VIGILIA	5
	4. FUNCIONES DEL SUEÑO	9
	5. FACTORES INDUCTORES DE SUEÑO	10
	6. CANABINOIDES Y MARIHUANA	12
	7. RECEPTORES A CANABINOIDES	14
	8. ENDOCANABINOIDES	16
<b>II.</b>	<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>17</b>
<b>III.</b>	<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>18</b>

<b>IV.</b>	<b>METODOLOGÍA</b>	<b>19</b>
	1. Variaciones diurnas	19
	2. Privación de sueño total	19
	3. Obtención de tejidos y preparación de muestras	20
	4. Cuantificación de proteínas	20
	5. Electroforesis de gel de poliacrilamida con SDS	20
	6. Inmunoelectrotransferencia	21
	7. Densitometría	21
	8. Prueba estadística	21
<b>V.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>22</b>
	1. Estandarización de la técnica	22
	2. Expresión diurna de los receptores CB1 en puente e hipocampo de rata.	22
	3. Expresión de la concentración del receptor CB1 en puente e hipocampo de rata con privación de sueño total y ratas con rebote	27
<b>VI.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>30</b>
<b>VII.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>32</b>
<b>VIII.</b>	<b>ANEXO</b>	<b>33</b>
	1. Homogenización de muestras	33
	2. Lowry	33
	3. Gel SDS-PAGE	33
	4. Inmunoelectrotransferencia	34
<b>IX.</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>35</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS

AA	Ácido Araquidónico
AC	Adenilato Ciclasa
ANA	Anandamida
CPS	Ciclos por segundo
DAB	Diaminobencidina
DTT	Dithiothreitol
EEG	Electroencefalograma
EMG	Electromiograma
EOG	Electrooculograma
FAAH	Enzima Hidrolasa de los Ácidos Grasos
ICV	Intracerebroventricular
NC	Nitrocelulosa
NMOR	Sueño no MOR
OC	Quiasma óptico
OLE	Oleamida
PLA2	Fosfolipasa A2
RNA <sub>m</sub>	Acido Ribonucleico mensajero
SCN	Núcleo supraquiasmático
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida con SDS
SMOR	Sueño de Movimientos Oculares Rápidos
SNC	Sistema Nervioso Central
SOL	Sueño de Ondas Lentas
TAE	Tris Acetato
VIG	Vigilia
$\Delta$ 9-THC	$\Delta$ 9-tetrahidrocanabinol



## RESUMEN

Los sistemas fisiológicos endógenos que posibilitan a los organismos a vivir en armonía con los ritmos de la naturaleza, tales como los ciclos día-noche y las estaciones del año, son conocidos como relojes biológicos. La mayor parte de lo que se conoce acerca de dichos relojes proviene del estudio de los ritmos circádicos que se encargan de modular las funciones fisiológicas del organismo y el comportamiento del ser vivo. Guían los patrones conductuales típicos diarios aún en la ausencia de señales externas tales como el amanecer o el anochecer, demostrando que tales patrones dependen de marcapasos internos para su periodicidad. Ningún reloj es perfecto, sin embargo, cuando los organismos son privados de una señal externa, por ejemplo la luz, estos muestran un periodo de libre corrimiento característico, de un valor aproximado de 24 hrs. Se cree que la luz es el sincronizador más fuerte de los ritmos circádicos.

Uno de los ritmos circádicos más claros en los mamíferos es el ciclo sueño-vigilia que depende tanto de un reloj biológico interno (núcleo supraquiasmático del hipotálamo), como de mecanismos homeostáticos.

El sueño se ha definido como un estado natural de descanso caracterizado por la reducción de los movimientos corporales y la disminución de la percepción de nuestro entorno, el cual puede ser revertido inmediatamente.

El sueño en el hombre se caracteriza por patrones típicos de ondas cerebrales registradas en el electroencefalograma (EEG). Otras especies de mamíferos muestran patrones electroencefalográficos comparables, pero en los vertebrados inferiores (ranas, peces) las señales características del sueño pueden variar, por lo tanto no existe una definición formal de este estado.

Ha habido diversos enfoques para tratar de entender los mecanismos que dan origen al sueño, uno de estos ha sido la búsqueda de sustancias inductoras del mismo.

La mayoría de las sustancias inductoras de sueño son de naturaleza proteica; sin embargo, recientemente se ha propuesto que ciertos lípidos presentan también propiedades inductoras o reguladoras del sueño. Uno de estos lípidos es la anandamida (ANA) considerada como un endocanabinoide, debido a que se encuentra de manera natural en el organismo y causa efectos similares a los de los cannabinoides, cuando se une al receptor CB1 en el cerebro.

Dentro de los criterios para considerar a una sustancia como factor inductor de sueño, se incluye que ésta o bien su receptor se modifique a lo largo del ciclo sueño-vigilia; o bien su concentración se altere al perturbar este ciclo.

Así pues el objetivo de este trabajo fue analizar si los receptores a cannabinoides CB1 fluctuaban a lo largo del ciclo de 24 hrs, además de evaluar el efecto de la privación de sueño total en la cantidad de CB1 inmunoreactiva.

Nuestros resultados mostraron que la expresión de los receptores a cannabinoides es diferente a lo largo de las 24 hrs del día, con una tendencia a ser mayor la expresión en las horas de luz y menor en las horas de oscuridad; tanto en el hipocampo como en el puente de rata. Por otro lado observamos que al alterar el ciclo sueño-vigilia hay una tendencia a la sobre expresión del receptor CB1 inmunoreactivo en ratas con rebote de sueño que en ratas privadas.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1. RITMOS CIRCÁDICOS

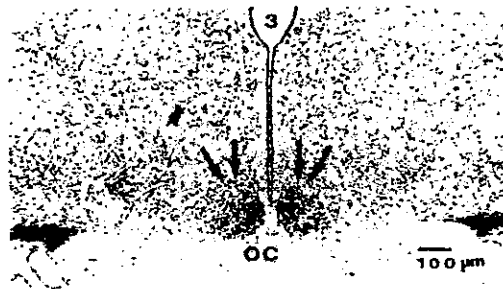
La mayoría de los procesos conductuales y fisiológicos en los mamíferos incluyendo al humano, están sujetos a cambios cíclicos y son gobernados por el sistema nervioso. Un gran número de estudios ha confirmado que la mayoría de los ritmos diurnos en una gran variedad de especies, incluyendo los humanos, persisten bajo condiciones ambientales constantes, por ejemplo, luz u oscuridad continua, (Rusak, 1980) y es entonces cuando se les considera ritmos endógenos.

Los ritmos circádicos son, por lo tanto, adaptaciones fundamentales al ciclo solar de luz y oscuridad. Estos ritmos generalmente tienen una periodicidad (tiempo requerido para que se complete un ciclo) de aproximadamente 24 hrs. Es por esto la designación de "circádico", del latín *circa*: alrededor y *dico* derivado de día.

Uno de los ritmos circádicos más característico en los mamíferos es el ciclo sueño-vigilia. En base a la distribución temporal de esta conducta estos organismos pueden ser clasificados en dos grandes grupos: los mamíferos diurnos, que están despiertos durante el día y dormidos durante la noche y los nocturnos que están dormidos durante el día y despiertos durante la noche. Estos patrones de conducta les han permitido una máxima adaptación con respecto al acceso al alimento, como a la reproducción, lo que en general se traduce como sobrevivencia.

En los mamíferos, la organización de la función circádica está regulada por una serie de estructuras neuronales que son conocidas como sistema circádico, el cual tiene dos funciones derivadas de las propiedades de los ritmos circádicos: la generación por marcapasos endógenos y la modificación por estímulos ambientales, particularmente el ciclo luz-oscuridad.

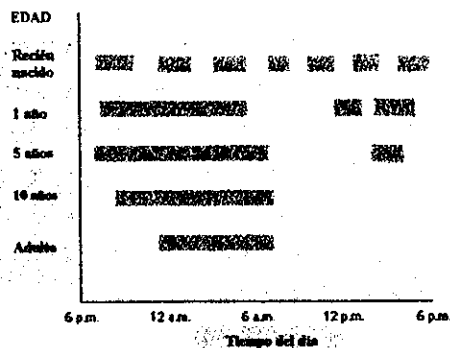
Uno de los reguladores maestros descubierto en el cerebro de los mamíferos, conocido como reloj biológico interno, es el núcleo supraquiasmático (SCN) y puede ser sincronizado por señales externas tales como los ciclos luz-oscuridad. El SCN se localiza en el hipotálamo anterior inmediatamente por encima del quiasma óptico (Cassone et al., 1988; Moore, 1973). Por lo que en la mayoría de los mamíferos puede ser distinguido fácilmente (Fig. 1).



**Fig. 1 Núcleo Supraquiasmático en el cerebro de rata, sección coronal preparada con tinción de Nissl. El SCN está señalado por la doble flecha. Son pequeños núcleos redondos junto al tercer ventrículo (3), por encima del quiasma óptico (OC). (Tomada de Moore RY, 1990).**

La hipótesis de que el SCN funciona como un marcador del ritmo endógeno ha sido confirmada con diferentes estudios como los efectos de la estimulación eléctrica del SCN (Rusak y Groos, 1982); la restauración de los ritmos circádicos después de la ablación del SCN mediante la implantación de un tejido hipotalámico fetal (Lehman et al., 1987) y la demostración de un periodo rítmico característico del donante cuando el trasplante hipotalámico tiene un periodo diferente del SCN separado del hospedero (Ralph et al., 1990).

La conducta más sobresaliente que marca los ritmos circádicos en los adultos humanos es el ciclo sueño-vigilia. En los humanos recién nacidos el sueño ocupa de 16 a 18 hrs de las 24 hrs del día. Para los 3 a 4 meses de edad el bebé duerme de 14 a 15 hrs al día; ocurriendo dos terceras partes del sueño en la fase nocturna. A los seis meses la mayoría de los infantes ha logrado un patrón de sueño, en el cual el sueño nocturno está bien consolidado. Esta distribución de los patrones de sueño obedecen a los requerimientos fisiológicos del individuo (Fig. 2).



### Patrones del sueño de acuerdo a la edad

Durante el desarrollo de los niños, varía tanto la distribución de sueño en un período de 24 hrs como el requerimiento de sueño total. Un niño recién nacido requiere de 16 a 18 hrs. de sueño, para un niño de un año, el requerimiento decrece a 14 o 15 hrs., de 10 a 12 hrs para niños de cuatro años y menos de 10 hrs de sueño para niños mayores de 10 años. La necesidad de sueño decrece progresivamente en el adolescente estabilizándose de 7 a 8 hrs. en el adulto. Los ancianos tienden a perder su capacidad para mantener el sueño. Ellos pueden dormir muy poco de noche pero tener siestas (sueño ligero) durante el día regresando a un patrón de sueño multifásico similar al de la primera infancia.

Además del ciclo sueño-vigilia, en el humano se presentan numerosos ritmos circádicos. Algunos ejemplos son la temperatura corporal, la concentración de la hormona del crecimiento en el suero, el porcentaje de cortisol sérico, la cantidad de potasio excretada, etc (Fig. 3).

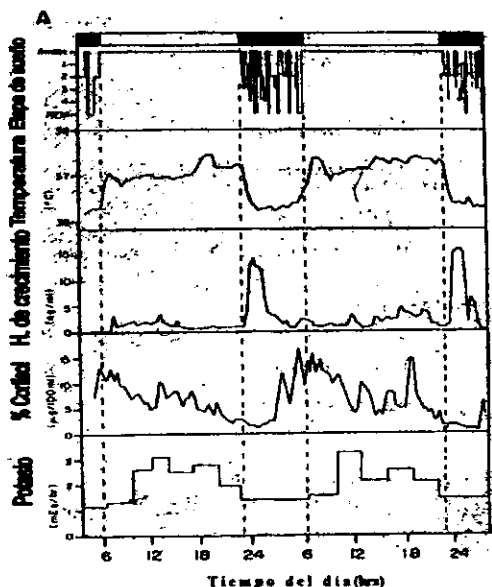


Fig. 3. (Tomada de Kryger MH et al., 1994)

## 2. SUEÑO

El sueño es un estado natural de reposo caracterizado por la reducción de los movimientos corporales y la disminución de la percepción de nuestro entorno. El sueño es distinguido de otros estados tales como hibernación, intoxicación, hipnosis, anestesia, estupor o coma, debido a su fácil interrupción por estimulación, por ejemplo, mediante un ruido de alta densidad. Mientras que la función del sueño permanece como un misterio, los investigadores de éste fenómeno han tenido enormes progresos acerca de cómo ocurre en humanos y otros animales, así como la naturaleza de los trastornos del mismo.

En un periodo corto de tiempo, los investigadores han descubierto que el sueño es una conducta dinámica, no simplemente la ausencia de vigilia. Así, el sueño es una actividad especial del cerebro controlada por mecanismos elaborados y precisos.

Todos los mamíferos y aves duermen, pero no estamos seguros si los reptiles, peces, insectos y otras formas de vida duermen.

La suma total de sueño por cada periodo difiere grandemente entre las especies. En general, los mamíferos grandes tienden a dormir menos que los mamíferos pequeños.

La jirafa y los elefantes, por ejemplo, duermen solamente de menos de una hora a 4 horas al día, mientras que los murciélagos, las zarigüeyas y los armadillos duermen 18 hrs. al día o más (Tabla 1).

MAMIFEROS	HORAS DE SUEÑO EN UN PERIODO DE 24 HRS.
Perezoso gigante	20
Zarigüeya	19
Koala	18
León salvaje	16
Ratón	13
Jaguar	10
Chimpancé	9
Humano, conejo, cerdo, rinoceronte	8
Foca gris, delfín	6
Vaca, cabra, burro, borrego	3
Caballo, elefante	2
Jirafa	20 minutos

Tabla 1.

Durante el sueño, la mayoría de los animales cierra los ojos y adopta posiciones particulares referidas como posturas específicas de esta función. Los humanos típicamente se acuestan para dormir, mientras que las jirafas se arrodillan y doblan sus largos cuellos para descansar su cabeza en el ángulo posterior de su rodilla. Algunos animales tales como los delfines pueden dormir mientras están en movimiento (Fig. 4).



A pesar que la conducta durante el sueño varía dependiendo de las especies, en general se cree que los cetáceos (ballenas, marsopas y delfines) en efecto duermen, lentifican su motricidad y se mantienen ya sea en la superficie o bien sumergiéndose lentamente en el agua.

(Fig. 4)

### 3. CICLO SUEÑO-VIGILIA

A pesar de que en los humanos el sueño ocupa una tercera parte de su vida, por muchos años sólo se consideró el aspecto mental de las ensoñaciones sin tomar en cuenta su relación con el estado funcional del cerebro. Hoy en día nos dedicamos a estudiar el sueño en base principalmente a tres medidas fisiológicas, con las que se define el sueño y sus diferentes etapas:

- 1) **Electroencefalograma (EEG)**, es conocido popularmente como "ondas cerebrales", fue caracterizado en 1929 por Hans Berger después de diseñar el primer electroencefalógrafo. Este aparato registra la actividad eléctrica del cerebro, en base a pequeños cambios en voltaje entre dos electrodos al ponerse en contacto con el cuero cabelludo. El EEG permite evaluar los niveles de actividad cerebral a diferentes tiempos durante el sueño. Los cambios en voltaje se miden en base a la variación en duración expresada en Hertz (Hz, ciclos por segundo) y amplitud expresada en microvolts ( $\mu\text{V}$ , millonésima de volt).
- 2) **Electrooculograma (EOG)**; registra la actividad eléctrica de los músculos que controlan los movimientos oculares; para lo cual se coloca un par de electrodos sobre la piel cerca del ojo los cuales registran un cambio en voltaje.

- 3) **Electromiograma (EMG)**; es un registro de la actividad eléctrica emanada de los músculos activos; puede ser registrada con electrodos sobre la superficie de la piel, que cubren un músculo. En humanos, el EMG es típicamente registrado en el mentón, debido a que los músculos en esta área muestran cambios muy dramáticos en su tono asociados con las diferentes etapas del sueño.

En base a estas medidas se ha determinado que en los humanos el ciclo sueño-vigilia presenta diferentes etapas: Vigilia (VIG), sueño de ondas lentas (SOL) que consiste de cuatro fases: I, II, III, y IV y sueño de movimientos oculares rápidos (SMOR) (Fig. 5).

En la vigilia el EEG alterna entre dos patrones principales: una actividad de bajo voltaje (10-30  $\mu\text{v}$ ), rápida (16-25 Hz o cps), que es llamada frecuentemente "activación" o patrón desincronizado. La otra actividad es un patrón sinusoidal de 8 a 12 Hz, entre 20 y 40  $\mu\text{v}$  que es llamada actividad "alfa". La actividad alfa es más abundante cuando el sujeto está relajado y con los ojos cerrados. El patrón de activación es más abundante cuando el sujeto está alerta y con los ojos abiertos explorando un ambiente visual. Los movimientos oculares rápidos (MORs) pueden ser abundantes o escasos dependiendo de la cantidad de exploración visual. Y el EMG puede ser moderado o alto dependiendo del grado de tensión muscular.

En SOL I, la actividad alfa decrece, la activación es escasa y el EEG consiste principalmente de actividad de voltaje medio (50 a 75  $\mu\text{v}$ ) y una frecuencia mixta de 3 a 7 Hz, se caracteriza por la presencia de ondas agudas del vertex; no hay presencia de MORs y el EMG es de moderado a bajo.

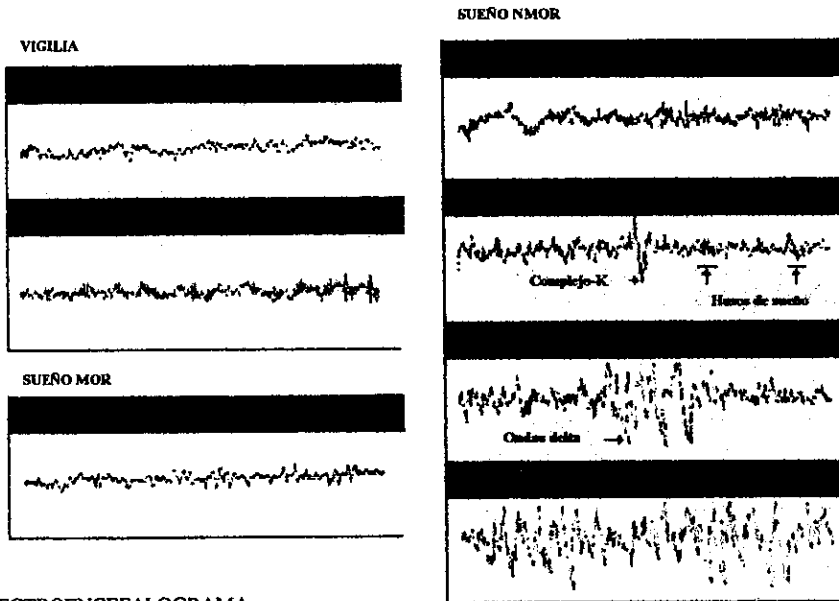
En SOL II, en contraste con una continuidad de voltaje medio, aparecen en el EEG husos de sueño que son ondas sinusoidales con una frecuencia entre 12 y 14 Hz, además de la presencia de los complejos K. El EOG y EMG continúan igual que en la etapa anterior.

En SOL III, aparecen en el EEG las llamadas ondas "delta" que son ondas de amplitud alta (>75  $\mu\text{v}$ ) de actividad lenta (0.5-4 Hz),

En SOL IV, hay un incremento cuantitativo de actividad delta, tal que llegan a dominar los trazos del EEG. A lo largo del sueño Delta (SOL III y IV) el tono muscular y los MOR decrecen paulatinamente.



En el SMOR, el EEG presenta actividad cortical de bajo voltaje con frecuencia mixta similar a la etapa I y desincronizada, como en vigilia. Hay presencia de MORs y atonía muscular. El 90% de las ensoñaciones ocurren en esta fase (Retschaffen y Kales, 1968), hay también cambios fisiológicos importantes tales como aumento de flujo sanguíneo en áreas visuales y disminución del flujo sanguíneo en la corteza frontal inferior.



#### ELECTROENCEFALOGRAMA

Fig. 5. El cerebro no está inactivo durante el sueño. El EEG muestra los patrones de actividad eléctrica durante las diferentes etapas de sueño. Notar que las ondas cerebrales de una persona en estado de alerta y aquellas de una persona en sMOR (cuando ocurren las ensoñaciones) son similares en frecuencia y amplitud; es por esto que al sMOR se le conoce también como sueño PARADÓJICO. En el sueño no MOR (NMOR) las ondas tienen una amplitud alta y una frecuencia baja indicando que las neuronas en el cerebro están disparando en una forma sincronizada

El sueño caracterizado por poco o ningún movimiento ocular es llamado sueño no MOR (NMOR) que corresponde a las etapas I, II III y IV. En humanos, las etapas III y IV se conocen como sueño de ondas lentas (SOL) o sueño delta, en mamíferos inferiores el SOL es igual al sueño NMOR.

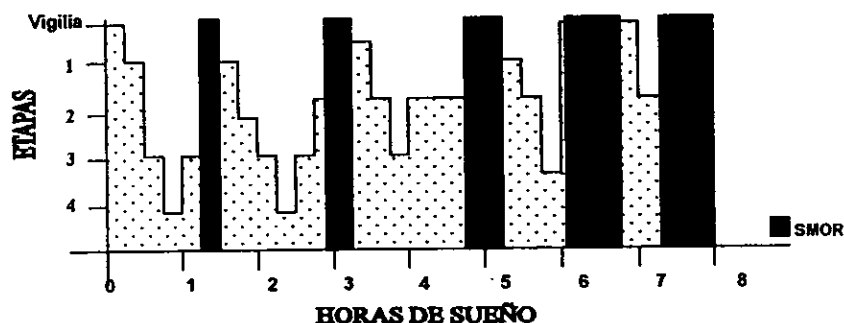
La actividad cerebral durante el sueño NMOR está dominada por ondas lentas y de alto voltaje a diferencia de las ondas rápidas y de bajo voltaje características de un sueño MOR y de un estado de vigilia.

Durante el sueño NMOR los ritmos respiratorios y cardiacos disminuyen, y la temperatura corporal y presión sanguínea frecuentemente decrecen. Cuando se despierta a un sujeto de un periodo de un sueño NMOR es mucho menos probable que reporte que estaba soñando.

El término de Sueño de Movimientos Oculares Rápidos (MOR) data del año de 1953, cuando los fisiólogos Eugene Aserinsky y Nathaniel Kleitman reportaron que durante el sueño ocurre un periodo de movimientos oculares rápidos. Además observaron que cuando los sujetos transitaban por el sueño MOR, al despertarlos reportaban que estaban soñando. Kleitman decía que funcionamos bien los primeros 90 min contados a partir del despertar, posteriormente es necesario reposar. Esto ocurre durante las 24 hrs. del día, por lo tanto, ocurre mientras estamos despiertos y aun cuando estamos dormidos. Esto fue nombrado como "Ciclo básico de actividad-reposo".

Estudios de sueño basados en EEGs han mostrado que excepto en ciertas condiciones patológicas una noche normal de sueño en el humano presenta un ciclo entre sueño MOR y NMOR con patrones muy regulares. En los adultos (entre 20 y 60 años), comienza con cerca de 90 minutos de sueño NMOR seguido por un periodo de cerca de 10 min. de sueño MOR, pudiendo haber por noche de 4 a 6 ciclos dependiendo de la longitud de los episodios y el total de tiempo dormido (Hartmann, 1968). Durante la noche, la suma de las etapas 3 y 4 decrece y la proporción del ciclo ocupado por el sueño MOR tiende a incrementar, esto es que el primer episodio de sueño MOR es de aproximadamente 10 min. creciendo progresivamente alcanzando hasta los 30 min. en las primeras horas del día. La mayoría de los adultos pasan cerca del 20 % del tiempo de sueño total en sueño MOR (Fig. 6).

Fig. 6 SECUENCIA DE ESTADOS Y ETAPAS DE SUEÑO EN UNA NOCHE TÍPICA



El gato y la rata han sido algunos de los animales más utilizados para los diferentes estudios básicos del sueño, ya que también presentan SOL, clasificado en SOL I y II, y sMOR con atonía muscular (Jouvet, 1969). Presentan ciclos polifásicos, es decir que a lo largo de las 24 hrs del día están durmiendo y despertando, con una duración por ciclo de 27 min. aproximadamente (Delorme et al., 1965).

#### 4. FUNCIONES DEL SUEÑO

A más de un siglo del estudio científico del sueño, incluyendo casi cuatro décadas de investigación intensa, las funciones biológicas del sueño permanecen aún como un enigma. A pesar de que no se sabe con seguridad porqué dormimos, existen un gran número de teorías. Las posibles funciones del sueño pueden ser consideradas en un principio como una perspectiva evolutiva primordial. El sueño pudo haber evolucionado para proteger a los animales de sus predadores reduciendo su actividad durante el tiempo en que son más vulnerables.

Se han realizado diversas investigaciones para encontrar las funciones tanto del sueño MOR como del NMOR. Cuando se han estudiado sujetos, tanto humanos como animales, privados de sueño MOR, se ha observado que pasan un mayor periodo de sueño MOR durante su siguiente ciclo de sueño para recuperar el perdido. El sueño MOR después de una privación, se expresa con más intensidad, además de que presenta mayor número de MORs por minuto que el sueño MOR normal (esto es conocido como REBOTE de sueño). Similarmente, sujetos privados de sueño NMOR generalmente tienden a compensar su pérdida de sueño NMOR. La actividad cerebral registrada en el EEG muestra que este rebote de sueño NMOR difiere del sueño NMOR normal. Estas investigaciones sugieren que el cuerpo necesita periodos adecuados tanto de sueño MOR como de NMOR y se cree que las dos clases de sueño tienen diferentes propósitos biológicos.

La mayor proporción de sueño MOR en el recién nacido en comparación con el adulto sugiere que el sueño MOR juega un papel importante en el desarrollo del cerebro.

Actualmente, se ha sustentado que el sueño MOR juega un papel importante para el aprendizaje; se ha reportado que después de la realización de una tarea conductual, la cantidad de sueño MOR se incrementa de manera muy notable, mientras que privaciones selectivas de sueño MOR afectan la consolidación de la memoria, indicando con esto, una estrecha relación entre ambos fenómenos. Con esto se sugiere que una de las posibles funciones del sueño MOR es favorecer el aprendizaje y la memoria basándose, en que durante el sueño MOR consolidamos la información adquirida durante la vigilia (Murillo, 1998).

Otra hipótesis es que el sueño sirve para restauración y/o recuperación bioquímica y/o fisiológica que son progresivamente degradados, principalmente durante la vigilia.

El sueño, se cree que también sirve para reducir el coeficiente metabólico y la temperatura corporal en animales endotérmicos mamíferos y aves durante periodos de descanso. Los datos de mayor peso a favor de la hipótesis de la conservación de la energía son las continuidades de termorregulación y electrofisiológicas entre la hibernación y el sueño.

Hay otra teoría que establece que durante el sueño la corteza cerebral elimina información que considera "superflua" para el individuo.

## **5. FACTORES INDUCTORES DE SUEÑO**

Para tratar de entender los mecanismos que dan origen a las diferentes fases de sueño se han utilizado diferentes enfoques. Uno de ellos ha sido la búsqueda de sustancias o factores capaces de inducir sueño. Asimismo, una de las estrategias más utilizadas ha sido el privar de sueño total, o selectivamente de SMOR a los sujetos con el fin de inducir la acumulación de un potencial factor de sueño.

Para que una sustancia endógena sea considerada como factor inductor de sueño debe cumplir con ciertos criterios: inducir y/o mantener el sueño; el efecto inductor de sueño debe ser dependiente de la dosis; tener un efecto similar en diferentes especies; existir naturalmente en el organismo; mostrar variaciones en su concentración, síntesis o recambio asociadas a los cambios en el ciclo sueño-vigilia, o bien en los receptores que medien sus efectos; y estar químicamente identificado. (Borbely y Tobler, 1989).

Actualmente hay identificados más de un par de decenas de sustancias inductoras de sueño (Tabla 2).

Tabla 2. Sustancias Promotoras de sueño

	SOL	MÓR	VIGILIA
<b>HORMONAS</b>			
Hormona del crecimiento (HC)	=	+++	---
Hormona Prolactina (HPr)	=	+++	---
Hormona liberadora de HC	+++	+++	---
Insulina	+++	=	---
Somatostatina	=	+++	-
Progesterona	+	=	-
Arginina-Vasotocina	+++	=	---
<b>NEUROPEPTIDOS</b>			
Peptido Vasoactivo Intestinal (VIP)	+	+++	--
Peptido semejante a Corticotropina (CLIP)	=	+++	-
Colecistocina (CCK-8)	=	+++	--
Cortistatina	++	--	=
<b>INMUNOCOMPUESTOS</b>			
Interferon 2 (IFN)	+++	---	--
Interleucina 1 $\alpha$ y $\beta$ (IL 1- $\alpha$ e IL 1- $\beta$ )	+++	---	--
Peptidos muramí (PM)	+++	---	--
Factor de Necrosis Tumoral (TNF)	+++	---	--
<b>FACTORES INDUCTORES DE SUEÑO</b>			
Peptido inductor de Sueño Delta (DSIP)	+++	---	---
Factor S	+++	---	---
Sustancia Promotora de Sueño (SPS)	+++	---	---
Uridina	+++	---	---
Deoxicidina	+++	---	---
Prostaglandinas	+++	---	---
Neuroproteínas	+++	---	---
Neuropéptidos	+++	---	---
<b>LÍPIDOS</b>			
Oleamida	++	=	--
Anandamida	++	++	--

Notas:

- Tabla hecha con datos obtenidos en las citas: 3, 4, 18, 20, 22 y 39

- + efecto promotor
- - efecto inhibidor
- = no cambios observados
- mas de una vez cualquiera de los signos significa mayor potencia para modificar la fase.

De estos factores inductores de sueño queremos destacar a los dos de naturaleza lipídica. Uno de ellos es la oleamida (OLE) (cis-9,10 octadecenoamida), el cual es un lípido descrito recientemente (Lerner et al., 1994; Cravatt et al., 1995) llamado originalmente cerebrodieno. Fue aislado del líquido cefalorraquídeo de gatos privados de sueño; posteriormente se identificó también en rata y en humano. Se localiza en altas concentraciones en hipocampo, neocorteza, y amígdala (Thomas et al., 1997; Egertova et al., 1998) y en menores concentraciones en tálamo, hipotálamo, cerebelo, corteza y bulbo olfatorio.

Nuestro grupo de investigación, recientemente ha hecho estudios sobre este lípido observando que participa de manera activa en la modulación de los estados de alerta, incrementando el SOL 1 y el SOL 2 a expensas de la vigilia y el SMOR, además de que disminuye la temperatura corporal, deteriora la consolidación de la memoria, e inhibe la actividad motora (Murillo et al., 1998).

Estos efectos son similares a los efectos producidos por los cannabinoides por lo que se consideró a la oleamida un endocanabinoide. No se une con gran afinidad a los receptores a cannabinoides, sin embargo parece compartir las vías de catabolismo de la anandamida (ANA), primer lípido endocanabinoide descrito; ambas son degradadas por la misma enzima, la hidrolasa de los ácidos grasos (FAAH); se ha propuesto que su síntesis en el cerebro es a partir de ácido oléico y amonio.

## 6. CANABINOIDES Y MARIHUANA

Cabe señalar que los cannabinoides son las sustancias con propiedades psicoactivas extraídas de la planta *Cannabis sativa*, conocida comúnmente como planta de la marihuana. Se conocen dos variedades de dicha planta: *indica* y *americana*. Los cannabinoides se localizan en toda la planta, pero en mayor concentración en las flores. El principal componente psicoactivo de la marihuana es el  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC), que fue descrito en 1964 por Gaoni y Mechoulam (Citado en: Johnson, 1986).

Es importante señalar que no es el único canabinoide que se extrae de la marihuana. De las 400 sustancias analizadas, sólo 60 tienen una estructura química similar al  $\Delta^9$ -THC, son menos potentes pero no dejan de ser metabolitos potencialmente importantes para su uso terapéutico o sus interacciones con el  $\Delta^9$ -THC. Por ejemplo, el cannabinol no psicoactivo, el canabidiol y el ácido canabinólico se sugiere que contribuyen en algunos de los efectos mediados por el  $\Delta^9$ -THC sobre tejidos periféricos, tales como protección celular, inmunosupresión y propiedades antiinflamatorias (Felder y Glass, 1998 y Mechoulam, 1986).

Las propiedades psicoactivas de la marihuana se conocen desde hace más de 4,000 años. Inclusive su uso terapéutico había sido reconocido desde hace miles de años (Zias *et al.*, 1993). La marihuana había sido empleada con fines místicos y religiosos; pero su popularidad inicial no solo se debe a esta propiedad, sino también a varias aplicaciones médicas, ampliamente documentadas por la medicina hindú.

La mayoría de las drogas tienen la capacidad de inducir cambios psicoactivos modificando la fisiología del cerebro ya que alteran los estados de alerta, la percepción, la memoria y otras conductas.

La marihuana, y el opio son las drogas ilícitas más comúnmente utilizadas a nivel mundial. En Estados Unidos, un 55% de jóvenes adultos admiten haber tenido alguna experiencia con la marihuana (Prospéro *et al.*, 1999). En México, son las drogas más utilizadas después del alcohol y el tabaco. En una encuesta reciente, realizada a más de 13,000 personas entre edades de 12 a 65 años, al menos el 1% admitió haber consumido marihuana (Tapia *et al.*, 1990).

La ingestión del  $\Delta^9$ -THC presenta diversos efectos tanto placenteros como adversos dependiendo de la dosis (tabla 3), de los cuales el que nos interesa por el momento es que produce somnolencia.

Tabla 3. Efectos del  $\Delta^9$ -THC

<b>Efectos Placenteros</b>	
1.	Incremento en la percepción de uno mismo
2.	Sensación de bienestar
3.	Estado de somnolencia (puede ser interpretada por el sujeto como relajación)
4.	Reducción en la percepción al dolor
5.	Aumenta el deseo sexual

(Próspero *et al.*, 1999)

<b>Efectos Adversos</b>	
1.	Deterioro en la memoria a corto plazo
2.	Deterioro en la coordinación motora
3.	Deterioro en la habilidad cognitiva y atención
4.	Decremento en la temperatura
5.	Incremento en el SOL
6.	Baja los niveles de testosterona inhibiendo la espermatogénesis
7.	Induce disfunción erectil
8.	Suprime la hormona leutinizante, alterando el ciclo menstrual
9.	Provoca efectos teratogénicos

Nota:

Para ampliar la información acerca de los datos sobre efectos que ocasiona la marihuana y el  $\Delta^9$ -THC (Ameri, 1999).

Por otro lado la marihuana se ha utilizado con fines terapéuticos en diversos padecimientos tales como: molestias del parto, migraña, convulsiones, atenuación de náuseas y vómito asociados a la quimioterapia. Decece la constricción bronquial en asma y la motilidad intestinal durante accesos de diarrea. Más recientemente, se ha reportado, como estimulante del apetito en pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (Felder y Glass, 1998).

## 7. RECEPTORES A CANABINOIDES

Los efectos ocasionados por la marihuana y el  $\Delta^9$ -THC, habían sido atribuidos inicialmente a una perturbación membranal, siendo esta la primera hipótesis en tratar de exponer un mecanismo con el cual explicar como el  $\Delta^9$ -THC inducía sus efectos. Con los estudios hechos por Howlett y Fleming en 1984 y Devane *et al.* en 1988, ésta hipótesis fue abandonada al demostrar la existencia en el cerebro de un receptor que reconocía un canabinoide sintético. A partir de este momento comenzó la búsqueda del ligando endógeno que naturalmente ocupaba ese receptor.

CB1, fue el primer receptor a canabinoides descrito, conocido como receptor canabinoide cerebral o neuronal. Fue caracterizado molecularmente y clonado a fines de los 80's (Devane et al., 1988; Matsuda et al., 1990). Se expresa preferencialmente en áreas del sistema nervioso central (SNC) tales como hipocampo, cerebelo, regiones corticales y ganglios basales (Felder y Glass, 1998); éstas son áreas que contribuyen de manera importante en el control de la memoria, la cognición, el movimiento y la percepción del dolor. En efecto, tales funciones pueden ser influenciadas fuertemente por drogas canabinoides con consecuencias tales como euforia, analgesia, sedación y deterioro en la memoria (Stella et al., 1997). Además se localiza en bajas concentraciones en áreas como puente, tallo cerebral y tálamo. Dichas áreas están relacionadas con el control de diversas conductas, tales como el ciclo sueño-vigilia. También ha sido encontrado su RNAm en testículos.

El receptor CB1 pertenece a la familia de receptores con siete dominios transmembranales (fig. 7), con tres loops intracelulares y tres extracelulares. Posee un grupo amino terminal extracelular y un grupo carboxilo terminal intracelular. Interactúa con las proteínas Gi produciendo por un lado la inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa (AC) reduciendo por lo tanto la producción de AMP cíclico, y por otro lado actúa sobre las fosfolipasas (A2 y C) estimulando la liberación de ácido araquidónico, diácil glicerol e inositol trifosfato.



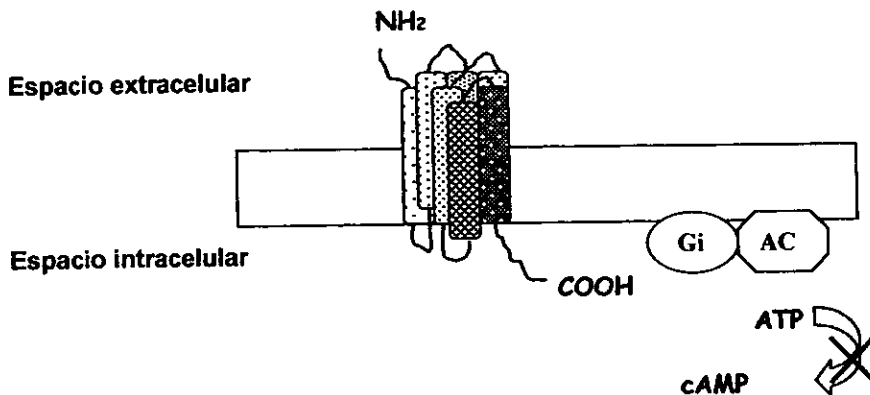


FIG. 7. Receptor a cannabinoides CB1 que pertenece a la familia de receptores con siete dominios transmembranales, interactúa con las proteínas Gi inhibiendo la actividad de la adenilato ciclasa y por lo tanto reduce la producción de AMP cíclico.

CB2; es otro receptor a cannabinoides distribuido principalmente en el sistema nervioso periférico, pero también se ha localizado en el bazo, el hígado, el pulmón, el timo y los riñones. No se ha detectado su RNAm en cerebro. No se sabe que mecanismos de transducción median la activación de los receptores CB2; al pertenecer a la misma familia de receptores con siete dominios transmembranales interactúan al igual que el CB1 con las proteínas G, desencadenando los mismos efectos. Actualmente se ha postulado que el CB2 puede estar modulando procesos relacionados con el sistema inmune.

Recientemente se ha descrito otro receptor a cannabinoides que es una variante del CB1 conocida como CB1A, teniendo una distribución idéntica al CB1 (Shire et al., 1995).

Tanto el  $\Delta^9$ -THC, como ANA, se acoplan al CB1 y CB2, pero con una marcada preferencia por el CB1 (Felder y Glass, 1998). Por lo que se ha postulado la idea de que tanto los cannabinoides exógenos como endógenos emplean el sistema de receptores CB1 para llevar a cabo sus efectos.

Los receptores cannabinoides son regulados por lo menos por tres clases de ligandos agonistas: a) cannabinoides ( $\Delta^9$ -THC), b) eicosanoides (grupo al que pertenece la anandamida) y c) derivados aminoalquilindoles.

## 8. ENDOCANABINOIDES

Como se había mencionado anteriormente el primer endocanabinoide descrito fue la Anandamida (ANA) (Araquidoniletanolamida). En el sánscrito hindú significa bendición (Devane *et al.*, 1992). Fue descrito en 1992 por Mechoulam; se trata al igual que OLE, de un lípido endógeno que se une a los receptores a canabinoides y mimetiza la acción del  $\Delta 9$ -THC (Devane *et al.*, 1992). Es un eicosanoide que se forma a partir de la condensación catalizada enzimáticamente del ácido araquidónico (AA) con etanolamina por acción inversa de la enzima FAAH (Devane y Axelrod, 1994).

Es interesante señalar que la enzima que degrada a ANA, originalmente conocida como anandamida amidohidrolasa (Maurelli *et al.*, 1995), ahora conocida como Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) (Cravatt *et al.*, 1995), muestra gran actividad en regiones del SNC como el hipocampo (Thomas *et al.*, 1997).

Posterior a la despolarización de la membrana de las neuronas del SNC, ANA es liberada y puede bien unirse a los receptores o bien ser capturada por un acarreador y degradarse por la FAAH produciendo etanolamida y ácidos grasos los cuales se incorporan posteriormente a los fosfolípidos de la membrana.

Las concentraciones más elevadas de ANA se han encontrado en áreas del SNC donde se localizan los receptores CB1 (Felder *et al.*, 1996; Glass *et al.*, 1997), tales como hipocampo, estriado, cerebelo y corteza cerebral; en menores concentraciones en tálamo, explicando la serie de alteraciones conductuales que provoca. También se ha detectado en plasma y regiones periféricas como testículo (Wang *et al.*, 1983; Felder y Glass, 1998).

Los efectos de ANA a nivel celular son similares a los inducidos por el  $\Delta 9$ -THC: a bajas concentraciones disminuye la actividad de la AC, disminuyendo a su vez la concentración del AMPc (Childers, 1996). Incrementa la conductancia de los canales de potasio; y a altas concentraciones activa la fosfolipasa A2 (PLA2) y la señal de transducción de la MAP cinasa, modulando de esta manera la producción y liberación de otros neurotransmisores (Wartmann, 1995).

Los efectos conductuales de ANA son similares a los inducidos por el  $\Delta 9$ -THC pero con menor duración; produce analgesia, inactiva los centros termorreguladores dando como resultado hipotermia, inactiva los centros de percepción. Además, nuestro grupo en estudios recientes observó que interfiere con procesos cognitivos como los procesos de la memoria, incrementa el SOL 2 y el sMOR a expensas de la vigilia, interfiriendo también en procesos motores (Murillo *et al.*, 1998).

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los efectos que ANA ocasiona sobre el sueño fueron reportados por nuestro grupo en 1998, después de observar que la administración intra cerebro ventricular (icv) de ANA induce un incremento en la cantidad de SOL 2 y de SMOR, mientras que se observa un decremento significativo durante la vigilia (Murillo *et al.*, 1998).

Hoy en día se desconoce la ruta por la cual ANA puede modificar el sueño. Sin embargo, experimentos llevados a cabo en nuestro grupo han mostrado que al bloquear el receptor a cannabinoides CB1 empleando el antagonista SR141716A, se previenen los efectos que ocasiona ANA en el sueño (Murillo *et al.*, 2000). Este dato es importante ya que sugiere que las alteraciones que ocasiona ANA en el sueño, pueden ser explicadas parcialmente mediante la activación del sistema de señalización de endocannabinoides.

Thomas y cols (1999), señalaron que OLE puede activar a células del tálamo e hipotálamo de ratón, sugiriendo con esto un posible mecanismo neuroanatómico involucrado en la generación del sueño, es decir que se sugiere que OLE podría estar activando determinados núcleos del SNC involucrados en la generación del sueño.

Mendelson y Basile (1999), demostraron que empleando el SR141716A, se prevenía el aumento en la somnolencia observado tras la administración de OLE. Nuestro grupo ha demostrado que la OLE presenta un efecto dosis-dependiente sobre el incremento en la cantidad de SOL. El efecto más importante se obtiene con dosis de 25 µg, provocando una reducción de la VIG y el SMOR así como un incremento en la cantidad de SOL1 y SOL2; éstos efectos son bloqueados empleando el SR141716A (Murillo *et al.*, 2000).

Por los efectos causados por OLE y ANA, observados por nuestro grupo, sugerimos que estos cannabinoides endógenos juegan un papel importante en la regulación del sueño.

En base a la efectos provocados por los endocannabinoides en el cerebro vía receptores CB1 y basándonos, como ya se había mencionado anteriormente, en que el ciclo sueño vigilia es un ciclo circádico, nos interesamos en saber si el receptor a cannabinoides CB1 muestra también una variación diurna. No sería el único receptor en el cerebro que presentara una variación circádica; por ejemplo en 1995 Holmes y cols. reportaron que los receptores a serotonina y corticosteroides se expresan siguiendo un ritmo circádico en neuronas del hipocampo. En 1999, Díaz Muñoz y colaboradores observaron que el receptor a rianodina presenta una modulación circádica en SNC de roedor.

Así mismo, nos interesamos en analizar si la expresión del receptor a cannabinoides CB1, en puente e hipocampo, se altera al modificar el ciclo sueño-vigilia.

### **III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **HIPÓTESIS**

- La expresión del receptor CB1 cursa con variaciones diurnas en hipocampo y puente de rata.
- La expresión del receptor CB1 aumenta con la privación de sueño y disminuye con el rebote.

#### **OBJETIVOS**

1. Determinar las concentraciones del receptor CB1 inmunoreactivo a las 9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 1:00 y 5:00 hrs en puente e hipocampo de rata.
2. Evaluar la concentración del receptor CB1 en hipocampo y puente de rata con privación de sueño total.
3. Evaluar la concentración del receptor CB1 en hipocampo y puente de rata con rebote de sueño de dos horas.

## IV. METODOLOGÍA

**Sujetos experimentales.** En todos los experimentos se utilizaron ratas macho adultas, de la cepa Wistar, con un peso entre 250 y 300 g. Fueron animales clínicamente sanos mantenidos en condiciones de bioterio y cuidados de acuerdo con los lineamientos para el uso de animales de investigación de la Ley General de Salud en México y con la Guide for the care and Use of Laboratory Animals. 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*.

### 1. Variaciones diurnas

Para observar las variaciones de la expresión del receptor a cannabinoides CB1, se sacrificaron 30 ratas, sin manipulación previa, a diferentes horas del día: 9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 1:00 y 5:00; cinco ratas por cada punto.

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación, inmediatamente se les extrajo el cerebro el cual se colocó sobre una caja de *petri* que contenía papel filtro húmedo con solución salina; todo esto en frío. Se procedió a la extracción del puente e hipocampo total. Al momento el tejido fue mantenido en hielo seco; una vez extraídos todos los tejidos se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### 2. Privación de sueño total.

Para analizar si la expresión del receptor a cannabinoides CB1 se modifica al alterar el ciclo sueño-vigilia, se procedió de la siguiente manera: se privaron 10 ratas de sueño total mediante manipulación leve, es decir acicalando a la rata, evitando que caiga en algún tipo de sueño, durante un periodo de 12 hrs (9:00 – 21:00 hrs), suministrándoles agua y comida *ad libitum*. A 5 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 (19:00-21:00 hrs). A las 21:00 hrs. fueron sacrificadas por decapitación para obtener puente e hipocampo. Se siguió el procedimiento que a continuación se describe para la obtención de tejidos y preparación de muestras.

### **3. Obtención de tejidos y preparación de muestras**

Una vez extraído el tejido se congeló a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Se procesó homogenizándolo con un amortiguador formado por Tris-HCl adicionado con inhibidores de proteasas, aprotinina y PMSF (Ver anexo). Posteriormente se centrifugó (600 Xg, 10',  $4^{\circ}\text{C}$ ) (Centrífuga Sorvall Super T21), se desechó el primer precipitado. El sobrenadante se sometió a una segunda centrifugación (39,000 Xg, 15',  $4^{\circ}\text{C}$ ). El segundo sobrenadante se sometió a una cuantificación de concentración proteica por el método de Lowry (Lowry et al., 1951).

### **4. Cuantificación de proteínas**

Para cuantificar las proteínas del tejido analizado, se utilizó el método de Lowry. Es un método cuantitativo que se hace en un medio alcalino. La base de este método consiste en usar la reacción de Biuret (anexo), es decir la interacción de la proteína con el Cobre, bajo condiciones básicas junto con la reducción del reactivo Folin-Ciocalteu. Dentro de las ventajas que nos da, es que es muy sensible y varía muy poco entre diferentes proteínas y dentro de las desventajas tenemos que es irreversible, interfiere muchas sustancias y tiene una velocidad de reacción lenta.

Utilizamos 5  $\mu\text{l}$  de cada muestra para la cuantificación de proteínas.

### **5.- Electroforesis con gel de poliacrilamida con SDS (SDS- PAGE)**

Se preparó un gel de poliacrilamida al 12% adicionado con SDS (Laemmli, 1970) (ver anexo). Se mezcló una cantidad correspondiente a 15  $\mu\text{g}$  de proteína, de cada una de las muestras, con amortiguador de proteínas 2x, a una dilución 1:1 (anexo). Se utilizaron estándares de pesos moleculares (GIBCO BRL), los cuales junto con las muestras se calentaron a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 2 min. Cada una de las muestras se sonicó con un sonicador de ultrasonido (ultrasonic homogenizer 4710); se centrifugaron las muestras a 10,000 r.p.m. durante 10 min. La electroforesis se corrió a 150 V, hasta que el frente de corrida llegó a aproximadamente 5 mm del borde inferior del gel.

## 6.- Inmunoelctrotransferencia.

El patrón de proteínas obtenido se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (NC) (GIBCO BRL), con un diámetro de poro de  $0.45\mu$ , siguiendo el procedimiento reportado por Towbin (1979). La transferencia se llevó a cabo a 100 Volts, durante una hora en una cámara húmeda de transferencia (Mini trans-blot, BIORAD). La membrana de NC fue recortada en tiras, correspondiendo a los diferentes carriles del gel. Las tiras de NC se incubaron en una solución bloqueadora (anexo) durante 30 min 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 (1:1600), toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Al día siguiente se hicieron tres lavados con PBS-Tween (anexo) de 5 min cada uno; se hizo una incubación con un segundo anticuerpo (IgG peroxidado anti conejo hecho en cabra) (1:2000), durante 45 min, a temperatura ambiente. Este anticuerpo tiene acoplada la enzima peroxidasa de rábano. Se lavó nuevamente con PBS-Tween durante 5 min. c/u. La reacción antígeno-antiCB1-antiIgG fue reconocida adicionando el sustrato diaminobencidina (DAB) (anexo), la cual es oxidada por la enzima peroxidasa, permitiéndonos detectar la presencia de receptores a cannabinoides CB1.

La inmunoelctrotransferencia se estandarizó hasta obtener la forma de bloqueo exacto de las membranas, es decir, la cantidad de leche empleada (10%), el porcentaje de Suero Normal de Cabra (2%) y el tiempo empleado (ver anexo). Así como también la cantidad de proteína usada para correr en el gel de poliacrilamida. También se optimizó la concentración de ambos anticuerpos utilizados y el tiempo de revelado.

## 7. Densitometría

La densidad de la banda correspondiente al receptor CB1, se cuantificó utilizando un sistema para documentación y análisis de geles (Kodak Digital Science EDAS 120). La intensidad neta (IN) obtenida, se refiere a la intensidad en color de la banda, es decir que tan claro o que tan oscuro esta. La IN, en todos los casos, fue referida a un tejido control que se corrió en paralelo en cada uno de los geles. Para tomar la densidad consideramos nuestra muestra control como el 100% y el programa nos daba la intensidad de la banda en base a la muestra control, es decir, nos marcaba el porcentaje al cual correspondía la banda ya sea por encima o por debajo de dicho 100%.

## 8. Prueba estadística

La prueba estadística utilizada en todos los casos fue: análisis de varianza de un factor.

## V. RESULTADOS

### 1.- Estandarización de la técnica

Para cumplir con los objetivos antes señalados, lo primero que hicimos fue estandarizar la técnica de inmunoelectrotransferencia, con la cual, evaluamos semicuantitativamente la expresión del receptor CB1, en los tejidos de puente e hipocampo de rata. Para estandarizar la técnica, variamos cantidad de proteína utilizada, condiciones de bloqueo, concentración de ambos anticuerpos utilizados, así como tiempo de incubación con los mismos y finalmente tiempo de revelado. Quedando en las siguientes condiciones:

- Proteína: 15 $\mu$ g
- Bloqueo: Leche Nestle-Svelty al 10%; 30 min.
- 1er anticuerpo: AntiCB1, hecho en conejo, (1:1600), 12 hrs. 4°C
- 2° anticuerpo: Anti IgG peroxidado, hecho en cabra, (1:2000), 1hr. Temperatura ambiente.
- Revelado: DAB (150  $\mu$ g); 1 min.

### 2.- Expresión diurna de los receptores CB1 en puente e hipocampo de rata.

En la figura 1 se muestra el patrón de proteínas inmunoreactivas a antiCB1 para puente e hipocampo de rata a diferentes horas del día. 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.

Observamos una banda prominente a una movilidad relativa correspondiente aproximadamente a 52 kd, basándonos en los estándares de pesos moleculares utilizados, la cual corresponde al peso reportado para los receptores a cannabinoides.



## **PUENTE**

1            2            3            4            5            6

a b        a b        a b        a b        a b        a b

52 Kd →



## **HIPOCAMPO**

52 Kd →



9:00        13:00        17:00        21:00        1:00        5:00

**Fig. 1.** Expresión inmunoreactiva del receptor CB1 en puente e hipocampo de rata a diferentes horas del día (carriles 1-6). En cada uno de los carriles el inciso a, corresponde a la reacción antígeno-anticuerpo tratado con antiCB1 y el inciso b, tratado con suero normal de conejo.

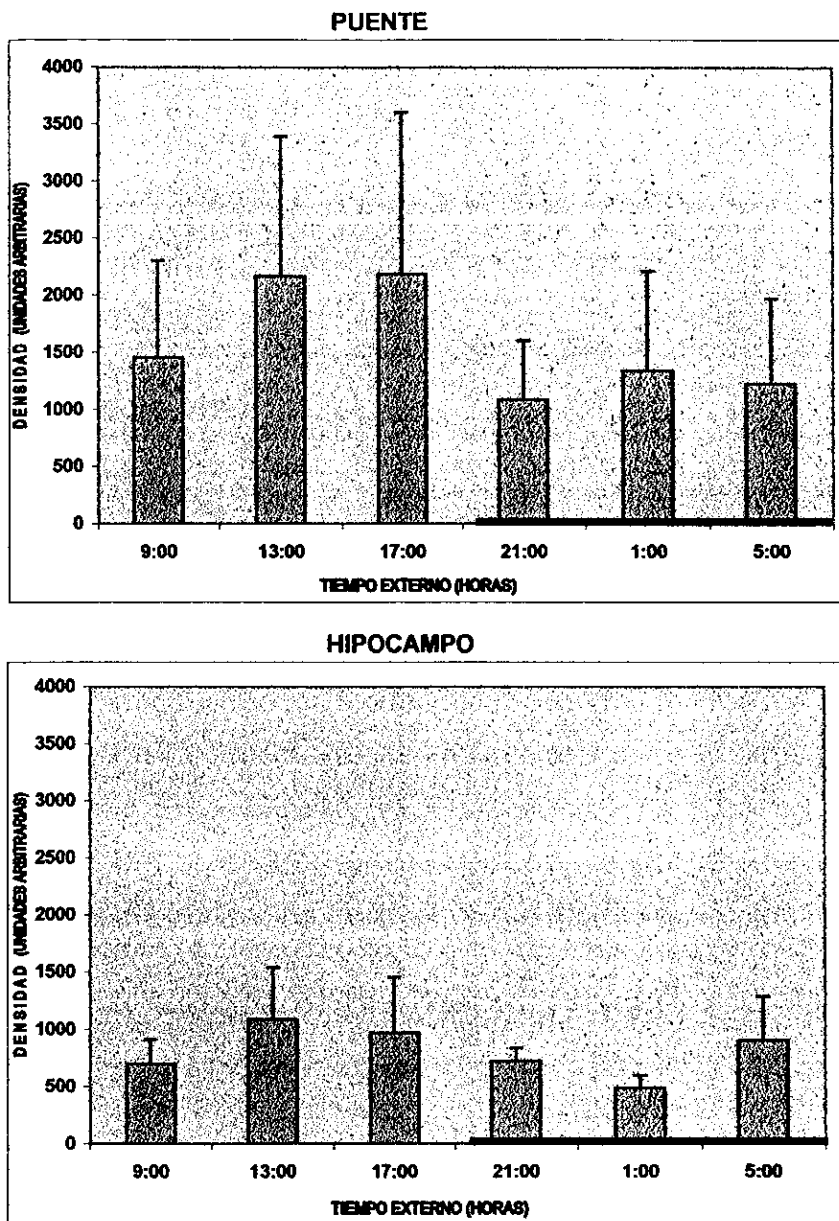
En puente observamos una ligera diferencia en la expresión del receptor a cada una de las diferentes horas del día; por otro lado, en hipocampo podemos apreciar una diferente expresión del receptor en cada uno de los carriles; se observa en primera instancia una mayor expresión del receptor a las 13:00 hrs y una menor expresión del mismo a la 01:00 hrs.

Para corroborar estos datos se sometieron las bandas de 52 kd a un análisis densitométrico, obteniendo los resultados que se observan en la fig. 2. En esta figura están graficados los promedio  $\pm$  el error estándar de las intensidades netas del receptor a las diferentes horas del día, tanto para puente como para hipocampo respectivamente, correspondiendo a cinco ratas para cada hora.

Por un lado, observamos que en puente hay una diferente expresión del receptor CB1 a las diferentes horas del día, tendiendo a ser mayor en las horas de luz que en las horas de oscuridad, siendo el punto más alto ( $2,185.0 \pm 1416.1$  I.N.) a las 17:00 y el más bajo ( $1,086.0 \pm 516.4$  I.N.) a las 21:00 hrs, lo cual no es estadísticamente significativo ( $p = 0.942$ ).

En la grafica para hipocampo observamos una mayor expresión del receptor CB1 a las 13:00 ( $1085.4 \pm 455.4$  I.N.) y una menor expresión a la 01:00 hrs ( $483.2 \pm 111.4$  I.N.); tendiendo a ser mayor la expresión del receptor en las horas de luz que en las horas de oscuridad; lo cual, no muestra una diferencia estadísticamente significativa, según el análisis de varianza de un factor aplicado ( $p = 0.824$ ).

En la figura 3 podemos tener una mejor apreciación de la expresión del receptor CB1, a lo largo de las 24 hrs del día, tanto en puente como en hipocampo, observándose una tendencia a presentar una menor expresión del receptor CB1 en las horas de oscuridad y mayor en las horas de luz, en ambos casos; por lo que puede observarse una tendencia a una variación diurna.



**Fig. 2.** Intensidades netas del receptor CB1 (promedio +/- error estándar) a diferentes horas del día (9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 01:00 y 05:00 hrs). en puente e hipocampo de rata.  
 Tipo de prueba estadística: análisis de varianza de un factor

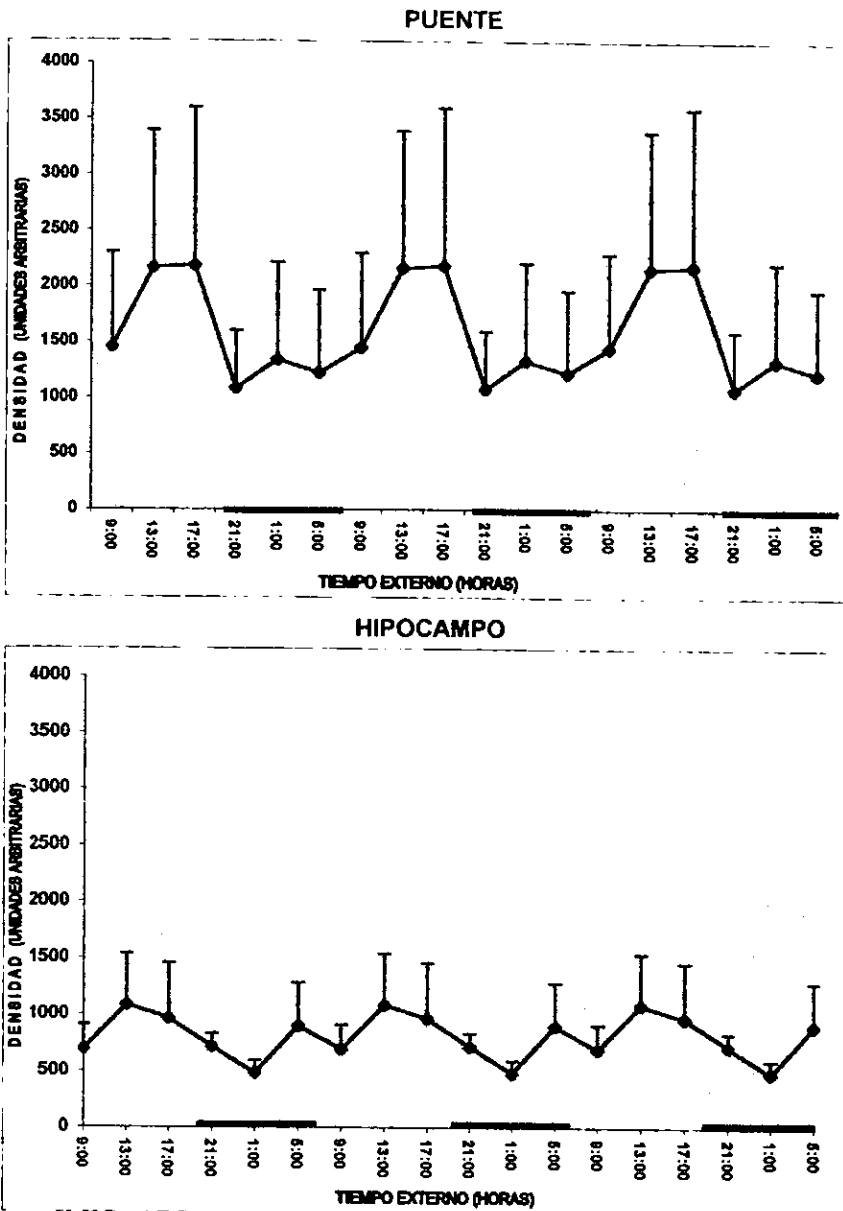


Fig. 3. Variación diurna del receptor CB1 (promedio de intensidad neta  $\pm$  error estándar) a diferentes horas del día (9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 01:00, y 05:00 hrs), en puente e hipocampo de rata.  
 Tipo de prueba estadística: análisis de varianza de un factor

### 3.- Expresión de la concentración del receptor CB1 en puente e hipocampo de rata con privación de sueño total y ratas con rebote.

En la figura 4, observamos la expresión inmunoreactiva del receptor CB1 en puente e hipocampo de rata en las tres condiciones medidas: carriles 1-3 controles es decir, ratas con comida, agua y sueño *ad libitum*; carriles 4-8 ratas privadas de sueño total y carriles 9-13 ratas con rebote de sueño de dos horas; cada uno de los carriles corresponde a una sola rata.

Se observa una mayor concentración del receptor CB1 a una movilidad relativa de 52 Kd, en las ratas con rebote, tanto en puente como en hipocampo. Sin embargo, en general la expresión del receptor en puente es mayor que en hipocampo.

Para corroborar estos datos las bandas correspondientes a los 52 Kd fueron analizadas densitométricamente, con lo cual, se midió cualitativamente las diferencias entre cada grupo (Fig. 5).

En esta figura observamos las intensidades netas, promedio de 5 ratas  $\pm$  error estándar, del receptor CB1, tanto en puente como en hipocampo.

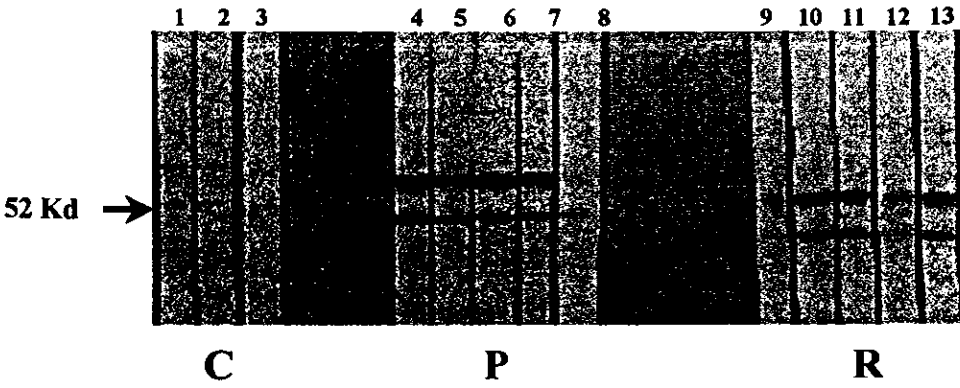
En puente, observamos que efectivamente hay una diferencia en los tres grupos, siendo mayor en las ratas con rebote de sueño ( $794.0 \pm 39.0$  I.N.), con respecto a las ratas privadas ( $512.4 \pm 28.8$  I.N.) y a los controles ( $482.4 \pm 60.5$  I.N.); en este experimento al analizarlo estadísticamente si se observan diferencias significativas al comparar tanto los rebotes con los controles como los rebotes con las privadas.

Comparación	p<0.05
3 vs 1	sí
3 vs 2	sí
2 vs 1	no

Nota: control = 1, privada = 2 y rebote = 3

Por otro lado en hipocampo observamos que las ratas con rebote de sueño presentan una mayor expresión del receptor ( $477.6 \pm 98.6$  I.N.) con respecto a las ratas privadas ( $425.8 \pm 36.0$  I.N.) y a las ratas controles ( $307.4 \pm 23.1$  I.N.); las diferencias no alcanzan a ser estadísticamente significativas ( $p = 0.181$ ).

*PUENTE*



*HIPOCAMPO*

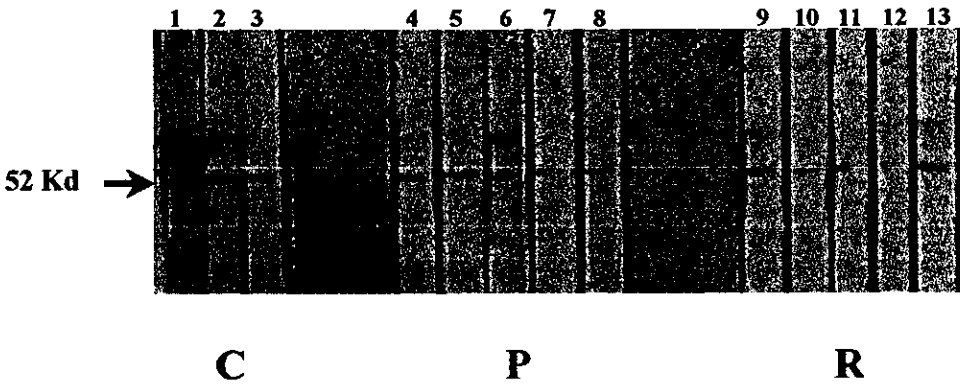


Fig. 4. Expresión inmunoreactiva del receptor CB1 en puente e hipocampo de ratas con privación total de sueño por 12 hrs. Los carriles 1-3 corresponden a los controles; los carriles 4-8 a las ratas privadas de sueño y los carriles 9-13 ratas con rebote.

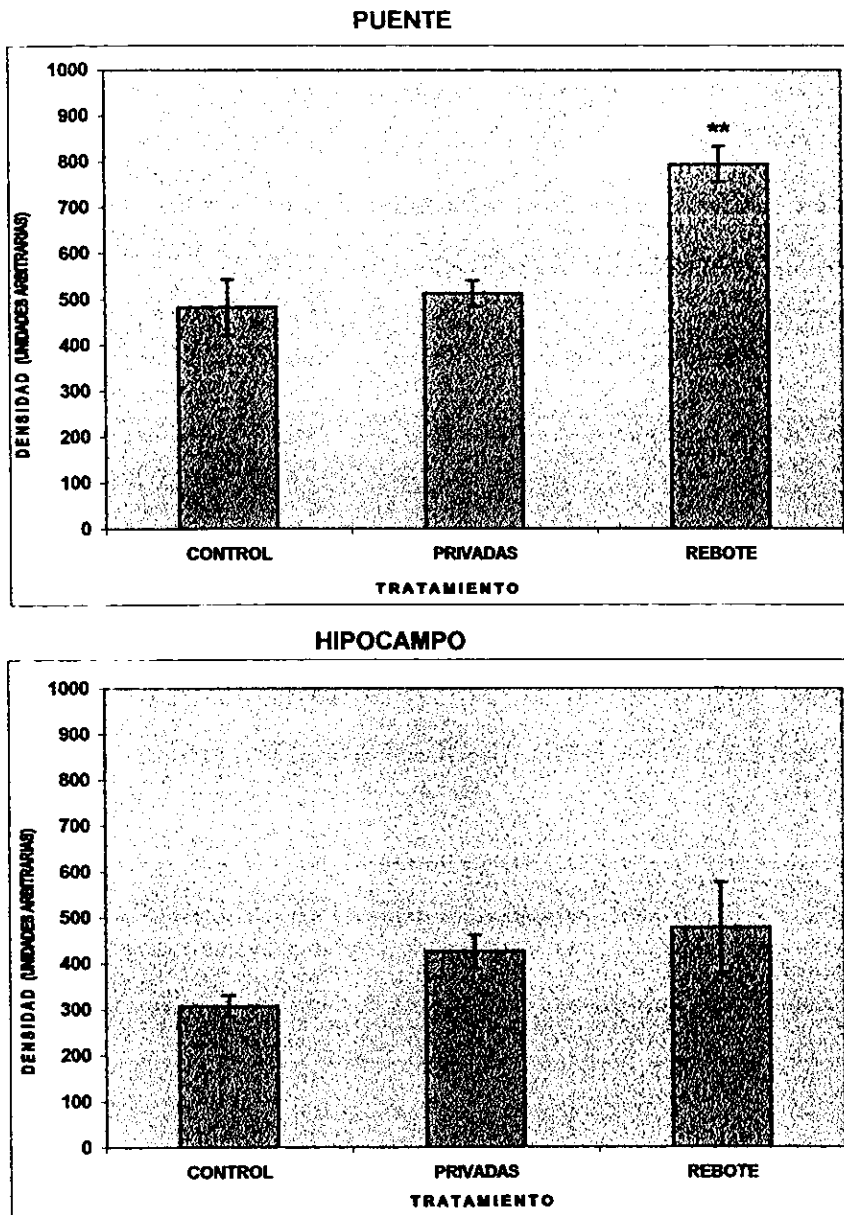


Fig. 5. Intensidades netas del receptor CB1 (promedio +/- error estándar) en puente e hipocampo de ratas controles, privadas de sueño total por 12 horas y ratas con rebote de dos horas.  
 Tipo de prueba estadística: análisis de varianza de un factor, post hoc  
 \*\*  $p < 0.05$ ; comparación de rebote vs control y rebote vs privada.

## VI. DISCUSIÓN

A pesar de que las funciones del sueño son consideradas todavía un misterio, se cree que el sueño MOR, por un lado, favorece el aprendizaje y la memoria, ya que en esta fase consolidamos la información adquirida durante la vigilia (Murillo, 1998). Se ha observado también, que durante el sueño o periodos de descanso, en aves y mamíferos endotérmicos, se disminuye la temperatura, lo cual esta a favor de la conservación de la energía. Entre otras, éstas son razones importantes para la sobrevivencia de los organismos, es por esto que nos interesamos en abordar el amplio estudio del sueño vía factores inductores; en particular estamos analizando el sistema endocanabinoide, ya que se ha comprobado que participa de alguna manera en los estados de vigilancia (Murillo et al., 2000). Estos endocanabinoides (OLE y ANA) se unen a receptores que se localizan principalmente en el cerebro conocidos como CB1; por un lado nos interesamos en analizar si la expresión de dichos receptores a canabinoides presenta una variación diurna en puente e hipocampo de rata.

Por otro lado, nos interesamos en observar, si la expresión de los receptores a canabinoides CB1, tanto en puente como en hipocampo de rata, varía dependiendo de la alteración del ciclo sueño-vigilia. Una manera ampliamente utilizada de analizar este efecto, es alterando dicho ciclo, privando a los sujetos experimentales de sueño total y posteriormente permitiendo que se presente un incremento o rebote de sueño. Así pues nos interesó ver si la privación y rebote de sueño altera la expresión del CB1.

Nuestro estudio lo realizamos en el puente de rata, ya que en esta región del cerebro se localizan núcleos neuronales involucrados en el control de diversas conductas, entre las que se encuentra el ciclo sueño-vigilia. Así mismo, utilizamos el hipocampo, ya que es una de las estructuras en la que se ha reportado que existe mayor cantidad de receptores CB1 (Felder y Glass, 1998), además, de que es un área involucrada de manera importante en la memoria.

En los resultados obtenidos observamos que tanto en puente como en hipocampo se aprecia una expresión diferencial del receptor dependiendo de la hora del día.

La variación que se observa en la expresión de los receptores a canabinoides CB1, se considera variación diurna, más no circádica, en base a que el estudio fue hecho a lo largo de las 24 hrs del día, manteniendo a los animales en un ciclo luz-oscuridad determinado. Para ser considerado circádico se tendría que comprobar que las variaciones no dependen de marcadores externos, es decir, que si se mantienen los sujetos en condiciones de libre corrimiento (luz u oscuridad constantes) las variaciones en la expresión de los receptores se seguirían presentando.



Al analizar densitométricamente las bandas obtenidas, observamos en ambos casos que existe una tendencia de mayor expresión del receptor CB1 en las horas de luz y menor en las horas de oscuridad. Particularmente en el hipocampo es mayor la expresión a las 13:00 hrs. y menor a la 01:00 hrs. sin embargo las diferencias no son estadísticamente significativas.

Recordando que los organismos en los cuales hicimos este estudio son mamíferos nocturnos, es decir su actividad es durante la noche y duermen durante el día; podemos relacionar los resultados en puente con datos previos obtenidos en nuestro grupo, los cuales, muestran que las ratas presentan mayor vigilia a las 21:00 hrs y menor cantidad de sueño MOR y por otro lado, mayor cantidad de sueño MOR a las 13:00 hrs y por consiguiente menos vigilia (Méndez et al., 1999). Lo cual nos podría sugerir una asociación de que a mayor cantidad de la expresión de los receptores a cannabinoides CB1, mayor cantidad de sueño MOR.

Los resultados obtenidos en hipocampo (mayor expresión del CB1 a las 13:00 hrs y mínima a la 01:00hrs), lo podemos relacionar con observaciones hechas en nuestro grupo, que indican que hay mayor eficiencia en la resolución de tareas que involucran memoria espacial en ratas, a las 01:00 hrs (Méndez et al., 1999), lo cual se asocia a una menor expresión de receptores CB1.

Con respecto a los resultados obtenidos mediante la privación de sueño total y rebote, observamos una mayor expresión inmunoreactiva del receptor CB1 en el rebote, tanto en puente como en hipocampo; esto sugiere que cuando la rata entra a la fase de sueño se acumula el receptor, lo cual se correlaciona con los datos obtenidos de la expresión diurna del receptor donde observamos que hay mayor expresión, cuando la rata esta dormida que cuando esta despierta. Nuestros resultados muestran lo contrario a lo que esperábamos, es decir, que hubiera mayor expresión durante la privación y disminuyera al dejarla dormir, lo que nos sugeriría que hay un rebote en la expresión de los receptores.

Los resultados obtenidos de la variación diurna para puente e hipocampo, no muestran diferencias estadísticamente significativas, lo que podríamos atribuir a que las condiciones experimentales a las que se somete la rata, no son lo suficientemente extremas para poder registrar variaciones en la expresión del receptor CB1; o bien debido a que los cambios en la concentración que presenta este receptor son mínimos, que no podemos apreciarlos.

Sin embargo, en los experimentos de ratas con privación total y con rebote, se observa un incremento significativo en el caso del puente, lo cual coincide con la acumulación de oleamida en líquido cefalorraquídeo que genera la privación de sueño total (Murillo et al., 2000). Este incremento en CB1, también, coincide con el incremento de SMOR y SOL II que se observa durante el rebote; que como ya señalamos son algunos de los efectos de la ANA (Murillo et al., 1998).

Así pues los resultados obtenidos, hasta el momento, le dan validez a que dichas sustancias (OLE y ANA) sean consideradas como factores inductores de sueño.

## **VII. CONCLUSIONES**

1. La expresión de los receptores a cannabinoides CB1 muestra una tendencia a una variación diurna.
2. La expresión de los receptores a cannabinoides CB1, tiende a ser mayor en las horas de luz que en las horas de oscuridad, tanto para puente como para hipocampo.
3. La privación total de sueño no modifica la densidad de receptores CB1, ni en hipocampo ni en puente.
4. El rebote incrementa la densidad de receptores CB1 en puente.

En base a estos resultados, podríamos concluir, que la fase de oscuridad se asocia con una menor expresión del CB1 y coincide con una mejor ejecución en las tareas que implican memoria espacial y con una mayor presencia de vigilia, por lo que pensamos que el sistema de cannabinoides endógenos está participando en la consolidación de la memoria y en el ciclo sueño-vigilia.

En la fase de luz, la mayor expresión del receptor CB1 sugiere un mayor efecto de Anandamida endógena lo que podría explicar un deterioro en la consolidación de la memoria y el aumento de sueño MOR y SOL 2 (Méndez et al., 1999; Murillo, 1998).

Sin embargo, en los experimentos de ratas con privación total y con rebote, se observa un incremento significativo en el caso del puente, lo cual coincide con la acumulación de oleamida en líquido cefalorraquídeo que genera la privación de sueño total (Murillo et al., 2000). Este incremento en CB1, también, coincide con el incremento de SMOR y SOL II que se observa durante el rebote; que como ya señalamos son algunos de los efectos de la ANA (Murillo et al., 1998).

Así pues los resultados obtenidos, hasta el momento, le dan validez a que dichas sustancias (OLE y ANA) sean consideradas como factores inductores de sueño.

## **VII. CONCLUSIONES**

1. La expresión de los receptores a cannabinoides CB1 muestra una tendencia a una variación diurna.
2. La expresión de los receptores a cannabinoides CB1, tiende a ser mayor en las horas de luz que en las horas de oscuridad, tanto para puente como para hipocampo.
3. La privación total de sueño no modifica la densidad de receptores CB1, ni en hipocampo ni en puente.
4. El rebote incrementa la densidad de receptores CB1 en puente.

En base a estos resultados, podríamos concluir, que la fase de oscuridad se asocia con una menor expresión del CB1 y coincide con una mejor ejecución en las tareas que implican memoria espacial y con una mayor presencia de vigilia, por lo que pensamos que el sistema de cannabinoides endógenos está participando en la consolidación de la memoria y en el ciclo sueño-vigilia.

En la fase de luz, la mayor expresión del receptor CB1 sugiere un mayor efecto de Anandamida endógena lo que podría explicar un deterioro en la consolidación de la memoria y el aumento de sueño MOR y SOL 2 (Méndez et al., 1999; Murillo, 1998).

## VIII. ANEXO

### 1.- Homogenización de muestras

Tejido + 1 ml de buffer A + Cocktail

Buffer A (100ml):

- Sacarosa 320mM                    10.94 gr.
- Tris EDTA 2mM                    1 ml Tris 1M pH 6.8 y 0.4 ml EDTA 0.5 M.
- MgCl<sub>2</sub> 5mM                        0.0476 g

Cocktail de inhibidores de proteasas p/ml de amortiguador

- 1 µl de aprotinina (10 mg/ml) (aprotinina-agua)
- 1 µl de DTT 1M
- 12 µl de PMSF (13.9 mg/ml) (PMSF-isopropanol)

### 2.- Lowry

- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Anhidrido 2% en NaOH 0.1 M o 0.1 N                    .....9.8 ml.
- Tartrato de Na y K (KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> – 4H<sub>2</sub>O 2%)                    .....0.1 ml.
- Sulfato cúprico (CuSO<sub>4</sub>-5H<sub>2</sub>O) 1%                                    .....0.1 ml.
- 1:2 folin-Ciocalteu

### 3.- Gel SDS-PAGE

Agua desionizada

Acilamida 30% BIS 0.8 %

Tris-HCl 1.5 M. PH 8.8

Tris-HCl 1.5 M. PH 6.8

SDS10%

TEMED N'-tetrametil diamino

Persulfato de amonio (10%)

### Amortiguador para proteínas

H<sub>2</sub>O desionizada

Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8

SDS 10%

2β-Mercaptoetanol

Azul de bromofenol

### **Amortiguador para electroforesis de proteínas (5X)**

Tris base	9.0 grs.
Glicina	43.2 grs.
SDS	3.0 grs.

### **4.- Inmunoelectrotransferencia**

#### **Amortiguador de transferencia**

Metanol	20%
Tris	25 mM
Glicina	192 mM

Aforado a un litro con H<sub>2</sub>O desionizada

#### **Amortiguador de bloqueo**

PBS pH 7.4	50.0 ml.
Tween	0.150 ml
(Tween 20, Polioxietileno Sorbitan monolaurato SIGMA)	
Leche 10%	5.0 gr
(leche descremada en polvo Svelty Nestle)	
Suero Normal de Cabra (2%)	

#### **Solución de lavado (PBS-Tween)**

PBS pH 7.4	50.0 ml
Tween 20	0.150 ml

#### **Solución reveladora**

PBS	50 ml
3,3 Diaminobencidina (DAB) (SIGMA)	0.01 gr.
Peróxido de Hidrógeno (MERCK)	5 $\mu$ l

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ameri A. 1999. The effects of endocannabinoids on the brain. *Progress in Neurobiol.* 58: 315-348.
2. Axelrod J y Felder CCh. 1998. Cannabinoid receptors and their endogenous agonist, anandamide. *Neurochemical Research.* 23(5): 575-581.
3. Borbely AA y Tobler I. 1989. Endogenous sleep-promoting substances and sleep regulation. *Physiology Rev.* 69: 605-670.\*\*
4. Borbely AA y Tobler I. 1980. The search for an endogenous "sleep substance" *TIPS.* 1:356-359.\*\*
5. Cassone VN, Speth JC, Card JP y Moore RY. 1988. Comparative anatomy of the mammalian hypothalamic suprachiasmatic nucleus. *J. Bio Rhythms.* 3:71-92.
6. Cravatt BF, Prospéro GO, Gilula N, Henriksen SJ, Boger DL y Lerner RA. 1995. Chemical characterization of a family of brain lipids that induce sleep. *Science.* 268: 1506-1509.
7. Childers SR y Deadwyler SA. 1996. Role of cyclic AMP in the actions of cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.* Sep 27; 52(6):819-827.
8. Delorme F, Jeanneroid M y Jouvet M. 1965. Effects remarquables de la reserpine sur l'active EEG phasique pontogeniculooccipitale. *C.R Soc Biol.* 159:900-903.
9. Devane WA y Axelrod J. 1994. Enzymatic synthesis of anandamide, an endogenous ligand for the cannabinoid receptor, by brain membranes. *Proc. Nat Acad Sci, USA.* 91: 6698-6701.
10. Devane WA, Dysarz FA, Johnson MR, Melvin LS y Howlett AC. 1988. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol.* 34:605-613.
11. Devane WA, Hanus L, Brever AS, Pertwee RG, Stevenson LA, 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.* 258:1946-1949.
12. Díaz M, Dent R, Granados F, Hall, Hernández C, Harrington and Aguilar R. 1999. Circadian modulation of the ryanodine receptor type 2 in the SCN of rodents. *Neuroreport.* 10: 481-486.

13. Egertova M, Giang DK, Cravatt BF y 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.
14. Felder CCh, Nielsen A, Briley EM, Palkovits M, Priller J, Axelrod J, Nguyen DN, Richardson JM, Riggan RM, Koppel GA, Paul SM y 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.
15. Felder CCh y Glass M. 1998. Cannabinoid receptors and their endogenous agonists. *Annu. Rev Pharmacol. Toxicol.* 38:179-200.
16. Glass M, Dragunow M y Faull RLM. 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.
17. Hartmann E. 1968. The 90 minute sleep dream. *Arch Gen Psychiat.* 18:280-286.
18. Hayaishi O. 1990. Prostaglandin D2 and E2 as endogenous regulators of sleep and wakefulness. En: Inoué S. Krueger J.M. eds. Endogenous sleep factors. The Hague. *The Netherlands. SPB Academic Publishing.* pp. 63-68.\*\*
19. 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.
20. Honda K, Naito K, Cómoda Y, Uchizono K y Inoue S. 1990. Further studies on the sleep-promoting substance (SPS) En: Inoué S. Krueger J.M. eds. Endogenous sleep factors. *The Hague. The Netherlands. SPB Academic Publishing bv.* 123-131.\*\*
21. Howlett AC y Fleming RM. 1984. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response of neuroblastoma cell membranes. *Mol. Pharmacol.* 26:532-538.
22. Inoué S. 1989. Biology of sleep substances. Boca Raton, Florida: *CRC Press Inc.*\*\*
23. Johnson MR y Melvin LS. 1986. The discovery of non-classical cannabinoid analgesic. In *Cannabinoids as Therapeutic Agents*, ed. CR Mechoulam, pp 121-145. Boca Raton: CRC.
24. Jouvet A. 1969. Biogenic amines and the states of sleep. *Science* 163:32-41.

25. Kryger Mh, Roth T y Carskadon M. 1994. Circadian Rhythms in Humans. En: Kryger MH, Roth T y Dement W. Principles and practice of sleep medicin. 2a. ed., pag. 305.
26. Lehman MN, Silver R, Gladstone WR, et al. 1987. Circadian rhythmicity restored by neuronal transplant Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *Neuroscience*. 7:1626-1638.
27. Lemer RA, Siuzdak G, Prospero GO, 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.
28. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein M, Young A, y Bonner TI. 1990. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 346:561-564.
29. Maurelli S, Bisogno T, De Petrocellis L, Di Luccia A, Marino G y Di Marzo V. 1995. Two novel classes of neuroactive fatty acid amides are substrates for mouse neuroblastoma "anandamide amidohydrolase". *FEBS Lett*. 377: 82-86.
30. Mechoulam R. 1996. Cannabinoids as therapeutic agents, ed CR. Boca raton: CRC.
31. Mendelson WB y Basile AS. 1999. The hypnotic actions of oleamide are blocked by a cannabinoid receptor antagonist. *Neuroreport*. 10: 3237-3239.
32. Mendéz-Díaz M, Sánchez-Narváez F, Palomero-Rivero M, Navarro L, Drucker-Colin R y Prospero-García O. 1999. Diurnal variations in the election of a strategy to solve a spacial maze. Abstracts Society of Neuroscience 29<sup>th</sup> Annual Meetings. Miami beach, Flor. October 23-28.
33. Moore RY. 1973. Retinohypothalamic projection in mammals: A comparative study. *Brain Res*. 49: 403-409.
34. Moore RY. 1990. The circadian system and sleep – wake behavior. En: Montplaisir J y Godbout R. Sleep and biological rhythms. Basic mechanisms and applications to psychiatry. Oxford University, pag. 4.
35. Murillo Rodríguez E. 1998. Aprendiendo mientras dormimos: el sueño de movimientos oculares rápidos y la memoria. *Psiquis (México)*, 7(5).



36. Murillo-Rodríguez E., García-Sierra Y., Navarro L. y Próspero-García O. 2000 Oleamide and Anandamide modulating sleep via cannabinoid receptor. *APSS Ann Meeting*, p47.
37. 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.
38. Prospero García O, Murillo Rodríguez E, Jiménez Anguiano A, Navarro L, Sánchez Alavéz M, Gómez M, Martínez González D, Palomero M y 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.
39. Próspero-García O, Jiménez Anguiano A, Drucker-Colin R. 1990. Factores Inductores de sueño. En: Buela-Casal G. Navarro-Humanes JF. Eds. Avances en la investigación del sueño. Madrid España. Siglo XXI de España Editores S.A. pp. 105-126.\*\*
40. Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M. 1990. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*. 247:975-978.
41. Retschaffen A y Kales A. 1968. A manual of standardized terminology techniques and scoring system for sleep stages of human subjects. *Bis/Bri, UCLA*, Los Angeles, CA.
42. Rusak B, Groos G. 1982. Supraquiasmatic stimulation phase shifts rodent circadian rhythms. *Science*. 215:1407-1409.
43. Rusak B. 1980. Vertebrate behavioral rhythms. In Aschoff J (ed): *Handbook of behavioral Neurobiology*. Vol 4. Biological Rhythms. New York, Plenum. pp 182-214.
44. Shire D, Carillo C, Kaghad M, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le-fur GH, Caput D y Ferrara P. 1995. An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. *J Biol Chem*. 270: 3726-3731.
45. Stella N, Schweitzer P y Piomelli D. 1997. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*. 388.
46. Tapia-Conyer R, Medina-Mora ME, Sepulveda J, De la Fuente R y Kumate J. 1990. The national addictions survey of Mexico. *Salud Publica Mex.*, Sep-Oct; 32(5):507-522.

47. Thomas EA, Cravatt BF y Sutcliffe G. 1999. The endogenous lipid Oleamide activates serotonin 5-HT<sub>7</sub> neurons in mouse thalamus and hypothalamus. *J. Neurochem.* 72: 2370-2378.
48. Thomas EA, Cravatt BF, Danielson PE, Gilula NB y Sutcliffe G. 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.* 50: 1047-1052.
49. Thomas F, Lumir O, Hanus HM, Fales S, y Anthony S Basile. 1999. A Gas Chromatographic Mass Spectral Assay for the Quantitative Determination of Oleamide in Biological Fluids. *Analytical Biochemistry.* 270:159-166.
50. Towbin H, Stachelin T y Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology.* 1992 (24):145-149.
51. Wang PC, Buu NT y 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.*
52. Wartmann M, campbell D, Subramanian A, Burstein SH y Davis RJ. 1995. The map kinase signal transduction pathway is activated by the endogenous cannabinoid anandamide. *FEBS lett.* Feb 13; 359 (2-3):133-136.
53. Zias J, Stark H, Seligman J, Levy R, Werker E, Breuer A y Mechoulam R. 1993. Early medical use of cannabis. *Nature.* 363: 215-216.