

6 11282



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**PAPEL DE LOS LÍPIDOS CEREBRALES: ÁCIDO
ARAQUIDÓNICO, ANANDAMIDA Y OLEAMIDA SOBRE
EL CICLO SUEÑO-VIGILIA DE LA RATA.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS
PRESENTA EL LICENCIADO EN PSICOLOGÍA
ERIC SIMÓN MURILLO RODRÍGUEZ

291782

Director de Tesis: Dr. Oscar Próspero García

MEXICO, D.F.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Neuroinfecciones del Grupo de Neurociencias/Depto. de Fisiología de la U.N.A.M., con apoyo de beca de Doctorado otorgada por CONACYT y DGEP.

AGRADECIMIENTOS.

Quiero agradecer al Dr. Alejandro Craviotto, Director de la Facultad de Medicina; Dr. Enrique Gijón, Jefe del Depto. de Fisiología de la Facultad de Medicina y al Dr. Oscar Próspero García, Jefe del Laboratorio de Neuroinfecciones/Grupo de Neurociencias, por todo el apoyo brindado durante mi Doctorado y de este modo, hacer realidad el presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y a la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) por el apoyo económico brindado durante mi Doctorado; también agradezco al Programa de Apoyo a Estudios de Posgrado (PAEP) por los apoyos recibidos y hacer posible la presentación de los resultados de mi trabajo en congresos nacionales e internacionales. Un profundo agradecimiento a La Dirección General de Intercambio Académico (Lic. Etele Villanueva y a Héctor Saucedo) quien logró que se llevara a cabo mi estancia de investigación en University of California, Irvine.

Entre las principales personas a las que les quiero agradecer su apoyo es al Dr. Oscar Próspero: Gracias Oscar por darme la oportunidad de integrarme a tu laboratorio y compartir conmigo la magia de la ciencia, por enseñarme que si no hay una conducta que describir, ¿¿entonces que???. Gracias por tu apoyo, comprensión y por ser un gran amigo; por los seminarios de preparación para ingresar al Doctorado; por esas asesorías para las presentaciones de trabajos en congresos nacionales e internacionales (por la paciencia ante mis escritos sin doble espacio). Por todo ese tiempo invertido (¡y soportado!) durante los tutoriales; por los ensayos para el Examen de Candidatura y cada una de esas oportunidades que me brindaste al acercarme y preguntarte mil cosas. Gracias Oscar por esas pláticas tan agradables, siempre buscando mi superación, gracias por todo; ¡¡Gracias a mi maestro, a mi gurú!!

Al: Dr. René Drucker-Colín, Sra. Alicia Mondragón, Tere Martínez, Raúl Ramírez (Coordinación para la Investigación Científica). Al grupo de la administración del Depto. de Fisiología; gracias a Manuel Zárate por el cuidado de mis animales (¡y de los gatos!), Dr. Salin Pascual, Carlos Blanco (Harvard University), Dra. Leticia Verdugo, Dr. Fabio García, Dolores Martínez y Dr. Rubén Guzmán. Mil gracias a Tere Torres por su apoyo incondicional a la hora de llenar formas y teclear mil papeles (¡¡especialmente los de reingreso y reportes del CONACyT!!), Marcela Palomero (¡¡gracias por la ayuda en las perfusiones e inmunohistoquímicas que llegamos a realizar!), Fernando Carbajal (¡por las charlas tan amenas antes de mis registros en las mañanas!), Dr. Mihailescu, Dr. Gabriel Roldán, Dra. Laura Escobar, Dr. Roberto Prado (ahora en el Centro de Neurobiología), Dr. David García, Mary y Yola.

A mis queridísimos amigos "*Los cuatro fantásticos más uno*" de "*El laboratorio de los miserables*": Dr. Oscar Próspero, Dra. Luz Navarro (¡¡mil gracias por las revisiones de estadística a mis datos!!), Dr. Manuel Sánchez (ahora en The Scripps Research Institute, gracias por las asesorías en la prevención pasiva). También agradezco a mis compañeros de lab: Oscar Galicia, Marina Martínez, Marina Cisneros, Mónica Méndez y Margarita Gómez

Quisiera hacer un sincero agradecimiento a los miembros de mi comité tutorial, quienes semestre a semestre, me sometieron la más justa y exigente evaluación buscando mi superación: Dra. Ana María López Colomé, Dr. Javier Velázquez y a mi amigo Oscar Próspero. Y en este ámbito de ideas, quisiera exteriorizar mi más profundo agradecimiento a los miembros del jurado de mi Examen de Candidatura:

Primera vuelta: Dr. Federico Bermúdez, Dr. José María Calvo, Dr. Cerbon Dr. León Cintra, Dr. Alfonso Escobar, Dr. Arturo Hernández y Dr. Javier Velázquez.

Segunda vuelta: Dr. Federico Bermúdez, Dr. León Cintra, Dra. María Corsi, Dr. Alfonso Escobar, Dra. Magda Giordano, Dr. Roberto Prado y Dr. Javier Velázquez; gracias por su exigencia, ya que con ésta, me obligaron a ser mejor cada día.

Gracias a Eva por la paciencia en cada momento de reinscripciones y de entrega de reportes del CONACyT y DGEP así como a todas las personas de la parte administrativa del Doctorado en Ciencias Biomédicas.

Aprovecho la ocasión para enviar un agradecimiento al Dr. Javier Velázquez y a todos sus colaboradores en la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, en especial a la Dra. Anabel Jiménez, por el apoyo que nos brindaron durante nuestro "exilio académico".

En la Facultad de Medicina, un sincero reconocimiento por su apoyo a: M.V.Z. Pinzón y a sus colaboradores en el Bioterio general, por los animales brindados para la realización de mi proyecto; Claudia Gómez (Depto. de Farmacología), por su asesoría con las pruebas de nocicepción; Dra. Astrid Posadas (Depto. de Farmacología); Dr. Abraham Landa (Depto. de Microbiología); Ing. Martín Galván por su ayuda técnica con los equipos de computación y a todo el personal de la Hemerobiblioteca.

En el Centro de Neurobiología quisiera agradecer al Dr. León Cintra y a Pilar Durán por su apoyo (¡¡mil gracias mi querida Pili!!); saludos a Juan Mena y a la Dra. Magda Giordano.

En la Facultad de Psicología, al Mtro. Fernando Vázquez y a la Dra. Graciela Rodríguez, por su contribución a mejorar mi formación académica.

En el Instituto de Fisiología Celular, al M.V.Z. Héctor Malagón por el cuidado y asesoría en el manejo de los gatos.

En el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias a la Dr. Sonia Meza y en el Hospital ABC al Dr. Juan Salas.

En la clínica de sueño así como en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, agradezco el apoyo del Dr. Reyes Haro y a todos sus colaboradores.

Gracias a mis amigos internacionales: Dr. Salvador Huitrón (The Scripps Research Institute, por darme "asilo político" en cada uno de los congresos en E.U.A.); MS. Ana Gerlin Hernández (University of London, UK); Dr. Renee Bowl (University of Uppsala, Sweden; thanx man 4 the beers!!); Dr. Daniele Piomelli y Dr. Andrea Giuffrida, *grazie per tutto il vostro aiuto* (University of California, Irvine); Dr. Akira Terao (Stanford University); Dr. Paul Franken (Institute of Neurosciences, USA); Mitchel Mulder (Francia); Ger Stokkers (Noruega); Mons Verhuysen (Dinamarca); Greta Labrada Lara (España); Scott van Leeuwen (Holanda); Gerasimos Grammatikopoulos "Makis" (Italia); Dr. Fernando Rodríguez de Fonseca (España); Dr. Markus Leweke (Alemania); Dr. Felice Nava (Italia); Dr. Priyattam Shiromani (Harvard University).

Quisiera hacer mención de mis amigos en University of California, Irvine: Dr. Daniele Piomelli, Dr. Andrea Giuffrida, Dr. Frank Desarnaud (Merci pour le support), Dra. Cristina Sánchez, Dr. Fernando Valiño (gracias por su amistad), Dra. Jin Fu, Thien Dhin y a los excelentes técnicos Schenley Schen y Satish Katuria. Gracias a Carolyn LaFerla por la ayuda en todos los trámites así como a Joe Sandoval por los animales proporcionados para los experimentos que realicé durante mi estancia.

Este trabajo lo dedico a la Universidad Nacional Autónoma de México, quien desde hace mucho tiempo me acobijó con su sabiduría y quien, durante todo este tiempo, ha sido mi casa. También quiero dedicar este trabajo al Laboratorio de Neuroinfecciones, porque en él aprendí muchas cosas y porqué de él, me llevo muy gratos recuerdos.

Quisiera ofrecer este trabajo a los Ancestros: Cthulu, Tiamat, Absu y a los Gigantes de Gas del Universo, quienes mueven al cosmos con su magia y misterio, quienes nos observan desde las estrellas...

Termino esta larga lista de agradecimiento, mencionando a mis eternos amigos: Fernando Pérez Castillo y familia Pérez (¡saludos a mi "sobrina" María Fernanda!), Juan Carlos Rosales Ortuño y a su familia (¡saludos a Estela y a tus hijos!), Octavio Salinas Ortiz y familia Salinas y, Edgar Vázquez Luis y familia Vázquez. Gracias por ser mis compañeros en mis alegrías y tristezas y por compartir cada pensamiento, idea e ilusión a lo largo de este viaje llamado vida. Este no es más que un simple "pretexto" para demostrar "cómo las lagartijas se pueden convertir en Godzillas", es cuestión de ¡ACTITUD! mi querido Rodrigo. Te deseo mucha suerte.

Un Sincero agradecimiento a los Miembros del Jurado:

- 1.- Dr. Roberto Prado Alcalá.
- 2.- Dr. Oscar Próspero García.
- 3.- Dr. Raúl Aguilar Roblero.
- 4.- Dr. Stephan Mihailescu.
- 5.- Dr. Gabriel Roldán Roldán.
- 6.- Dr. Javier Velázquez Moctezuma.
- 7.- Dra. Matilde Valencia Flores.

A mis padres: Marisela y Luis Mario; quienes a lo largo de mi vida me han ofrecido lo más valioso que uno puede pedir: Cariño. Por su apoyo en cada momento, por su comprensión, y por estar conmigo en cada día. Gracias por inculcar en mí, ese sentimiento de superación, gracias por sembrar en mí la semilla de la tenacidad, ¡Gracias!.

A mi hermana: Linda, quien me ha acompañado durante mi vida y ha hecho divertido cada momento que hemos compartimos. Porque he visto en ella una gran amiga ya que cuando la he necesitado, he corrido tras su ayuda, ¡Gracias!.

Quiero dedicar este trabajo a Rosa García Vda. de Rodríguez (25-08-93 +) *Dominus vobiscum et cum spiritu tuo*, por haber hecho agradable mi infancia y mi adolescencia, por esos consejos que han formado parte importante de mi vida y porque sé que te hubiera gustado mucho leer esto.

Dedico este trabajo, con su largo camino recorrido lleno de alegrías, un trabajo con sacrificios y con grandes momentos de esfuerzos, lo más importante que he hecho los últimos años con todo mi corazón al amor de mi vida, a mi esposa Yunuén.

En esta mañana, antes de que el sol iluminara el horizonte. sali a buscar lo mejor del mundo para dártelo a ti. En mi largo camino, me encontré con enormes mares y océanos teñidos de azul; en ellos, había miles de peces de colores que junto con el sol radiante en lo alto del cielo, decoraba todo ese paraíso. y pensé en ti.

Después, encontré gigantescas montañas cubiertas por helados mantos blancos y rodeadas por flores de todos los colores; allí podía yo escuchar el eco de mi voz que se perdía buscándote para que escucharas tu nombre mil veces.

Cuando el viento frío me perseguía, la noche me atrapó; pude observar como en el cielo miles de estrellas brillaban con todas sus fuerzas y acompañaban a la Luna en su paseo por la oscuridad y, pensé en ti.

En la tarde, una tormenta desató su furia sobre mí; me maravilló con las gotas que caían de los cielos y junto con los relámpagos y truenos, pude apreciar toda esa armonía y pensé en ti.

Cuando los rayos del sol acariciaron mi rostro, me senté en un enorme valle y viajando en una nube pude observar todas y cada una de las maravillas que había encontrado. Allí finalizó mi búsqueda, me di cuenta que podía haber regresado con océanos, montañas, con lluvia y estrellas; pero decidí dejar todo en su lugar y regresar para admirarlo junto a ti.

Yunuén, quien iluminó mi vida enseñándome que juntos podemos disfrutar de todas las cosas bellas que nos ofrece la vida; gracias por estar junto a mí, gracias por esos momentos tan especiales que los llevo en mi corazón. Gracias por esas noches juntos, abrazados mientras nos iluminaba la Luna y que ahora son recuerdos que guardo en mi alma. Gracias por contemplar las estrellas a mi lado, por los sueños e ilusiones que hemos construido, gracias por ser mi Venus, gracias por esa inspiración que me hace ser un mejor hombre cada día. Te amo.

“Rendido de cansancio el Poeta, poco antes de amanecer, queda dormido y tiene durante el sueño una visión misteriosa; después de la cual se despierta, y se halla a la puerta del Purgatorio con Virgilio, que le refiere cómo ha sido trasladado allí. Acércanse enseguida a la puerta, custodiada por un ángel, que a los humildes ruegos de Dante, después de trazarle siete P sobre la frente, y de hacerle algunas advertencias, la abre, y entran ambos en el Purgatorio.”

Fragmento de La Divina Comedia.
Canto Nono. El Purgatorio.

ÍNDICE

	<u>Página</u>
ABREVIATURAS	12
I. RESUMEN	14
1.1 ABSTRACT	18
II. INTRODUCCIÓN	20
III. ESTADOS DE VIGILANCIA	24
3.1 VIGILIA	24
3.1.1 CARACTERÍSTICAS CONDUCTUALES	24
3.1.2 CARACTERÍSTICAS ELECTROGRÁFICAS	24
3.1.3 FISIOLÓGÍA.....	24
3.1.4 BIOQUÍMICA	26
3.2 SUEÑO DE ONDAS LENTAS	28
3.2.1 CARACTERÍSTICAS CONDUCTUALES	28
3.2.2 CARACTERÍSTICAS ELECTROGRÁFICAS	28
3.2.3 FISIOLÓGÍA.....	28
3.2.4 BIOQUÍMICA	29
3.3 SUEÑO DE MOVIMIENTOS OCULARES RÁPIDOS	31
3.3.1 CARACTERÍSTICAS CONDUCTUALES	31
3.3.2 CARACTERÍSTICAS ELECTROGRÁFICAS	31
3.3.3 EVENTOS TÓNICOS.....	32
3.3.4 EVENTOS FÁSICOS.....	33
3.3.5 FISIOLÓGÍA.....	34
3.3.6 BIOQUÍMICA	35
3.4 FACTORES INDUCTORES DE SUEÑO.....	37
IV. CANABINOIDES	38
4.1 RECEPTORES A CANABINOIDES	39
4.2 ENDOCANABINOIDES.....	43
4.3 ÁCIDO ARAQUIDÓNICO.....	45

4.4	ARACHIDONILETANOLAMIDA (ANANDAMIDA).....	46
4.5	CIS-9, 10-OCTADECENOAMIDA (OLEAMIDA).....	51
4.6	ENZIMAS INTRACELULARES ACTIVADAS POR RECEPTORES A CANABINOIDES.....	53
V.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	58
5.1	HIPÓTESIS.....	53
5.2	OBJETIVOS.....	53
VI.	MÉTODO.....	61
6.1	MATERIALES.....	61
6.2	PROCEDIMIENTO.....	61
6.3	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	64
VII.	RESULTADOS.....	65
7.1	ADMINISTRACIONES INTRACEREBROVENTRÍCULARES.....	65
7.2	ADMINISTRACIONES EN EL NÚCLEO PEDUNCULOPONTINO TEGMENTAL.....	78
VIII.	DISCUSIÓN.....	83
IX.	CONCLUSIONES.....	95
X.	FUTURAS PERSPECTIVAS.....	96
XI.	REFERENCIAS.....	98
XII.	ARTÍCULO ANEXO Y TRABAJOS EN CONGRESOS.....	109

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN ESTE TEXTO.

2-AG	2-araquidonoylglicerol
5-HT	Serotonina
AA	Ácido araquidónico
AC	Adenilil ciclasa
ACh	Acetilcolina
AMPc	Adenosin-monofosfato ciclico
ANA	Anandamida
ANOVA	Análisis de varianza
CB ₁	Receptor central para cannabinoides
CB ₂	Receptor periférico para cannabinoides
Ca ²⁺	Calcio
Cl ⁻	Cloro
CST	Cortistatina
DA	Dopamina
DAG	1,2-diacilglicerol
EEG	Electroencefalograma
EMG	Electromiograma
EOG	Electrooculograma
FAAH	Fatty acid amide hydrolase
FTG	Campo tegmental giganteocelular
FR	Formación reticular
GABA	Ácido γ-aminobutírico
HA	Histamina
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hz	Hertz
icv	Intracerebroventricular
InsP ₃	Inositol-1,4,5-trifosfato
ip	Intraperitoneal
K ⁺	Potasio
LC	Locus coeruleus
LCR	Líquido cefalorraquídeo
MAPK	Proteína cinasa dependiente de mitógenos
NDGA	(1,4-bis[3,4-dihydroxyphenyl]-2,3-dimethylbutane)
NMC	Núcleo magnoelularis
NMDA	N-methyl-D-aspartato
NPM	Núcleo paramediano
NR	Núcleo del rafé
OLE	Oleamida
PG	Proteínas G
PGI ₂	Prostaglandina D ₂
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PG _i	Proteínas G inhibitorias

PGO	Ondas ponto-geniculo-occipitales
PKC	Proteína cinasa C
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
PPT/LDT	Núcleos pedunculopontino y laterodorsal tegmental
PPTg	Núcleo pedunculopontino tegmental
PTX	Toxina pertusis
RE	Retículo endoplasmático
SMOR	Sueño de Movimientos Oculares Rápidos
SNC	Sistema Nervioso Central
SOL1	Sueño de Ondas Lentas 1
SOL2	Sueño de Ondas Lentas 2
SR141716A	[N-(piperidine-1-yl)-s-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide hydrochloride]
SRAA	Sistema Reticular Activador Ascendente
U73122	1-[6-[[[(17β)-3-Methoxyestra-1,3,5 (10)-trien-17-yl]amino]hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione
VIG	Vigilia
VIP	Polipéptido Vasoactivo Intestinal
VLD	Ventrículo lateral crecho
Δ ⁹ -THC	Delta9-tetrahidrocanabinol
Θ	Theta
μg	Microgramos
μl	Microlitros
μv	Microvolts

I.- RESUMEN.

Una de las funciones que son controladas por el sistema nervioso central (SNC), es el ciclo sueño-vigilia. Se sabe, por reportes publicados, que existen sustratos neuroanatómicos muy bien identificados como los responsables de la generación de los estados de vigilancia (Jones, 1991). Por ejemplo, el tálamo (Huegenard, 1998) y los núcleos pedunculopontinos tegmental y laterodorsal tegmental (PPT/LDT) (Kayama y cols., 1992) entre otros.

Por otro lado, bioquímicamente se ha demostrado que son diversas las moléculas involucradas en el disparo y mantenimiento de los estados de vigilancia (Inoué y cols., 1999). Entre la gran variedad de moléculas que se han sugerido que participan en la génesis del sueño, se encuentran los neurotransmisores como la acetilcolina (ACh) (Mazzuchelli-O'Flaherty y cols., 1967) y la serotonina (5-HT) (Pontas y McCarley, 1994); aminoácidos como el glutamato (Kodama y cols., 1998) y el ácido γ -aminobutírico (GABA) (Nitz y Siegel, 1997); péptidos como el polipéptido vasoactivo intestinal (VIP) (Prospéro-García y cols., 1986; Jiménez-Anguiano y cols., 1993) y recientemente se ha descrito que determinados lípidos pueden modular el ciclo sueño-vigilia (García-García y Drucker-Colín, 1999).

En este último punto, existen pocos experimentos que señalen el papel modulatorio de los lípidos sobre diversas conductas. Podemos citar el caso de las prostaglandinas que favorecen el aprendizaje (Clements, 1995; Clements y Rose, 1996). Por otro lado, éstas mismas moléculas, las prostaglandinas tipo E₂ (PGE₂) inducen la vigilia, mientras las tipo D₂ (PGD₂) se han relacionado con la aparición del sueño de ondas lentas (Onué y cols., 1988; Hayaishi, 1991; Gerozissis y cols., 1995; Ram y cols., 1997).

Las prostaglandinas son metabolitos del ácido araquidónico (AA) (Needlman y cols., 1986), sin embargo, recientemente se ha descrito que otra molécula se deriva del AA conocida como anandamida (ANA), siendo el ligando endógeno para los receptores a la marihuana (Devane y cols., 1992). Se ha reportado que la administración sistémica de este lípido ocasionan una serie de efectos farmacológicos, conductuales y moleculares muy

similares a los producidos por la marihuana (Fride y Mechoulam, 1993; Stein y cols., 1996; Mechoulam y cols., 1997; Di Marzo y cols., 1998).

Existen otros lípidos de los cuales se sabe muy poco sobre sus efectos en el SNC debido a su reciente descubrimiento y caracterización. Este es el caso de una molécula obtenida en el líquido cefalorraquídeo (L.C.R) de gatos privados de sueño (Lerner y cols., 1994); este lípido fue llamado *cis*-9, 10-octadecenoamida u oleamida (OLE) (Cravatt y cols., 1995). Se ha señalado que OLE puede ocasionar un déficit en el sistema inmune (Langstein y cols., 1996), que incrementa las corrientes de Cloro (Cl⁻) a través de los receptores a GABA (Lees y cols., 1998; Yost y cols., 1998) e induce la expresión de *c-fos* en tálamo (Thomas y cols., 1999).

Farmacológicamente hablando, en nuestro laboratorio hemos encontrado que la administración sistémica de OLE decremента la conducta motora, induce analgesia y provoca un deterioro del aprendizaje (Murillo-Rodríguez y cols., 1998a). Estos efectos son muy semejantes a los ocasionados por la marihuana.

El grupo de Kendall ha demostrado que OLE se une al receptor para cannabinoides llamado CB₁ (Cheer y cols., 1999), por lo que se ha propuesto que este es un sistema que comparte con ANA para llevar a cabo sus efectos. Experimentos recientes han demostrado que el bloqueo del receptor CB₁ mediante un antagonista, revierte el efecto inducido tanto por ANA como por OLE (Bisogno y cols., 1998; Mallet y Beninger, 1998), fortaleciendo entonces la hipótesis de que ANA y OLE actúan a través del receptor CB₁.

A pesar de que se cuenta con evidencia experimental sobre los efectos tanto moleculares como conductuales que inducen el AA, ANA y OLE, se desconoce el papel modulador de estas moléculas sobre los niveles de alerta, en especial sobre el ciclo sueño-vigilia. Además, no se sabe si las posibles modificaciones que ocasionen en el ciclo sueño-vigilia son mediadas a través del sistema CB₁. Por tal motivo, la hipótesis principal de nuestra investigación fue determinar si el AA, ANA y OLE pueden modificar la

arquitectura del ciclo sueño-vigilia y si estas alteraciones pueden ser revertidas empleando un antagonista selectivo del CB_1 . Asimismo, evaluamos si estas moléculas favorecen la actividad de otros elementos intracelulares como ciertas fosfolipasas que parecen ser elementos necesarios para que AA, ANA y OLE ejerzan sus efectos sobre los estados de vigiliencia.

A partir de los resultados que hemos obtenido, podemos sugerir que:

1.- Se presentan alteraciones en el ciclo sueño-vigilia ocasionadas por la administración intracerebroventricular (icv) del AA ocasionando un incremento en la Vigilia (VIG) y disminuyendo el Sueño de Ondas Lentas 2 (SOL 2); mientras que la administración de ANA disminuye la VIG e incrementa el SOL2 así como el Sueño de Movimientos Oculares Rápidos (SMOR). OLE ocasionó cambios significativos en la arquitectura del sueño; a dosis elevadas encontramos que decremента la VIG y el SMOR, mientras incrementa el Sueño de Ondas Lentas 1 (SOL 1) y SOL2.

Al trabajar con el [N-(piperidine-1-yl)-s-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide hydrochloride] referido como SR141716A, antagonista del receptor CB_1 , encontramos que este no modifica la arquitectura del ciclo sueño vigilia. Cuando administramos el SR141716A 15 minutos (min.) antes de AA, ANA y OLE, los efectos ocasionados por estos lípidos fueron bloqueados.

2.- Tratando de determinar las posibles vías intracelulares por las cuales los lípidos inducen los cambios en el ciclo sueño-vigilia, evaluamos si la inhibición de la actividad de la fosfolipasa A_2 (PLA₂) y de la fosfolipasa C (PLC) podrían bloquear los efectos descritos por AA, ANA y OLE. El inhibidor de la PLA₂, el ácido nordihidroguaiarético (1,4-bis[3,4-dihydroxyphenyl]-2,3-dimethylbutane) que será referido como NDGA y de la PLC, el 1-[6-[[[(17 β)-3-Methoxyestra-1,3,5 (10)-trien-17-yl]amino]hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione, al cual referiremos como U73122, no modificaron los estados de vigiliencia *per se*. Sin embargo, su microinyección 15 min. antes de la administración de AA, ANA y OLE logran prevenir los cambios inducidos por estos ligandos.

3.- Finalmente, en los experimentos en donde los lípidos fueron administrados en el núcleo tegmental pedunculopontino (PPTg), encontramos que únicamente ANA modificó el ciclo sueño-vigilia: un incremento del SOL2 y del SMOR a expensas de una disminución del SOL1 y de la VIG. Al administrar el SRI41716A observamos que los efectos son bloqueados al igual que al trabajar con el NDGA y el U73122.

Con la evidencia hasta el momento mostrada, podemos aceptar la hipótesis planteada, señalando que el AA, ANA y OLE modifican la arquitectura del sueño y, que estas alteraciones pueden ser bloqueadas empleando el antagonista del receptor CB₁. Además, los resultados sugieren que sustratos intracelulares como la PLA₂ y la PLC podrían estar participando en los efectos inducidos por estos lípidos.

En el caso de las administraciones en PPTg, ANA modificó el ciclo sueño-vigilia indicando un efecto diferencial y, que este efecto es bloqueado por los fármacos mencionados anteriormente. De tal modo que podemos suponer que los receptores localizados en puente, una vez que son activados por el ligando natural ANA, inducen una expresión mayor del SMOR.

Finalmente, los datos sugieren que existe un sistema canabinoide, éste involucra al receptor CB₁ y a determinadas enzimas como la PLA₂ y la PLC, y estos elementos son parte de la cascada de señales intracelulares para que este sistema module el ciclo sueño-vigilia. Esta es la primera vez que se demuestra que moléculas endógenas, propiamente endocannabinoides, pueden modular el sueño y que requieren de la actividad de la PLA₂ y PLC para llevar a cabo sus efectos.

Con los resultados de la presente investigación, se avanza sin duda en una área fascinante, en donde, probablemente los endocannabinoides sean elementos fundamentales en la bioquímica del sueño.

1.1 ABSTRACT.

There is a very extended list showing the existence of molecules with sleep-inducing properties. We know the role of classical neurotransmitters in sleep control such as serotonin, acetylcholine, GABA, etc. There is evidence suggesting the effects of peptides on sleep-waking cycle and very recently, the potential role of lipids on the control of this behavior. Arachidonic acid (AA) is one of the most important lipids in cellular membrane and it synthesizes diverse molecules such as prostaglandins, leukotrienes and very recently described anandamide (ANA). ANA is the endogenous cannabinoid ligand for the CB₁ cannabinoid receptor, and shares pharmacological effects caused by marijuana. Moreover there is no data about the effect of ANA on sleep.

On the other hand, a lipid was contained in cerebrospinal fluid from sleep-deprived cats named oleamide (OLE) has been described. OLE presents similar pharmacological effects to marijuana in diverse behaviors tested such as hipolocomotion, analgesia, hypothermia, etc. So, it could be that OLE causes these effects through the CB₁ cannabinoid receptors.

Since diverse groups have shown that effects caused by ANA and OLE are blocked by SR141716A, an antagonist for the CB₁ cannabinoid receptor.

In base of these facts, the main goal of our study was analyze the role of these lipids on sleep-waking cycle and if these alterations could be blocked by SR141716A. Since there is no evidence showing the potential role of these molecules in sleep modulation.

We found that icv administration of AA, ANA and OLE modified the sleep-waking cycle. AA increases Wakefulness (W) and decreases Slow Wave Sleep 2 (SWS2). ANA decreases W and increases SWS2 as well as Rapid Eye Movement Sleep (REMS). Finally, OLE causes a diminution in W as well as REMS and enhances Slow Wave Sleep 1 and SW2. All this alterations were blocked by SR141716A and by U73122 (a phospholipase C inhibitor) as well as by NDGA (a phospholipase A₂ inhibitor).

Administration of these molecules into pedunclopontine tegmental nucleus (PPTg) did not induce any change in sleep phases an exception of ANA, which caused a similar effect that after icv administration. The effects caused by ANA after its administration into PPTg were blocked by SR141716A, U73122 and NDGA indicating that ANA acts on the CB₁ cannabinoid receptor and the activation of this receptor requires of the activity of the PLC and the PLA₂ as necessary elements in the intracellular signaling.

All these data indicate that AA, ANA and OLE are lipids with biological properties modulating sleep-waking cycle. ANA and OLE alter sleep phases because they are activating the CB₁ cannabinoid receptor. So, we conclude that endocannabinoids are modulating sleep-waking cycle and they could be participating such as biochemical elements for the sleep generation.

II.- INTRODUCCIÓN:

Generalidades del ciclo sueño-vigilia.

Durante mucho tiempo el fenómeno del dormir ha inquietado a la humanidad y con esto, ha motivado una búsqueda de la función de este fenómeno. Se han formulado impresionantes relatos, en los cuales, se les ha asignado a los sueños un carácter premonitorio. Por ejemplo, en el Evangelio según San Lucas, dice que cuando José es advertido por un Ángel para huir de Judea, este mensaje sucede durante un sueño (Nuevo Testamento, 1979). O bien, como se narra en el canto decimonoveno de El Purgatorio en el clásico *La Divina Comedia*: *"Describe la misteriosa visión que poco antes de amanecer y durante su sueño tuvo Dante. Suben los Poetas al quinto círculo, donde tendidas en el suelo y con las caras vueltas hacia la tierra, lloran su pecado las almas de los avaros. Encuentran a Adriano V de la casa de Fieschi, que responde a las preguntas que Alighieri le hace."* (Los Clásicos, 1976).

Sin embargo, las explicaciones que han sugerido cual es la función de los sueños han ido cambiando conforme avanza el conocimiento científico. Un ejemplo de ello es que a principios del siglo XX, surgió la Teoría de la Interpretación de los Sueños, postulada por Sigmund Freud. En esta teoría, el autor sugirió que el papel de los sueños era la expresión de deseos, por lo que eran indicadores del contenido del inconsciente (Freud, 1943). De esta forma, para unos cuantos investigadores de la psiquiatría, el sueño pasó de ser un fenómeno mágico y misterioso a ser un objeto claro de estudio para tratar de entender qué le sucede a la mente durante este estadio conductual.

Como el lector sabe por experiencia, la necesidad de dormir no desaparece más que con el dormir, así que se han formulado diversas explicaciones tratando de explicar la función de abordar esta conducta. Antes de describir algunas de las teorías neurofisiológicas y neuroquímicas sobre la génesis del sueño, es justo reconocer que toda la evidencia que se ha obtenido a través de los años ha sido gracias al empleo de una herramienta muy útil que está presente en todo laboratorio de sueño: El polígrafo. Debemos de recordar que el electroencefalograma (EEG) o registro de la actividad eléctrica cerebral fue desarrollado

por Berger en 1929, de tal forma que ésta fue la forma objetiva de averiguar si una persona estaba despierta o dormida. (Berger, 1929, revisado en Corsi-Cabrera, 1983).

Una vez que se contó con el EEG, las primeras hipótesis comenzaron a surgir como consecuencia del análisis de la actividad eléctrica del cerebro. Las primeras ideas sobre el sueño fueron formuladas en la década de 1930 y sugerían que el dormir era la respuesta del organismo a una falta de estimulación por parte del medio ambiente y de actividad. Este postulado fue conocido como la Teoría Pasiva del Sueño. Esta aproximación fue propuesta por Frederick Bremer y sus investigaciones fueron publicadas en 1935 y 1936. En sus preparaciones en gatos, él demostró que se presentaba una actividad electrográfica rápida de bajo voltaje alternándose con actividad de ondas lentas, las cuales se asociaban con el sueño. Esta alternancia de actividad eléctrica se presentaba si hacía un corte en la parte baja del bulbo raquídeo. A esta preparación la llamó *encéphale isolé*. Cuando la sección era producida en el mesencéfalo, justo por detrás de los nervios oculomotores, él observó que solamente se presentaban ondas lentas. A esta última preparación la denominó *cerveau isolé* (Bremer, 1935; Bremer, 1936, revisado en Rosenthal, 2000).

Más tarde, después de la Segunda Guerra Mundial, los avances en la tecnología permitieron que el estudio del sueño avanzara, de tal modo que se pudieron realizar registros con electrodos implantados crónicamente. De este modo, en 1949 apareció en el primer número de la revista *Electroencephalography and Clinical and Neurophysiology* un artículo titulado "*Brain Stem Reticular Formation and Activation of the EEG*" realizado por Moruzzi y Magoun. A partir de este momento, dichos autores pasaron a la historia debido a que habían demostrado que la estimulación eléctrica en la formación reticular (FR) del tallo cerebral producía activación del EEG, así como alertamiento conductual. Este hallazgo no modificó la teoría del sueño como fenómeno pasivo, por el contrario, ellos formularon que el sueño era la resultante del agotamiento del Sistema Reticular Activador Ascendente (SRAA).

Sin embargo, La Teoría Pasiva del Sueño sería modificada y se transformaría en la

Teoría Activa del Sueño gracias a los experimentos de Hess (1953). En estos, él demostró que la estimulación eléctrica del diencefalo producía sueño conductual y electrográfico en gatos. Con esto, surgió la idea de la posible existencia de más zonas relacionadas con el control del sueño. Es así como actualmente se conoce que la FR, con sus núcleos en el tallo cerebral y diversas proyecciones al tálamo, participan de manera activa y definitiva en la generación del sueño.

Como se ha comentado, el sueño pasó de ser considerado un fenómeno pasivo a un estado de activación. Diversos grupos de investigación han aportado evidencias que señalan algunos de los elementos que participan en la génesis del ciclo sueño-vigilia. A continuación, señalaremos con un poco más de detalle algunos de estos hallazgos. Sin embargo, antes de comenzar a describir los sustratos tanto neuroanatómicos como neuroquímicos involucrados en los estados de vigilancia, es conveniente definir tanto conductual como polisomnográficamente el fenómeno del ciclo sueño-vigilia.

El sueño en mamíferos.

Conductualmente el sueño es definido por: a) la adopción espontánea de una postura específica dependiendo de la especie, b) inmovilidad conductual, c) umbral elevado para responder a estímulos del medio ambiente y d) reversibilidad rápida de la conducta con estimulación supraumbrales (Revisado en Zepellín, 2000). El fenómeno del ciclo sueño-vigilia ha sido estudiado en mamíferos como roedores y gatos y ha sido subdividido en las siguientes fases: VIG, SOL1, SOL2 y SMOR.

Polisomnográficamente, el estudio del sueño en el humano comprende VIG, SOL, fases 1-4 y SMOR. La Fase 1 del SOL ocupa cerca del 2-5% del tiempo total de registro. Podemos decir que esta fase por presentar un bajo umbral para despertar, es considerada la fase ligera del sueño. En la Fase 2, aparecen en el EEG unas ondas en forma de husos llamadas husos de sueño (12-16 Hz), así como los complejos K, estos últimos consisten en una onda delineada negativamente la cual es seguida de un componente positivo. Durante la fase 2, la actividad del EEG se caracteriza por presentar frecuencias mezcladas de bajo

voltaje las cuales ocupan cerca del 45% de la época del registro; por otro lado, la actividad del electromiograma (EMG) va disminuyendo conforme el sujeto avanza en el ciclo. La Fase 3 presenta una mayor cantidad de ondas lentas menores a 2 Hz con amplitud mayor a los 75 microvolts (μV) y esta actividad se presenta por lo menos el 20% pero no más del 50% de la época del registro. Finalmente, en la Fase 4 el EEG presenta ondas lentas que ocupan más del 50% del registro y ésta se va incrementando en tiempo conforme el sujeto transita en la noche. Se pueden presentar complejos K así como husos de sueño.

Una vez que el SOL se ha presentado, da paso al SMOR caracterizado por presentar en el EEG movimientos oculares rápidos, así como sacudidas en los miembros inferiores registradas en el EMG conocidas como mioclonías así como presentar arritmias respiratorias y cardíacas, entre otras características. El SMOR ocupa del 20 al 25% del sueño total. En toda la noche aparecen aproximadamente de 4 a 6 fases de SMOR debido a que el promedio del ciclo SOL-SMOR se repite de 90 a 120 min. (Rechtschaffen y Kales, 1968).

En los mamíferos estudiados como el gato y la rata, la transición de la VIG al SOL, está caracterizada por la aparición de una actividad registrada en el EEG de huso de sueño y, generalmente uno o varios minutos después de la ocurrencia de esta actividad, el EEG presenta por completo ondas lentas. Por otro lado, en el caso de la transición del SOL al SMOR, se puede apreciar que antes de que se presente un EEG completamente desincronizado, aparece una actividad denominada ondas ponto-geniculo-occipitales (PGO). Cuando el SMOR está establecido, las ondas PGO aparecen como ráfagas, mientras que el tono muscular se abate totalmente (Sakai y Jouvet, 1980). Existe otros parámetros electrofisiológicos que se comportan de manera diferente durante los estados de vigilancia, como son los movimientos oculares registrados por el electrooculograma (EOG). Esta actividad disminuye su frecuencia de la VIG al SOL, apareciendo en el registro durante el SMOR formando ráfagas (Revisado en Carskadon y Dement, 2000). Algunas funciones vegetativas como la respiración y el ritmo cardíaco disminuyen su frecuencia al transitar de la VIG al SOL, presentando arritmias durante el SMOR. Otro parámetro que se modifica es

la temperatura corporal), la cual sigue un ritmo asociado con la VIG y al sueño. Así como la temperatura corporal sigue un ritmo, esta característica es compartida con algunas funciones endócrinas. Por ejemplo, varias hormonas y neurotransmisores varían a lo largo del ciclo sueño-vigilia (Revisado en Óbal y Krueger, 1999). Un caso concreto es que durante la VIG y el SMOR se obtiene la concentración máxima de ACh (Williams y cols., 1994), mientras que el GABA presenta un pico máximo durante el SOL (Nitz y Siegel, 1996).

III.- ESTADOS DE VIGILANCIA.

3.1 VIGILIA (VIG).

3.1.1 Características conductuales.

En las especies estudiadas, la VIG se divide en dos categorías principales: Activa y Pasiva. En la primera, los animales muestran una gran actividad motora mostrando conductas típicas de su especie, comen, beben, se acicalan y exploran el ambiente; mientras que en la segunda, permanecen quietos con los ojos abiertos y alertas al medio que los rodea (Revisado en Corsi-Cabrera, 1983).

3.1.2 Características Electrográficas.

Es a través del estudio del EEG con el cual podemos observar que durante la VIG, se obtiene una señal caracterizada por una actividad desincronizada con una frecuencia rápida que va de 4 a 12 Hz y un bajo voltaje que varía de 30 a 50 μ v. El EMG durante la vigilia presenta una gran actividad, asimismo en el EOG se puede registrar una gran cantidad de movimientos oculares, relacionados a la exploración continua del medio ambiente y como respuesta a los estímulos percibidos (Revisado en Corsi-Cabrera, 1983).

3.1.3 Fisiología.

Los primeros estudios que sugerían al hipotálamo como centro promotor de la VIG fueron aportados gracias a las observaciones realizadas por Von Economo (1931, Revisado en Jones, 2000). Este autor describió que pacientes que cursaban con los síntomas de encefalitis letárgica, como aumento de la VIG, presentaban lesiones en la parte rostral del diencéfalo en sus análisis *post mortem*. Por otro lado, los casos clínicos de somnolencia y

como se relacionaban más con lesiones en la parte posterior del hipotálamo. De este modo Von Economo encontró que las lesiones en el hipotálamo ocasionaban, ya fuera una pérdida de la VIG o del sueño (Revisado en Jones, 2000). A pesar de que Von Economo fue el primero en sugerir que los centros de sueño y de vigilia se encontraban en el hipotálamo, no fue sino hasta que Ranson (1939), Hess (Revisado en Jones 2000) y Nauta (1946) atribuyeron al hipotálamo posterior la responsabilidad de la VIG.

También los experimentos llevados a cabo por Villablanca (1966) aportaron evidencias que apoyaron la idea de que el hipotálamo posterior participaba en el control de la VIG. Por otro lado, los resultados de los estudios de McGinty y Sterman (1968) demostraban que si se producían lesiones en el hipotálamo anterior, el animal presentaba insomnio. Con estos descubrimientos, sugirieron que el hipotálamo posterior era el responsable de la VIG. Estos datos fueron apoyados por los experimentos de Findlay y Hayward (1969) que demostraron la importancia de ésta región del SNC al describir que la actividad registrada en células del hipotálamo posterior, disminuía conforme el animal transitaba de la VIG al SOL.

Existen otros grupos celulares que participan en la génesis de la VIG. Entre estos tenemos al Locus Coeruleus (LC) noradrenérgico y a los Núcleos del Rafé (NR) serotoninérgico, los cuales incrementan su disparo y por consecuencia la concentración de sus respectivos neurotransmisores durante la VIG y, disminuyen tanto su actividad celular como la liberación de sus neurotransmisores conforme el animal transita al SOL (McGinty y Harper, 1976; Trulson y Jacobs, 1979; Inagaki y cols., 1988; Gervasoni y cols., 1998). Además de la actividad de estos núcleos, el hipotálamo posterior envía proyecciones histaminérgicas difusas a la corteza y al tálamo; éstas conexiones son consideradas como parte importante del sistema activador de la VIG (Jones y Yang, 1985; Brown y cols., 2001).

3.1.4 Bioquímica.

Shute y Lewis (1967) identificaron la presencia en el SNC de la enzima que sintetiza ACh, acetil colín transferasa. Básicamente se definieron dos grupos en los cuales se identificó este neurotransmisor: uno en el cerebro basal con proyecciones a la corteza y el otro localizado en la parte oral-caudal de la FR mesencefálica (en los núcleos que hoy en día conocemos como PPT/LDT), los cuales proyectan al diencefalo, propiamente a los núcleos intralaminares del tálamo (Mesulam y cols., 1983).

La activación del complejo PPT/LDT durante la VIG, se correlaciona con las elevadas concentraciones de ACh (Celesia y Jasper, 1966; Williams y cols., 1994; Marrosu y cols., 1995). Otro elemento importante que demuestra el papel de la ACh en la VIG fue aportado por Cape y Jones (1998). Estos autores demostraron que la inhibición farmacológica de células colinérgicas deprimía la actividad rápida, la cual se caracteriza por estar presente en la VIG.

La ACh lleva a cabo sus efectos a través de dos principales receptores: muscarínicos y nicotínicos. Los receptores nicotínicos son ionotrópicos, mientras que los muscarínicos son de tipo metabotrópico (Hulme y cols., 1990). Existe toda una familia de subtipos de cada uno de estos receptores, los cuales han sido estudiados tratando de averiguar cuál de todos estos es el responsable de la VIG (Revisado en Zolotoski y cols., 1999).

Otro neurotransmisor involucrado en la génesis de la VIG es la histamina (HA) (Brown y cols., 2001). Estudios farmacológicos han demostrado que la administración de HA incrementa el alertamiento (Monnier y cols., 1970), mientras que la lesión de las fibras histaminérgicas, ocasiona un decremento en la VIG (Sallanon y cols., 1986, revisado en Jones, 2000).

En el caso de la dopamina (DA), se ha propuesto que incrementa la VIG. Se ha encontrado que la administración de DA (Benkert y Kohler, 1972), así como la

microinyección de agonistas dopaminérgicos (Kafi y Gaillard, 1976), incrementan el tiempo de la VIG.

Para el glutamato, se ha propuesto que es un indicador de alerta ya que presenta elevadas concentraciones asociadas con activación del EEG (Jasper y cols., 1965; Azuma y cols., 1996), además de que la estimulación de receptores a glutamato, por ejemplo el tipo N-methyl-D-aspartato (NMDA), inducen un incremento en la actividad de células corticales (McCormick, 1992). Sin embargo, la estimulación de este receptor puede inducir una descarga en el disparo de las células piramidales durante el SOL (Armstrong-James y Fox, 1988). Entonces, el glutamato es un elemento crítico para la activación cortical de la VIG, sin embargo, diferentes tipos de receptores pueden ser activados también durante el SOL.

Recientemente se han descrito una serie de moléculas de naturaleza peptídica que participan en la generación de la VIG. Estos nuevos péptidos han sido relacionados con la ingesta de alimento y se han denominado orexinas (Sakurai y cols., 1998). La administración de orexinas en I.C. incrementa la actividad eléctrica de este núcleo y origina en los animales, un incremento en el despertar asociado a una disminución en el SMOR (Hagan y cols., 1999). Es interesante señalar que las orexinas han sido asociadas con la narcolepsia, un severo trastorno del sueño. Los pacientes que padecen esta enfermedad presentan ataques de sueño, cataplexia, alucinaciones hipnagógicas, latencias acortadas para el SMOR y parálisis del sueño (Revisado en Robinson y Guilleminault, 1999).

Se ha encontrado que en determinadas razas de perros como el Doberman o el Labrador, el gen *canarc-1* es transmitido de manera autosómica recesiva. Este fue identificado como una mutación que codifica para el receptor 2 de orexinas y de este modo, se presenta una alteración en el funcionamiento del receptor de estos péptidos (Lin y cols., 1999). Por otro lado, el ratón mutante del ligando, es decir, no produce orexinas, presenta periodos de "arresto conductual" definidos como ausencias de vigilia. Además se ha demostrado que estos animales presentan ataques de cataplexia así como latencias acortadas al sueño MOR (Chemelli y cols., 1999). Los niveles de orexinas han sido recientemente

descritos como indetectables en pacientes con narcolepsia, sugiriendo con esto una anomalía en el sistema orexinérgico (Nishino y cols., 2000).

Como se ha comentado, existen diferentes moléculas que participan en la modulación de la VIG, Kodama (1999) ofrece una revisión muy actualizada sobre este punto.

3.2 SUEÑO DE ONDAS LENTAS (SOL).

3.2.1 Características conductuales.

En los mamíferos, durante el SOL, se presentan características conductuales como echarse sobre su costado o sobre su vientre. Esta última posición es conocida en el gato como "esfinge". También podemos apreciar que se presenta una relajación de las membranas nictitantes, la pupila se contrae y se presentan pocos movimientos oculares. Funciones como la respiración y ritmo cardíaco se lentifican, mientras que se incrementa el umbral para reaccionar ante los estímulos ambientales (Revisado en Zepelin, 2000).

3.2.2 Características Electrográficas.

Una vez iniciada esta fase, es posible registrar en el EEG tres principales tipos de oscilaciones: Los husos (7 a 14 Hz), el ritmo delta (1 a 4 Hz) y las oscilaciones lentas (< 1 Hz) que pueden presentarse con una amplitud desde 150 a 250 μv (Steriade y cols., 1994).

Steriade ha señalado que las células glutamatérgicas corticales son las responsables de la generación de la actividad lenta, las reticulares talámicas GABAérgicas se encargan de los husos mientras que, las talámicas glutamatérgicas generan la actividad delta (Revisado en Steriade 1999).

3.2.3 Fisiología.

El SOL también puede ser denominado sincronizado porque la actividad que se registra en el EEG presenta esa característica; ligero, porque el umbral para despertar es

bajo y también puede ser llamado Sueño no-MOR porque en esta fase no se presentan los movimientos oculares rápidos.

Diversos experimentos de lesión y estimulación en diferentes estructuras del SNC, han permitido identificar los sustratos que intervienen en el control del sueño. Recordemos que Von Economo había sugerido centros de sueño ubicados en el cerebro basal anterior y, junto con los estudios de Bremer en 1935, se postulaba al hipotálamo como una estructura relacionada con la génesis del sueño.

En la década de 1960, los estudios de Clemente y Serman (1967) demostraron que la estimulación eléctrica del área preóptica ocasionaba sueño conductual y electrográfico. Sin embargo, se ha descrito que otras áreas del SNC participan en la génesis del SOL, estructuras como amígdala, núcleos del tálamo así como el cerebro basal anterior son elementos importantes para la instalación del SOL (Serman y Clemente, 1962; Findlay y Hayward, 1969; Jacobs y McGinty, 1971; Steriade y Llinás, 1988).

El posible mecanismo neurofisiológico sugerido para la aparición del SOL describe que las neuronas del área preóptica medial conteniendo GABA, proyectan a los núcleos del LC y a los NR (Jones y Mühlethaler, 1999). Las proyecciones GABAérgicas también inhiben a grupos neuronales histaminérgicos ubicados en el núcleo tuberomamilar y de este modo, se inhibe la actividad de los grupos celulares encargados del mantenimiento de la VIG (Gervasoni y cols., 1998). Este mecanismo ha sido comprobado al demostrarse que la actividad unitaria de los núcleos GABAérgicos, localizados en el cerebro basal anterior, se incrementa conforme el animal transita de la VIG al SOL (Revisado en Luppi y cols., 1999). Podemos concluir que el hipotálamo es una estructura muy importante en la generación del SOL (Shiromani y cols., 1999).

3.2.4 Bioquímica.

Uno de los neurotransmisores involucrados con el SOL es el GABA. La distribución de neuronas que contienen GABA han sido localizadas en el hipotálamo, núcleo reticular

talámico, cerebro basal anterior y área preóptica (Gritti y cols., 1997), además se ha encontrado que su concentración alcanza un pico máximo durante el SOL en el hipotálamo posterior (Nitz y Siegel, 1996).

El GABA actúa a través de 2 tipos de receptores: El GABA_A, receptor ionotrópico y el GABA_B, el cual es metabotrópico. Estudios farmacológicos han señalado que la estimulación del receptor GABA_A favorece la generación de ondas lentas (Faulhaber y cols., 1997) incrementando esta fase de sueño disminuyendo la VIG. Con esta evidencia, se ha sugerido que el probable mecanismo por el cual el GABA desencadena la generación de ondas lentas involucra la hiperpolarización generada por la activación de estos receptores, así como su asociación con la generación de husos y de ondas lentas.

Por otro lado, se ha propuesto que otras moléculas también participan de manera activa en la génesis del SOL, como es el caso de la adenosina. La adenosina es un nucleósido sugerido como un factor inductor de sueño ya que se ha encontrado en elevadas concentraciones después de periodos de privación de sueño (Porkka-Heiskanen y cols., 1997).

Finalmente, existe evidencia que señala que ciertos péptidos pueden favorecer la aparición de SOL, entre estos tenemos a la sustancia inductora de sueño (Revisado en Zolatoski y cols., 1999), péptido inductor de sueño delta (Schoenenberger y Monnier, 1977), péptidos murámiles (Martín y cols., 1984), interleucinas (Krueger y cols., 1984) y arginina vasotocina (Pavel y cols., 1977).

La lista de los péptidos que inducen SOL aumentó con el reciente descubrimiento de cortistatina (CST). CST se encontró en corteza cerebral y además de suprimir la actividad neuronal, puede favorecer la aparición de ondas lentas (de Lecea y cols., 1996). También se le ha descrito que deteriora el proceso de aprendizaje y memoria disminuyendo la síntesis de Adenosin-monofosfato cíclico (AMPC) (Sánchez-Alavez y cols., 2000).

3.3 SUEÑO DE MOVIMIENTOS OCULARES RÁPIDOS (SMOR).

3.3.1 Características conductuales.

En los mamíferos estudiados que se encuentran en este estado de vigilancia aparecen movimientos rápidos de las orejas, vibrisas y de las extremidades; la respiración se vuelve irregular y con periodos cortos en los cuales no hay ventilación, conocidos como apneas del sueño. Conductualmente la posición característica que adopta la mayoría de los mamíferos se denomina "ovillo", ya que enrollan el cuerpo y lo descansan al igual que apoyan la cabeza sobre el piso y permanecen con los ojos cerrados (Jouvet y Michel, 1959, revisado en Corsi-Cabrera, 1983).

3.3.2 Características Electrográficas.

En 1953, Aserinsky y Kleitman descubrieron que durante el sueño en los niños, se presentaba una actividad rítmica de movimientos oculares así como de sacudidas musculares. Este hallazgo fue suficiente para que dichos autores reportaran que existía una fase de sueño diferente con características especiales, propiamente con movimientos oculares rápidos y es ésta la razón por la cual a esta fase de sueño se le ha denominado Sueño de Movimientos Oculares Rápidos.

En las ratas, el SMOR se caracteriza por presentar en el EEG una actividad conocida como ritmo theta (θ), cuya frecuencia varía entre 4.0 -12 Hz. El voltaje puede variar desde 50 hasta 150 μv (Swisher, 1962).

Los fenómenos que ocurren durante el SMOR han sido clasificados en eventos tónicos, aquellos que se presentan a lo largo de todo el SMOR; mientras que aquellos fenómenos que aparecen en forma esporádica son conocidos como eventos fásicos los cuales se explican a continuación.

3.3.3 Eventos Tónicos:

Desincronización Cortical.

La actividad talámica que se registra durante el SMOR es producto de la interacción de núcleos pontinos con el tálamo. Existen proyecciones de núcleos del puente como el complejo colinérgico mesopontino PPT/LDT al tálamo, de este modo este parece ser el mecanismo por el cual la actividad del EEG se desincroniza (Kayama y cols., 1992).

Ritmo Theta.

El ritmo θ es una actividad electrográfica caracterizada por presentar dos fases, la lenta de 4 a 8 Hz y la rápida de 8 a 12 Hz. Este ritmo electrofisiológico a pesar de ser una característica del SMOR, también ha sido registrado en el hipocampo asociado con conductas de exploración en la rata, así como en procesos de atención (Winson, 1972).

Atonía Muscular.

La base neurofisiológica del mecanismo involucra a grupos neuronales como el LC y Locus subcaeruleus (LsubC). Las lesiones en estas áreas, han demostrado que los gatos, que cursan por SMOR, presentan actividad muscular. En estos gatos, se presenta un EEG desincronizado pero los animales muestran conductas como levantarse, ataque y comportamiento de huida con movimientos de orientación de la cabeza pero con los ojos cerrados. Este síndrome se denominó "Conducta onírica" (Jouvet y Delorme, 1965, revisado en Lai y Siegel, 1999).

Se ha demostrado que una región conocida como peri-LC, descrita por Sakai en 1980, es la zona que dispara la atonía muscular del SMOR. El mecanismo por el cual se lleva a cabo la atonía muscular se encuentra ampliamente descrito en Lai y Siegel (1999). Ellos resumen que hay dos principales vías neuroanatómicas involucradas en la atonía muscular: En la primera, participan núcleos de la FR medial como el giganteocelular, magnocelularis (NMC), y el paramediano (NPM). La segunda se origina en la parte dorsolateral del puente en el complejo del LC, de tal modo que a nivel de la médula espinal,

se presenta una hiperpolarización de las motoneuronas durante el SMOR resultante de la inhibición glicinérgica disparada por el NMC y el NPM.

3.3.4 Eventos Fásicos:

Mioclonías.

Jouvet fue el primero en observar y describir las sacudidas musculares, conocidas como mioclonías durante el sueño (Jouvet, 1962, revisado en Siegel, 2000). Las regiones que participan en la generación de las mioclonías son muy variadas y están relacionadas con el fenómeno de la atonía muscular. Por lo menos 3 regiones que participan en este evento han sido sugeridas: La FR pontina, FR bulbar y las motoneuronas. El grupo de investigación de Jouvet describió en la década de los 70 que una región de la FR pontina, ventral al LC la cual denominaron peri-LC alfa y su aferencia a la FR bulbar, participaban en este fenómeno fásico. Finalmente, en el caso de las motoneuronas, las tipo alfa presentan una hiperpolarización durante el SMOR de acuerdo a los experimentos de Morales y Chase (1978).

Movimientos oculares rápidos.

Se ha encontrado que estos pueden aparecer en forma verticales, horizontales o circulares. De los estudios que se han realizado para conocer el sustrato neuroanatómico de los movimientos oculares rápidos, podemos citar el llevado a cabo por Kaneko y cols. (1981) en donde reportaron que grupos celulares del núcleo abducens, disparaban en forma de ráfagas durante el SMOR. Un probable mecanismo fisiológico, descrito por el grupo de Jouvet, sugiere que los colículos son un elemento importante en la generación de los movimientos oculares rápidos (Jeannerod y cols., 1965, revisado en Corsi-Cabrera, 1983).

Actividad PGO.

Unos segundos antes de iniciarse el SMOR aparece de manera fásica una actividad electrofisiológica en forma de espigas de alto voltaje, ondas rápidas de gran amplitud llamadas PGO. Las ondas PGO fueron registradas originalmente en el gato a nivel del puente por Jouvet y Michel (1959, revisado en Corsi-Cabrera, 1983), después a nivel del

núcleo geniculado lateral por Mikiten y colaboradores (1961) y, descritas a nivel de corteza en 1963 (Mouret y cols., 1963, revisado en Corsi-Cabrera, 1983). A esta actividad cerebral se le conoce como potenciales PGO. El mecanismo neurofisiológico que explica la aparición de esta actividad señala que las ondas PGO se propagan bilateralmente hacia los cuerpos geniculados laterales del tálamo y hacia diferentes estructuras corticales, subcorticales del sistema visual y auditivo para finalmente generar una actividad en la corteza occipital. Estos potenciales se originan en el LC alfa, LsubC, periLC, PPT/LDT, así como a la región peribraquial (Revisado en Datta, 1999; Sakai y Jouvet, 1980).

3.3.5 Fisiología.

Al SMOR también se le llama sueño rápido, porque la frecuencia de la actividad cerebral dominante en este periodo es rápida; se le conoce también como desincronizado porque sus ondas no presentan sincronía como el SOL; MOR ó REM porque son las iniciales de movimientos oculares rápidos en español y rapid eye movements en inglés, respectivamente; también puede ser llamado sueño profundo, porque el umbral para despertar es elevado.

El SMOR es la fase más estudiada de los estados de vigilia. Se han propuesto diversas teorías sobre su función. En este contexto, la primera teoría que postuló una interacción entre la VIG y el sueño fue propuesta por Hobson y cols (1975). Ellos propusieron que la estructura generadora de la VIG debían de estar activas (LC) y al mismo tiempo, inhibiendo a la estructura relacionada con el sueño (Campo tegmental giganteocelular [FTG]). De este modo, al transitar de VIG a sueño, el LC originalmente activo durante la VIG, presentaría una inhibición por parte del FTG. Así, ellos postularon el modelo de interacción recíproca. Este modelo ha sido ampliado incluyendo nuevos elementos; por ejemplo, las células colinérgicas PPT/LDT. Se sabe que este complejo inhibe a las neuronas del LC así como a los NR para generar desincronización cortical (Revisado en Semba, 1999). El papel de los núcleos PPT/LDT en la generación del SMOR se ha visto fortalecido con estudios neuroanatómicos en donde han revelado que lesiones en dichos núcleos, ocasionan una reducción significativa en el SMOR (Webster y Jones, 1988),

mientras que su estimulación eléctrica incrementa la cantidad de SMOR (Thakkar y cols., 1996). Jones y Yang (1985) han reportado proyecciones del PPT/LDT al LC, de este modo se muestra como se silencia el LC durante el SMOR.

Como podemos apreciar, el complejo PPT/LDT es un elemento importante para la generación del SMOR. Además de esto, este complejo colinérgico no dispara exclusivamente en SMOR. Estudios de registro de actividad unitaria han demostrado que algunas neuronas presentes en estos núcleos celulares muestran mayor actividad en VIG y en SMOR que durante SOL y han sido llamadas neuronas W/REM-on y, aquellas que su mayor descarga se presenta exclusivamente durante SMOR han sido denominadas REM-on (El Mansari y cols., 1989; Kayama y cols., 1992).

3.3.6 Bioquímica.

Los sustratos neuroquímicos generadores de la VIG y el SOL, como son 5-HT, NA, HA y GABA, disminuyen de concentración y de este modo dan paso a la instalación del SMOR (Revisado en Kodama, 1999). Entre las principales moléculas que generan el SMOR está la ACh.

Los experimentos pioneros que demostraron que la ACh facilitaba el SMOR fueron llevados a cabo por el científico mexicano, Raúl Hernández-Peón. Este autor realizó una serie de experimentos con Chávez-Ibarra en los que reportaron que la aplicación de cristales de ACh en el área preóptica medial, producía manifestaciones de sueño tanto conductuales como electrográficas en gatos (Hernández-Peón y Chávez-Ibarra, 1969).

Posteriormente, con el desarrollo de técnicas para la obtención y análisis de muestras para determinadas moléculas *in vivo*, microdiálisis y cromatografía de líquidos de alta resolución o High Performance Liquid Chromatography, en inglés (HPLC), se logró demostrar que la concentración más alta de ACh se presenta durante el SMOR (Kodama y cols., 1990; Williams y cols., 1994).

La ACh liberada actúa a través de 2 tipos de receptores: Muscarínicos (M_1 - M_5) y nicotínicos. Los receptores M_2 y M_4 se encuentran acoplados negativamente al adenilil ciclasa (AC) de tal modo que su activación ocasiona un decremento en la síntesis de AMPc (Hulme y cols., 1990).

Velázquez-Moctezuma y cols. (1989) encontraron que el cisdioxolano, un agonista al receptor M_2 , microinyectado en la FR pontina medial de gatos, ocasionaba un incremento en esta fase de sueño. Este resultado ha sido replicado en ratas por el grupo de Luca Imeri (Imeri y cols., 1994). De este modo, farmacológicamente se ha evidenciado que la ACh induce SMOR y que los receptores muscarínicos participan en éste fenómeno, propiamente los tipo M_2 .

Así como hemos descrito el papel de diversos elementos en la generación del SMOR, existen otros elementos que también modulan a este estado de vigilancia. A continuación mencionaremos brevemente el papel de otras moléculas en el SMOR.

3.4 Factores humorales inductores de sueño.

Pierón postuló que existía en el LCR de perros privados de sueño, una sustancia a la que llamó Hipnotoxina. Esta molécula era capaz de inducir sueño una vez que era administrada a perros que habían dormido *ad libitum* (Pierón, 1913, revisado en Jones, 2000). A partir de este momento se ha sugerido que el ciclo sueño-vigilia puede ser modificado por sustancias. Estudios posteriores han demostrado que determinadas moléculas pueden ser detectadas en diferentes fluidos biológicos después de mantener al sujeto privado de sueño, como en el LCR (Fencel y cols., 1971), la orina (Kruger y cols., 1982) y en la sangre (Monnier y Hosli, 1965).

Una molécula debe de cumplir con ciertas características para ser considerada un factor inductor de sueño, por ejemplo: 1) Debe de inducir y/o mantener sueño fisiológico, 2) Debe de estar presente en el animal, 3) Su concentración así como la de sus receptores, deben de cambiar a lo largo de los estados de vigilancia, 4) Debe de estar químicamente definida, 5) Debe de presentar un efecto dosis-dependiente, 6) El rango de sus efectos debe de ser similar en distintas especies, 7) Debe de actuar sobre mecanismos generadores del sueño, 8) Su inactivación debe de generar insomnio (Borbély y Tobler, 1980).

Entre las diversas moléculas identificadas como sustancias inductoras de sueño, se encuentran los neurotransmisores ya comentados. Algunos péptidos como el VIP (Jiménez-Anguiano y cols., 1993), CST (de Lecea y cols., 1996). Las orexinas (Sakurai y cols., 1998; Chemelli y cols., 1999; Hagan y cols., 1999; Lin y cols., 1999; Piper y cols., 1999; Smith y cols., 1999), así como nucleósidos como al adenosina (Porkka-Heiskanen y cols., 1997); y lípidos, como las prostaglandinas (Hayaishi, 1990).

Las prostaglandinas son eicosanoides derivadas del AA, y aunque se sabe el papel de ciertas prostaglandinas en el sueño, se desconoce el papel que pudiera tener el AA *per se* en el sueño.

Además dos nuevas moléculas lipídicas han sido descritas; una de ellas derivada del propio AA llamada ANA (Devane y cols., 1992) y, la segunda caracterizada en el LCR de gatos privados de sueño denominada OLE (Cravatt y cols., 1995).

La evidencia experimental sobre ANA y OLE ha demostrado que presentan un perfil farmacológico semejante al ocasionado por la marihuana al alterar conductas y procesos moleculares (Fride y Mechoulam, 1993; Di Marzo y cols., 1998; Murillo-Rodríguez y cols., 1998b); de tal modo que se han propuesto como endocannabinoides, es decir, moléculas que el cerebro produce y son su propia marihuana. Dado entonces que son moléculas con propiedades semejantes a las de la marihuana, en la siguiente sección mencionaremos algunos de los efectos de los cannabinoides así como el sistema de receptores que emplean.

IV.- CANABINOIDES.

La planta *Cannabis sativa*, comúnmente llamada marihuana, ha sido empleada con fines religiosos, recreacionales y terapéuticos desde tiempos ancestrales (Zias y cols., 1993). Los asirios empleaban a la *Cannabis* y le designaban con un determinado nombre de acuerdo a su uso: "Azallu", para combatir enfermedades neurológicas, también era empleada contra el "envenenamiento de los miembros" o "arimtu", la cual probablemente era una enfermedad neurológica de las piernas. "Qunnabu" era utilizada en ritos religiosos, mientras que "gan-zi-gun-nu" ha sido traducida como "la droga que se lleva la mente" (Mechoulam, 1999; Mechoulam y Ben-Shabat, 1999). A pesar de que la *Cannabis* se ha denominado como una droga de abuso, se ha comprobado que su uso con fines terapéuticos data de épocas muy remotas (Zias y cols., 1993). Se han presentado propuestas para que en la actualidad, los médicos puedan prescribirla con fines terapéuticos. Estas iniciativas son la 200 en Arizona y la 215 en California (Voth y Schwartz, 1997).

Podemos comentar por ejemplo que, entre sus diversos usos terapéuticos se ha empleado como un potente analgésico; para estimular el apetito y disminuir las náuseas y el vómito en pacientes con cáncer terminal que son sometidos a la quimioterapia; mejora la condición del paciente con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) y además

funciona muy bien como anticonvulsivo (Taylor, 1998). Hollister (1986) ofrece una muy amplia revisión sobre los efectos que tiene la marihuana en diferentes sistemas.

La *Cannabis sativa* contiene cerca de 60 elementos activos que son llamados canabinoides. La más alta concentración de canabinoides se encuentra en las flores, seguido de las hojas y en muy pequeñas cantidades en raíces. La preparación de la marihuana consiste en dejar secar hojas de la *Cannabis*. Esta preparación contiene menor concentración que el hashish, preparado de la resina de la planta.

A pesar de que la *Cannabis* presenta un elevado número de elementos activos, el principal fue determinado por Gaoni y Mechoulam (1964), el delta-9 tetrahidrocanabinol (Δ^9 -THC). Los efectos que produce el Δ^9 -THC han sido caracterizados y el más prominente es la euforia y relajación, esto va seguido por un periodo de depresión motora. A bajas dosis ocasiona efectos estimulantes, mientras que a dosis elevadas inducen cuadros de depresión (Revisado en Ameri, 1999).

Las alteraciones que la marihuana ocasiona en el sueño son un incremento en la somnolencia y en algunos casos incrementa la fase de SMOR (Moretón y Davis, 1973; Feinberg y cols., 1975; Feinberg y cols., 1976). Entonces podemos asegurar que el Δ^9 -THC es una molécula que modifica diversos procesos tanto conductuales (analgesia, hipomotilidad, hipotermia, hiperfagia, entre otros) como celulares (disminución en la síntesis de proteínas, defragmentación del DNA, apoptosis, entre otros) (Hollister, 1986; Martín, 1986).

4.1 Receptores a canabinoides.

Con el descubrimiento del principio activo de la marihuana, surgieron diversos aspectos de interés científico. Uno de estos fue el averiguar el mecanismo por el cual el Δ^9 -THC actuaba en el SNC.

La especulación sobre cuál sería el mecanismo empleado por ésta molécula terminó cuando se observó que el Δ^9 -THC inhibía la actividad de la AC (Howlett y Fleming, 1984), sugiriendo con esto que un receptor metabotrópico era activado. Pero no fue sino hasta que Devane y cols. (1988) encontraron unión específica en membranas celulares empleando radioligandos de agonistas a cannabinoides, postulando que ésta molécula tenía como blanco una proteína membranal, seguramente un receptor. Estudios posteriores ayudaron a localizar y clonar el receptor que reconocía al Δ^9 -THC el cual se distribuye principalmente en el SNC, denominándolo CB₁ (Matsuda y cols., 1990); mientras que el receptor CB₂ presenta una localización periférica (Munro y cols., 1993).

La expresión del RNAm del CB₁ ha sido detectado desde el día gestacional 8 (Buckley y cols., 1998) en la rata, mientras que en el humano, es a partir de las 33 semanas de gestación (Glass y cols., 1997). El gen que codifica para el este receptor ha sido mapeado en el cromosoma 4 (Stubbs y col., 1996; Revisado en Felder y Glass, 1998).

Es interesante señalar que la presencia del CB₁ no se limita a especies mamíferas estudiadas hasta el momento como roedores y humanos, sino que se encuentra en aves (Soderstrom y Jonson, 2000), anfibios (Soderstrom y cols., 2000), y más aún, se ha detectado en especies ancestrales como los invertebrados (Stefano y cols., 1996); esto sugiere que es un sistema que se ha conservado a través de la evolución y que es necesario para determinadas funciones aún no descritas.

Ambos receptores presentan una homología del 44% en sus secuencias así como una configuración de siete dominios transmembranales. Esta característica es propia de los receptores acoplados a proteínas G (PG). Una vez que se activa el CB₁/CB₂, se inhibe la AC vía proteínas G inhibitorias (PG_i) y de este modo, la síntesis de AMPc disminuye. Además de esto, se presenta una inhibición en los canales de calcio (Ca²⁺) tipo N y tipo Q y se activan los canales rectificadores de potasio (K⁺) (Mackie y cols., 1992; Mackie y Hillie, 1992; Mackie y cols., 1995). También se ha demostrado que se activa la cascada de señales de la proteína cinasa dependiente de mitógenos (MAPK) (Bouaboula y cols., 1996) y que la

expresión de determinados genes se ve favorecida, como los *krox-24* (Bouaboula y cols., 1995).

Recientemente un grupo reportó que la estimulación del CB_1 por el ligando, activa una proteína cinasa B también conocida como akt. La akt ha sido relacionada con funciones celulares básicas como metabolismo de energía, por lo que los autores especulan que una vez que esta cinasa es activada vía CB_1 , probablemente se regule la utilización de glucosa y de este modo medie la actividad sináptica (Gómez del Pulgar y cols., 2000). Otras cinasas involucradas en la activación del CB_1 es la proteína cinasa C (PKC). García y cols. (1998) reportaron que la PKC fosforila al CB_1 en la tercera asa intracelular, indicando con esto que la PKC se une a este receptor. Como podemos apreciar, cada vez se incrementa el número de elementos que participan en la cascada de señales iniciada por la activación de los receptores para cannabinoides.

Por otro lado, la liberación de neurotransmisores también se modifica por la activación del CB_1 . Kim y Thayer (2000) demostraron que el CB_1 inhibe la liberación de vesículas en la sinápsis. Empleando el marcaje de color llamado FM1-43, el cual colorea las vesículas sinápticas, se cuantificó una inhibición de la liberación de neurotransmisor por medios ópticos. De este modo se ha tratado de explicar los efectos de los cannabinoides en diferentes conductas al tratar de entender cómo este sistema de receptores, modifica la actividad de los neurotransmisores.

En cuanto a su distribución en el SNC, el CB_1 se encuentra en regiones como hipocampo, corteza, ganglios basales, sustancia gris pericueductal y tallo cerebral (Herkenham y cols., 1990; Glass y cols., 1997; Bisogno y cols., 1999), mientras que el CB_2 se localiza en células del sistema inmune como leucocitos y macrófagos (Munro y cols., 1993). Esta localización tan específica ha sido la explicación sobre los efectos de la Δ^9 -THC sobre el aprendizaje, conducta motora, nocicepción y sistema inmune.

Una correlación entre la localización del CB₁ en el SNC y determinadas patologías ha sido propuesta por el grupo de Glass. Ellos reportaron que, en estudios *post mortem* hechos en cerebros de pacientes que habían cursado con la enfermedad de Huntington, se presentaba una disminución en el número de receptores CB₁. Esta disminución se detectó en el globo pálido y en la sustancia nigra, de este modo se trataba de explicar porqué estos sujetos había presentado alteraciones motoras muy severas (Glass y cols., 1993).

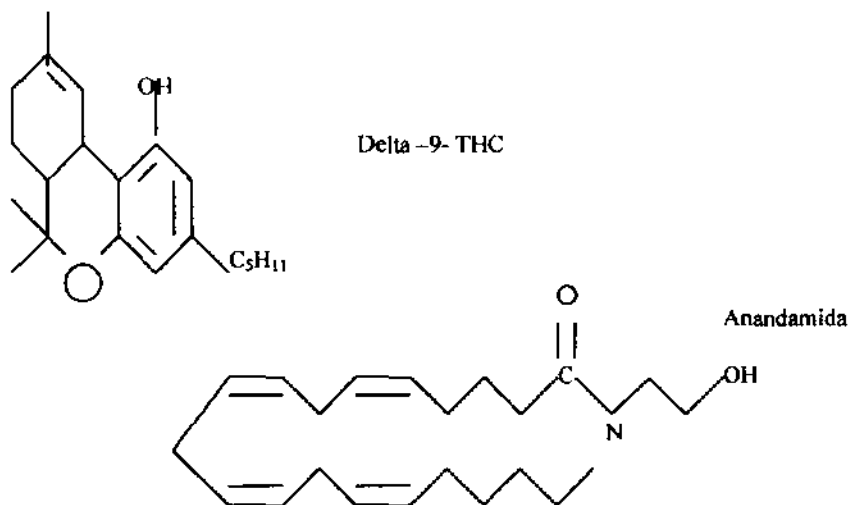
Sin embargo, la localización del CB₁ en determinadas regiones del SNC ha sido también difícil de correlacionar con funciones específicas. Por ejemplo, la retina humana expresa cantidades significativas de RNAm de este receptor, esto ha tratado de ser explicado en el sentido de que la marihuana favorece la disminución de la presión intraocular en el glaucoma (Porcella y cols., 2000). Sin duda alguna hacen falta más experimentos para determinar la función fisiológica de este hecho dado que el CB₁ ha sido caracterizado también en retina de peces, así como en salamandras (Straiker y cols., 1999).

	CB ₁	K _i (nM)	CB ₂	K _i (nM)
Transducción de señales	↓AMPC ↓Ca ²⁺ ↑K ⁺		↓AMPC	
Agonistas endógenos	ANA	400 ± 120	ANA	1760 ± 360
	2-AG	472 ± 55	2-AG	1400 ± 172
Agonistas	HU210	0.06 ± 0.01	HU210	0.5 ± 0.04
	CP55940	3.72 ± 0.01	CP55940	2.55 ± 0.28
	Δ ⁹ -THC	53 ± 8	WIN55212-2	3.3 ± 0.4
	WIN55212-2	62 ± 31	Δ ⁹ -THC	75 ± 8
Antagonistas	SR141716A	12 ± 2	SR144528	0.60 ± 0.13

Tabla 1. El sistema de receptores para cannabinoides ha sido estudiado de tal forma que se conocen los receptores CB₁ y CB₂ así como los efectos intracelulares inducidos por su activación. En la tabla anteriormente mostrada, se puede apreciar la farmacología de estos receptores así como los valores reportados de diversos ligandos para su unión con el CB₁ o el CB₂. Los valores mostrados en K_i se derivan contra el [³H]-CP55940 en varios modelos estudiados. Tabla tomada de: Felder C. and Glass M. (1998). *Cannabinoid receptors and their endogenous agonists. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38: 179-200.

4.2 Endocannabinoides.

Una vez que se identificó el principio activo de la marihuana y que éste actuaba a través de un receptor específico, empezó la búsqueda del ligando endógeno de dichos receptores; de tal modo, Devane y cols. (1992) describieron el primer ligando endógeno para los receptores CB₁ y postularon la existencia de los endocannabinoides. A continuación se muestra un dibujo con las estructuras químicas del Δ⁹-THC y de ANA.



El término endocanabinoide refiere a toda aquella molécula endógena, que presente propiedades canabimiméticas y que active a uno o a los dos receptores (Di Marzo, 1998). ANA fue el primer endocanabinoide descrito y posteriormente se identificó el segundo endocanabinoide, el cual fue llamado 2-araquidonoylglicerol o 2-AG (Mechoulam y cols., 1995), otros grupos confirmaron la presencia del 2-AG en el cerebro de ratas (Sugiura y cols., 1995) así como su unión a los receptores para cannabinoides (Sugiura y Waku, 2000). Recientemente, la presencia de ANA como del 2-AG han sido descritas en el SNC de humano (Maccarrone y cols., 2001).

El 2-AG se sintetiza a través del rompimiento de fosfolípidos membranales mediante la actividad de fosfolipasas, como la PLC y lipasas en la posición *sn-1* del diacylglicerol (Mechoulam y cols., 1998; Mechoulam y Ben-Shabat, 1999).

Además de lo mencionado anteriormente, se sabe que la enzima que degrada a ANA, la FAAH, también degrada al 2-AG (Goparaju y cols., 1998; Hillard, 2000; Howlett y Mukhopadhyay, 2000). Este nuevo lípido puede llevar a cabo funciones aún no descritas y puede formar parte de la nueva familia de lípidos con propiedades canabimiméticas. Esto se deriva del reporte interesante de Stella y cols. (1997), ellos demostraron que la concentración del 2-AG era 400 veces más elevada que la de ANA.

Dado que tanto ANA como el 2-AG poseen en su estructura una configuración molecular muy semejante a la del AA, diversos grupos han evaluado las características estructurales de diversas moléculas y la afinidad de éstas con los receptores CB₁/CB₂ (Berglund y cols., 2000; Jarrahian y cols., 2000; Regio y Traore, 2000). Estos estudios han analizado cual es el mínimo necesario en la longitud de la cadena de átomos de carbono, el número de dobles ligaduras, así como la ubicación de la primera doble ligadura en la cadena para su acoplamiento con dichos receptores.

En el caso del AA y de ANA que presentan una configuración 20:4 *n-6* (en donde 20 es el número de átomos de carbono, 4 es el número de dobles ligaduras y *n-6* el carbono en donde se localiza la primer doble ligadura) se ha encontrado que se debe de poseer por lo menos 3 o 4 dobles ligaduras ya que un número menor a este lleva a la inactivación. En la configuración, *n-3* parece que esta se debilita un poco, por lo que la primer doble ligadura debe de ubicarse en el carbono número 6 (Sheskin y cols., 1997; Berglund y cols., 1998). Estos datos sugieren entonces que el propio AA se puede unir al CB₁.

Como ya hemos mencionado, existen nuevas moléculas con propiedades semejantes a las de la marihuana. El caso del 2-AG y de ANA y aún la poco investigada OLE. En las siguientes secciones comentaremos sobre las características que poseen estas moléculas.

4.3.- Ácido Araquidónico (AA):

El papel biológico del AA es muy amplio ya que es el ácido graso más importante de los fosfolípidos membranales. El AA se deriva del ácido linoléico (LA) por lo que se ha sugerido que el AA es un ácido graso esencial, que debe de ser obtenido de la dieta. Las concentraciones de LA obtenidas en la dieta, parece que repercuten en la síntesis de AA (Taber y cols., 1998). También existe AA esterificado en la membrana celular, y es liberado por la acción de la PLA_2 (Needleman y cols., 1986).

Las funciones del AA son muy diversas, por ejemplo pueden regular segundos mensajeros tales como las PKC y generar metabolitos como los leucotrienos y las prostaglandinas (Needleman y cols., 1986; Danesch y cols., 1994; Katsuki y Okuda, 1995), estas últimas como ya lo hemos mencionado, involucradas en la modulación de diversas conductas como el aprendizaje y el sueño (Onué y cols., 1988; Hayaishi, 1991; Clements, 1995; Hölscher, 1995; Clements y Rose, 1996).

El AA puede facilitar la actividad de determinados canales iónicos tipo NMDA (Miller y cols., 1992; Min-Che y cols., 1992; Casado y Ascher, 1998), favorece la transmisión sináptica así como la expresión de genes como el GLUT-4 (Danesch y cols., 1994; Long y Pekala, 1996; Sellmayer y cols., 1996) y se ha encontrado que su liberación se incrementa después de la instalación de la potenciación de largo plazo (LTP) (Nishizaki y cols., 1999), por lo que entonces podría estar favoreciendo el aprendizaje de manera directa. A pesar de que el AA tiene estas funciones, también se ha sugerido que podría tener un papel citotóxico. Por ejemplo, en la generación de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Katsuki y Okuda, 1995), se ha encontrado que su concentración está disminuida en pacientes con esquizofrenia (Laugharne y cols., 1996) y se ha sugerido una correlación entre las concentraciones bajas del AA con los síntomas de depresión (Adams y cols., 1996).

Algunos de los efectos del AA son atribuidos a la producción de metabolitos mediante tres rutas: ciclooxigenasa, lipoxigenasa y citocromo p450 (Needleman y cols., 1986). Entre sus metabolitos se encuentra ANA, formada por la condensación del AA con etanolamina (Devane y cols., 1992; Deutsch y Chin 1993). En la siguiente sección ampliaremos la información que se tiene sobre este nuevo eicosanoide.

4.4.- Araquidoniletanolamida, anandamida (ANA):

El grupo de Mechoulam descubrió que uno de los eicosanoides extraídos del cerebro del cerdo presentaba propiedades de cannabinoides. Por ejemplo, se unía al CB1 y suprimía la respuesta en vas deferens (Devane y cols., 1992). Este compuesto fue identificado mediante espectrometría de masas revelando que era una molécula compuesta de AA acoplada a un grupo etanolamina a través de una unión amida. Este nuevo lípido recibió el nombre de arachidoniletanolamida, llamada también Anandamida (ANA) basado en el sánscrito **ananda**, "el que trae bendición y tranquilidad interna".

Se han propuesto dos rutas por las cuales ANA es sintetizada: la primera sugiere que una vez que se libera el AA de las membranas, resultado de la actividad de fosfolipasas como la PLA₂ y la fosfolipasa D (PLD), se realiza una condensación con etanolamina, y de este modo, se forma ANA (Devane y Axelrod, 1994). La segunda hipótesis revela que la formación de N-araquidonilfosfatidiletanolamida ocurre a través de un aciltransferasa la cual desplaza al AA de su posición *sn-1* a la posición *sn-2* de los fosfolípidos membranales, para unirse con la cabeza del grupo amina del fosfatidiletanolamina en la tercera posición de los fosfolípidos. La liberación entonces de ANA a partir de este sustrato sería llevada a cabo por una PLD (Cadas y cols., 1997). Como se puede suponer, en esta última ruta, se considera que ANA ya está formada y permanece en la membrana celular lista para ser liberada por alguna fosfolipasa. Di Marzo y cols. (1999) ofrecen una revisión amplia sobre estas rutas.

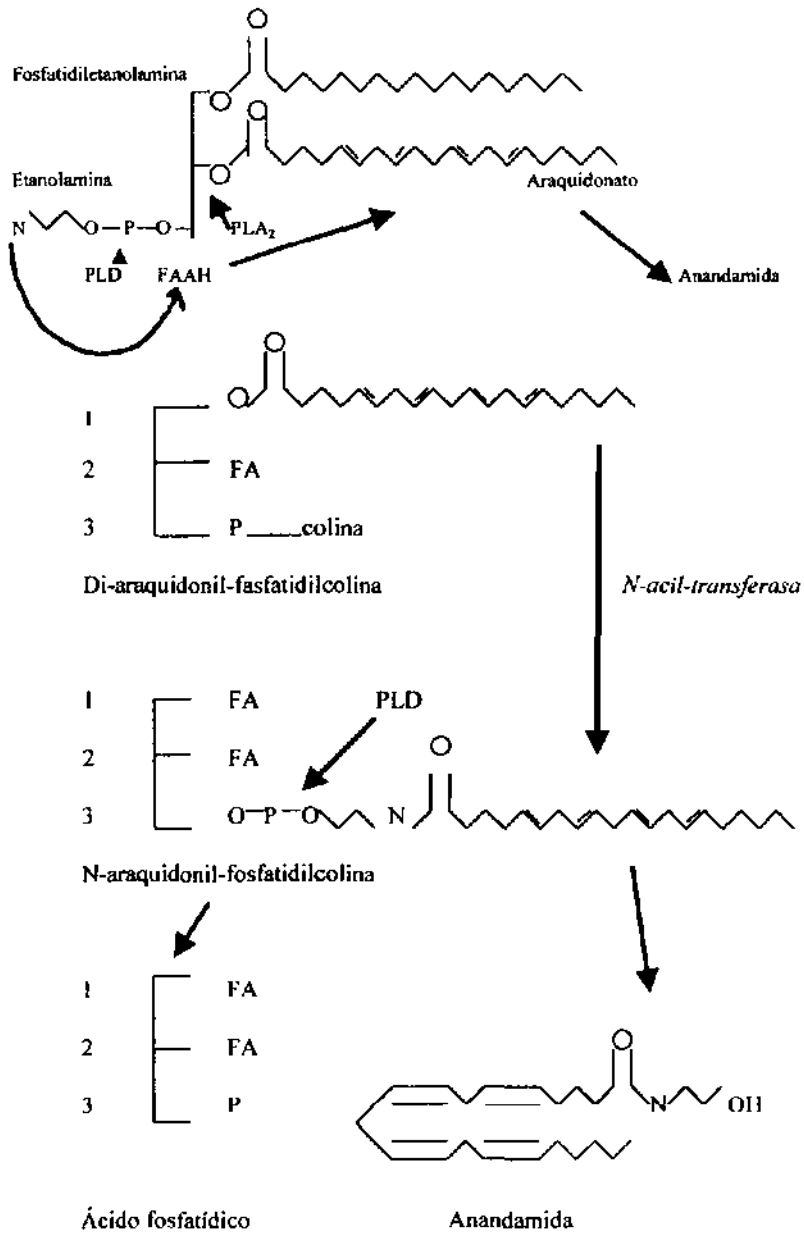


Fig. 1. Dos probables rutas de síntesis de ANA. La primera resulta de la liberación del AA y etanolamina de los fosfolípidos membranales seguida de la activación de una PLA_2 y una PLD, respectivamente. El AA y la etanolamina una vez liberadas, se condensan mediante la acción de la FAAH y así forman ANA. En la segunda ruta, el AA es liberado de la posición *sn-1* del di-araquidonil-fosfatidilecolina y es reubicado a la posición *sn-3* del fosfatidiletanolamina vía una acil transferasa para formar así, una nueva unión amida. La resultante N-araquidonil-fosfatidiletanolamina (NAPE) podría ser el sustrato de la PLD la cual liberaría ANA de la tercera posición de los fosfolípidos. Esquema tomado de: Axelrod J. and Felder C. (1998). *Cannabinoid receptors and their endogenous agonist, anandamide. Neurochem. Res. 23 (5): 575-581.*

Diversos laboratorios han tratado de ampliar la evidencia de que ANA es el ligando endógeno a los receptores canabinoides, por lo que numerosos estudios han mostrado que produce decremento de la locomoción, alteraciones en procesos de aprendizaje y memoria, analgesia, hipotermia así como hiperfagia (Fride y Mechoulam, 1993; Smith y cols., 1994; Wiley y cols., 1995; Stein y cols., 1996; Mechoulam y cols., 1997; Murillo-Rodríguez y cols., 1998b; Randall y Kendal, 1998; Williams y Kirkham, 1999). Ameri (2000) ofrece una amplia revisión sobre el tema.

Estudios electrofisiológicos han reportado que ANA disminuye las corrientes de Ca^{2+} por inhibición de los canales tipo N (Mackie y Hallie, 1992; Mackie y cols., 1993). También afecta el funcionamiento de los receptores a la 5-HT (Fan, 1995; Kimura y cols., 1998) y modula la actividad de receptores para glutamato tipo NMDA (Hampson y cols., 1998). En el caso de las sinapsis eléctricas, se sabe que ANA es capaz de inhibirlas (Venance y cols., 1995).

A nivel intracelular, ANA modifica la transducción de señales incrementando la actividad de la PLA_2 citosólica y disminuye la concentración de AMPc al inhibir la actividad de la AC (Felder y cols., 1993; Barg y cols., 1995), algunas otras evidencias sugieren que también estimula la liberación de su precursor el AA (Deutsch y Chin, 1993) y participa en la producción de eicosanoides vía la fosforilación de la MAPK (Wartmann y cols., 1995).

Es interesante señalar que la enzima que degrada a ANA, originalmente conocida como anandamida amidohidrolasa (Maurelli y cols., 1995), ahora conocida como Fatty Acid Amide Hydrolyase (FAAH), muestra gran actividad en regiones del SNC, como el hipocampo, tálamo y tallo cerebral (Giang y Cravatt, 1997; Thomas y cols., 1997), sugiriendo con esto que, ANA es degradada en regiones específicas como hipocampo, corteza, tallo, áreas relacionadas con aprendizaje y sueño.

El hecho de que ANA actúe en determinadas estructuras, ha sido sustentado con experimentos que demuestran que induce la activación de genes de expresión temprana como el *c-fos* en regiones como corteza, hipocampo y tallo cerebral (Patei y cols., 1998), lo cual indicaría que la presencia de ANA en estas regiones es necesaria para la modulación de percepción al dolor, control motor, aprendizaje y sueño.

Finalmente podemos señalar que existe una correlación entre la localización de los CB₁ (Felder y cols., 1996; Glass y cols., 1997) y las concentraciones de ANA en el SNC (Felder y cols., 1996), en donde se ha encontrado que regiones como hipocampo, corteza y tallo cerebral presentan las más elevadas concentraciones de este lípido, como se muestran en las siguientes tablas reportadas por Bisogno y cols. (1999).

Región	ANA (pmol/g)	NAPE (pmol/g)	2-AG (nmol/g)
Bulbo	44.9 ± 5.9	125.6 ± 64.6	10.5 ± 0.2
Corteza	13.6 ± 2.8	59.1 ± 36.8	4.3 ± 2.4
Sistema límbico	28.1 ± 19.8	252.2 ± 1.1	10.0 ± 5.1
Tallo cerebral	87.0 ± 45.1	358.5 ± 119.6	14.0 ± 7.1
Estriado	51.5 ± 24.4	265.8 ± 151.4	10.7 ± 0.3
Hipocampo	45.8 ± 2.6	178.2 ± 47.1	12.6 ± 1.8
Diencefalo	10.2 ± 2.2	136.6 ± 74.7	2.0 ± 0.1
Cerebrin	14.8 ± 7.0	84.2 ± 56.6	3.5 ± 2.4
Mesencéfalo	30.2 ± 17.7	271.8 ± 125.9	4.0 ± 2.6

Tabla 2. Cuantificación de ANA, NAPE y 2-AG en distintas regiones del SNC. Tabla modificada de: Bisogno T., Berrendero F., Ambrosino G., Cebeira M., Ramos J.A., Fernández-Ruiz J.J. and Di Marzo V. (1999). *Brain regional distribution of endocannabinoids: Implications for their biosynthesis and biological function*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 256: 377-380.

Región	Bmax (fmol/mg proteína)
Bulbo	344.1 ± 52.6
Corteza	476.6 ± 163.8
Sistema límbico	493.6 ± 132.9
Tallo cerebral	502.9 ± 93.4
Estriado	758.3 ± 127.7
Hipocampo	922.9 ± 283.2
Diencéfalo	661.2 ± 206.4
Cerebelo	1008.6 ± 236.5
Mesencéfalo	500.8 ± 225.4

Tabla 3. Niveles de pegado de cannabinoides en diferentes regiones del SNC calculados de acuerdo al desplazamiento del [³H]CP55940 y 5µM de Δ⁹-THC (Media ± EE). Tabla adaptada de: Bisogno T., Berrendero F., Ambrosino G., Cebeira M., Ramos J.A., Fernández-Ruiz J.J. and Di Marzo V. (1999). *Brain regional distribution of endocannabinoids: Implications for their biosynthesis and biological function*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 256: 377-380.

Recientemente se ha encontrado que ANA podría estar involucrada en patologías. Los reportes de Leweke y cols. (1999) y de Di Marzo y cols. (2000) demuestran que la ANA endógena podría modular conductas muy bien definidas. El primer grupo reportó elevadas concentraciones en LCR de pacientes que curzaban con esquizofrenia, mientras que el segundo grupo las detectó incrementadas en un modelo de Parkinson.

Sin embargo, hay evidencia sobre la localización de ANA en muestras no pertenecientes al SNC. Por ejemplo, en útero. Esta distribución nos ha intrigado por lo que hay numerosos investigadores tratando de averiguar cuál sería el papel de ANA en estas regiones (Paria y cols., 1996). Por otro lado, Di Tomasso y cols. (1996) reportaron la presencia de ANA en chocolate, mientras que Sepe y cols. (1998) la caracterizaron en 5

especies de moluscos. Estos autores concluyen que la presencia de ANA en este tipo de muestras, que pueden ser ingeridas en la dieta, podría modular funciones del SNC.

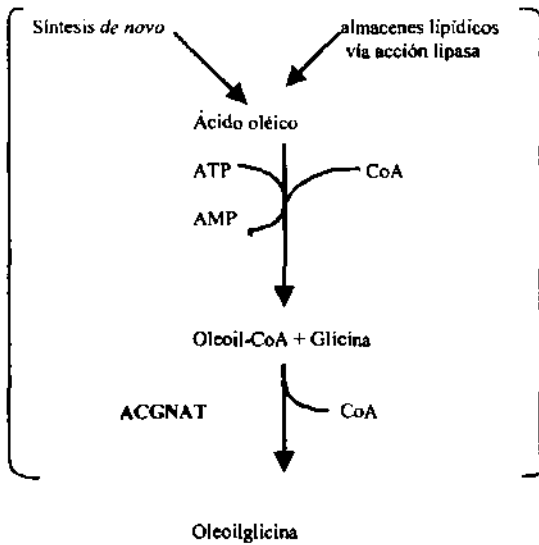
Por otro lado, con el desarrollo del antagonista selectivo para el CB₁, denominado SR141716A (Rinaldi-Carmona y cols., 1995), se iniciaron diversos estudios farmacológicos tratando de demostrar que las alteraciones ocasionadas por ANA eran a través de este receptor. Existe evidencia que señala que el empleo del antagonista puede bloquear las distintas alteraciones inducidas por ANA (Bisogno y cols., 1998; Mallet y Beninger, 1998; Mombouli y cols., 1999; William y Kikham, 1999; Costa y cols., 2000; Gerdeman y cols., 2001). Con esto, entonces se asume que los efectos que ANA ocasiona en el SNC son a través del receptor CB₁.

4.5.- Cis-9, 10-octadecenoamida, Oleamida(OLE).

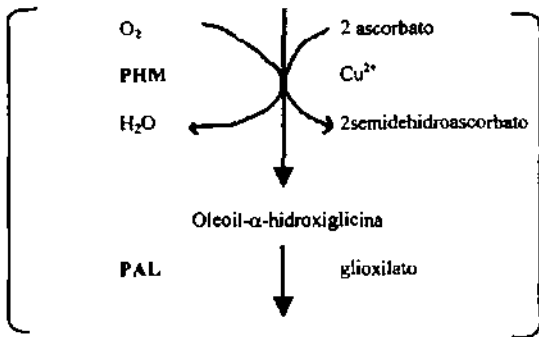
Como mencionamos previamente, Pierón (1913, revisado en Jones, 2000) sugirió que después de un proceso de privación de sueño, se acumulaba en el LCR una molécula que induce sueño. Bajo esta idea, recientemente, se descubrió la existencia de una molécula lipídica en el LCR de gatos privados de sueño conocida en un principio como cerebrotiene (Lerner y cols., 1994). Actualmente se ha identificado como cis-9, 10-octadecenoamida, conocida como oleamida (OLE) (Cravatt y cols., 1995).

Poco se sabe sobre la síntesis de éste lipido, pero existe la hipótesis de que OLE se deriva de la condensación entre amoníaco y ácido oléico (Cravatt y cols., 1996; Sugiura y cols., 1996). El mecanismo de degradación involucra a la FAAH descomponiendo a OLE en amoníaco y ácido oléico (Giang y Cravatt, 1997; Thomas y cols., 1997).

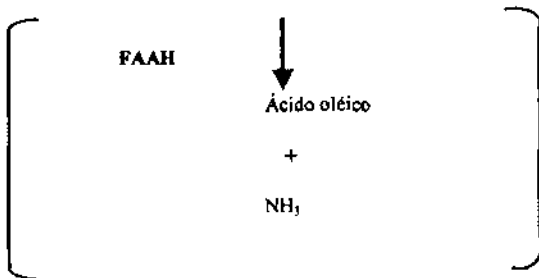
Debido a la distribución de esta enzima en regiones específicas del SNC, como en tálamo, se ha sugerido que OLE podría ser sintetizada y/o degradada en dicha región y de este modo, modular la generación del sueño tal como lo señalan Thomas y cols.(1997).



SUSTRATO PARA SÍNTESIS



BIOACTIVACIÓN



DEGRADACIÓN

Fig. 2. Vías de síntesis y de degradación de OLE. Abreviaciones: ATP, adenosina trifosfato; AMP, adenosina monofosfato; CoA, coenzima A; ACGNAT, acil CoA: glicina *N*-aciltransferasa; PHM, peptidiglicina α -hidroxilando monooxigenasa; PAL, peptidyl α -hidroxiglicina liasa; FAAH, amida hidrolasa de los ácidos grasos. Esquema tomado de: *Ritenour-Rodgers K.J., Driscoll W.J., Merkle K.A., Merkle D.J. and Mueller G.P. (2000). Induction of Peptidylglycine α -amidating monooxygenase in N₁₈TG₂ cells: A model for studying oleamide biosynthesis. Biochem. Biophys. Res. Comm. 267: 521-526.*

Los experimentos llevados a cabo para evaluar el papel de OLE en diferentes niveles han señalado que en el sistema inmunológico, OLE induce inmunosupresión (Langstein y cols., 1996). En el caso de estudios electrofisiológicos, ésta molécula es capaz de potenciar la acción de receptores a 5-HT tipo 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} (Huidobro-Toro y Harris, 1996; Boger y cols., 1998; Thomas y cols., 1998; Cheer y cols., 1999; Thomas y cols., 1999) mientras que puede incrementar las corrientes de Cl⁻ en los receptores tipo GABA_A (Lees y cols., 1998; Yost y cols., 1999). En el caso de las sinápsis eléctricas, OLE las inactiva de manera significativa (Guan y cols., 1997).

Recientemente el grupo de Mendelson describió los efectos de OLE en el sueño (Basile y cols., 1999) y demostraron que que las concentraciones de OLE se incrementaban con el tiempo de privación de sueño y que éstas declinaban, conforme el animal recuperaba su tiempo de sueño perdido. También demostraron que el efecto hipnótico de sueño inducido por OLE era bloqueado por el SR141716A (Mendelson y cols., 1999).

4.6 Enzimas intracelulares asociadas a la síntesis y degradación de los cannabinoides.

Como hemos visto, existen varias enzimas que participan en la síntesis de AA, ANA y OLE. Este dato señala que existen enzimas que podrían estar participando en los efectos que llevan a cabo estas moléculas, pero no existe evidencia sobre este punto. A continuación comentaremos algunos de ellos que en nuestro estudio analizamos.

A) Fosfolipasa A₂ (PLA₂).

La PLA₂ es el nombre de una enzima que participa en la liberación de ácidos grasos de la posición *sn*-2 de los fosfolípidos, generando glicerol y ácidos grasos libres y lisofosfolípidos.

El gen que codifica para la PLA₂ ha sido mapeado en el cromosoma 13 de rata y en el cromosoma 1q25 humano, por lo que la información que poseemos sobre esta enzima es cada vez más amplia (Tay y cols., 1995).

Generalmente se ha aceptado que existen dos tipos de PLA₂, la dependiente y la independiente de Ca²⁺ (Farooqui y cols., 1997). También pueden ser clasificadas de acuerdo a las características del sustrato, a su secuencia de aminoácidos, en función de su peso molecular. En ésta última categoría tenemos 4 clases de PLA₂: Tipo I, II, III y IV (Farooqui y cols., 1992).

El tipo I, II y III son enzimas consideradas de secreción ya que se encuentran en fluidos preferentemente de tipo pancreático. Estas PLA₂ poseen un bajo peso molecular (12-18 kDa) y dependen de concentraciones milimolares de Ca²⁺ para su actividad. Por otro lado, la tipo IV es una enzima intracelular que se caracteriza por poseer un elevado peso molecular (39-110 kDa), y se localiza preferentemente en el citosol. Las PLA₂ tipo IV también son clasificadas en dos grupos de acuerdo a su dependencia de Ca²⁺. Las dependientes de Ca²⁺ necesitan de 10-1000 nM de Ca²⁺ para su activación (Farooqui y cols., 1997).

Por otro lado, la PLA₂ ha sido relacionada con diversas funciones controladas por el SNC. Por ejemplo, se sabe que la inducción de LTP en el giro dentado resulta en la activación de la PLA₂ así como de la liberación del AA de los fosfolípidos membranales, 2.5 min después de la inducción (Williams y cols., 1989); mientras que su inhibición ocasiona efectos amnésicos en animales entrenados en el paradigma de la prevención pasiva (Hölscher y Rose, 1994). También participa en regeneración neuronal de neuronas noradrenérgicas ya que la adición de un activador de PLA₂, como es el melittin (100 μM) induce regeneración de axones noradrenérgicos (Nakumara, 1993). Finalmente, se le ha asociado con enfermedades como la esquizofrenia, en donde pacientes que presentan éste cuadro muestran elevadas concentraciones de esta enzima (Ross y cols., 1995).

Para caracterizar las funciones de la PLA₂, se han utilizado fármacos que incrementan o decrementan su actividad. Entre los fármacos que inhiben a la PLA₂ se encuentran la quinacrina, manoolida y al ácido nordihidroguaiarético (NDGA), el cual fue empleado en nuestros estudios (Farooqui y cols., 1997).

Se sabe que el sustrato liberado en la membrana por la PLA₂ es el AA. Existen por lo menos dos rutas descritas por las cuales la PLA₂ es activada; una involucra un sitio en donde la PLA₂ fosforila una serina (Ser 505) y la otra sugiere que el Ca²⁺ se une en la PLA₂ en una región conocida como *dominio de unión lipídica dependiente de Ca²⁺* o *Ca²⁺-dependent lipid-binding domain* en inglés (CaLB), y está localizado en el amino terminal de

la PLA₂ (Lih y cols., 1993) y de este modo una vez activada, libera AA de la membrana celular. Por otro lado, la liberación de AA vía PLA₂ es mediada a través de receptores que emplean PG (Axelrod, 1990). Murayama y cols. (1990) apoyan esta hipótesis al reportar que anticuerpos contra las subunidades beta (β)- gamma (γ) de PG inespecíficas, inhiben la actividad de la PLA₂. Si esta enzima es activada por receptores metabotrópicos, no podemos descartar que probablemente una vez que se active el CB₁ por parte de ANA, AA u OLE, este active a la PLA₂ y forme parte de los elementos reclutados para llevar a cabo los efectos desatados por el ligando. Aunque existe evidencia que señala la participación de la PLA₂ en diversas funciones, no hay datos que indiquen la participación de esta enzima en la modulación del ciclo sueño-vigilia. A pesar de esto, podemos sugerir que la PLA₂ es activada a través de PG, las cuales están acopladas a receptores metabotrópicos (Ver Fig. 3).

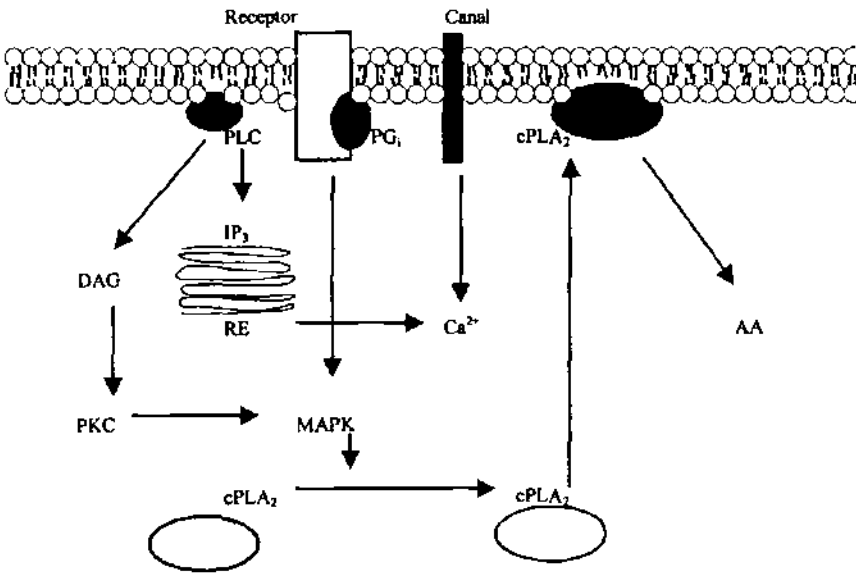


Fig. 3. Elementos propuestos para la activación de la PLA₂. En este modelo, se presenta una activación de la PLA₂ por Ca²⁺ así como la fosforilación de la PLA₂ por medio de la MAPK. Una vez que un ligando se acopla a su receptor metabotrópico (ANA/OLE/AA? con el CB₁) se activa una PLC. Esto desencadena una cascada de señales generando la formación de inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) y 1,2-diacilglicerol (DAG). El IP₃ ocasiona una movilización de Ca²⁺ intracelular del retículo endoplasmático (RE). Alternativamente, el incremento de Ca²⁺ intracelular puede ser resultado de la activación de receptores tipo canal. El incremento del Ca²⁺ intracelular ocasiona que la PLA₂ se transloque

del citosol a la membrana celular donde a partir de fosfolípidos, puede liberar AA. Por otro lado, DAG activa PKC y de este modo, se puede activar la MAPK. La activación de la MAPK puede ser una ruta alterna para fosforilar a la PLA₂ en una serina 505 y así, incrementar la actividad de esta enzima. Esquema tomado de: *Lib-Ling L., Wartmann M., Lin A.Y., Knopf J.L., Seth A. and Davis R.J. (1993); cPLA₂ is phosphorylated and activated by MAP Kinase. Cell 72: 269-278.*

B) Fosfolipasa C (PLC).

En el caso de la PLC, se sabe que existen 3 familias de isoenzimas: PLC beta (PLC β), PLC gamma (PLC γ) y PLC sigma (PLC δ). PLC γ y PLC δ presentan una actividad dependiente de Ca²⁺. Dentro de los diversos productos que la PLC genera tenemos al fosfatidilinositol (PtdIns), fosfatidilinositol 4-fosfato (PtdIns 4-P), PtdIns 4,5-P₂ los cuales son hidrolizados por la PLC a partir de fosfolípidos membranales (Rhee y Choi, 1992). El mecanismo por el cual la PLC es activada se relaciona con varios sitios de fosforilación, como Lisina (Lys-438, Lys-440), Ser-522, y Arginina (Arg-549). De este modo, se asegura que esta enzima sea activada a través de distintos sitios localizados en su propia estructura. Los elementos que se generan en la cascada de señales iniciada por la PLC son numerosos, por ejemplo tenemos que la hidrólisis de polifosfoinositidos (PI) liberan IP₃, el cual promueve la liberación de Ca²⁺ de almacenes intracelulares y de DAG seguido de la activación de PKC (Katan, 1998).

Por otro lado, se ha demostrado que la PLC es activada a través de receptores con actividad tirosina cinasa. Sin embargo, también se pueden activar por otro tipo de receptores (Katan, 1998). La PLC se encuentra acoplada a receptores que no poseen actividad de tirosina cinasa, por ejemplo, los muscarínicos tipo M3. Además, se ha reportado que la actividad de la PLC puede ser bloqueada empleando toxinas como la pertusis (PTX). De este modo se sugiere que además de estar acoplada a este tipo de receptores, necesita de las PG para poder llevar a cabo la transducción de señales (Schmidt y cols., 1996). Sabemos que las PG son heterotrimeros formados por una subunidad alfa (α), beta (β) y gamma (γ) (Birbaumer L, 1990). Estas pueden modular por lo menos dos sistemas ya descritos, el del AC estimulándolo (Rodbell y cols., 1971) o inhibiéndolo (Birbaumer y cols., 1974); y el segundo, que involucra procesos membranales incluyendo la activación de PLA₂ (Cockroft y Gomperts, 1985). Parece ser que las subunidades β

actúan en un sitio catalítico ocasionando la activación de la PLC y de este modo, ocasionan un cambio conformacional en la estructura de la PLC y así se iniciaría la activación de esta enzima (Sankaran y cols., 1998).

Existen fármacos que pueden inhibir la actividad de la PLC, como el U73122 (Bosch y cols., 1998; Jan y cols., 1998; Fan y cols., 1998). El U73122 es un aminoesteriodes permeable a la membrana, su mecanismo de acción propuesto describe un bloqueo de la producción de IP_3 y como consecuencia, decrementa la liberación de Ca^{2+} de las pozas intracelulares que residen en el RE. También se ha propuesto que podría interferir con el acoplamiento entre las subunidades de la PG y la PLC (Thompson y cols., 1991) y finalmente se ha sugerido que podría actuar a nivel del sustrato de la PLC y disminuir su actividad a este nivel (Vickers, 1993).

El hecho de que la PLC está acoplada a receptores metabotrópicos, como ya lo hemos señalado, sugiere que esta enzima podría ser activada por receptores CB_1 . De este modo, la PLC parecería ser otro elemento involucrado en las alteraciones ocasionadas por los endocannabinoides.

V.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El hecho de que el AA, ANA y OLE modifiquen el sueño a través del receptor CB_1 , es una hipótesis sustentable como sugiere la evidencia aportada anteriormente. En el caso de ANA porque es el ligando natural y OLE porque existen reportes que comprueban su unión con este receptor. El AA, porque éste lípido comparte características estructurales con ANA, de tal modo que no se descarta que también se una al CB_1 . Además, por diversos grupos se ha reportado que los efectos de ANA y OLE son bloqueados empleando el SR141716A.

Por otro lado, como comentamos anteriormente, la PLA_2 es activada por receptores metabotrópicos. Este hecho sugiere que dicha enzima podría ser activada por el CB_1 . De

este modo, sugerimos que la activación de una PLA₂ es una ruta alterna por la cual el AA, ANA y OLE llevan a cabo sus efectos.

Finalmente, se ha demostrado que el CB₁ activa a la PLC (Gruol y cols., 1999; Ho y cols., 1999), sugiriendo que este receptor está acoplado a una proteína enzimática que amplifica la respuesta inducida por los ligandos endógenos.

De tal modo que en nuestro estudio decidimos evaluar si AA, ANA y OLE modifican el sueño y si esta modificación es a través del CB₁. Además, evaluamos si se requiere de la participación de la PLA₂ (necesaria en la síntesis de AA y activada por receptores metabotrópicos) y de la PLC (acoplada a receptores metabotrópicos y activada por el CB₁).

5.1 Hipótesis.

La hipótesis general de nuestro trabajo fue que los lípidos AA, ANA y OLE participan en la modulación del ciclo sueño-vigilia.

Las hipótesis específicas planteadas fueron las siguientes:

Hipótesis 1: El AA, ANA y OLE modifican el sueño.

Hipótesis 2: El SR141716A bloquea los efectos inducidos sobre el sueño por el AA, ANA y OLE.

Hipótesis 3: El NDGA y el U73122 previenen las alteraciones ocasionadas por el AA, ANA y OLE.

Hipótesis 4: El AA, ANA y OLE modifican el sueño al ser administradas en el núcleo pedunculopontino tegmental.

Hipótesis 5: Las alteraciones en el sueño ocasionadas por el AA, ANA y OLE en el núcleo pedunculopontino tegmental son bloqueadas empleando el SR141716A, antagonista al receptor canabinoide CB₁.

Hipótesis 6: La microinyección del NDGA y el U73122 bloquearán los cambios en el sueño ocasionados por la administración del AA, ANA y OLE en el núcleo pedunculopontino tegmental.

5.2 Objetivos.

En base a los antecedentes mencionados y al planteamiento del problema, definimos el objetivo general del presente estudio.

A.- Analizar los efectos de AA, ANA y OLE sobre el sueño cuando son administrados icv o en PPTg.

Los objetivos específicos fueron:

B.- Evaluar si las alteraciones ocasionadas en el sueño después de la administración icv y en PPTg de AA, ANA y OLE pueden ser bloqueadas por el SR141716A, NDGA y el U73122.

VI.-MÉTODOS.

6.1 Materiales.

Para el presente estudio se emplearon ratas macho de la cepa Wistar con un peso entre 280-320 gm. las cuales se mantuvieron con acceso a agua y comida *ad libitum*. Se utilizó además un estereotáxico (David Kopf), material para cirugía, electrodos de acero inoxidable para el registro del EEG, EMG, cánulas, cánulas-guía, microjeringas Hamilton, pentobarbital sódico, jeringas, antibióticos, cemento y acrílico dental. Además empleamos un polígrafo Grass, papel, tinta para el registro polisomnográfico, una PC con el programa estadístico STATVIEW.

ANA, AA, el NDGA así como el U73122 fueron comprados en Sigma (U.S.A.), mientras que el SR141716A fue donado por Research Triangle Institute (U.S.A.). OLE fue donada por The Scripps Research Institute (U.S.A.).

6.2 Procedimiento

6.2.1 Cirugía e implantación.

a) Administraciones intracerebroventriculares.

Ciento cinco ratas macho Wistar (280-320 g) fueron empleadas en esta parte del experimento. Los animales se colocaron en cajas individuales en el bioterio con una temperatura ambiente de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ con un periodo de luz-obscuridad de 08.00 a 20.00 hrs. (Las luces se encendían a las 8:00 hrs.). Todos las ratas tuvieron acceso a comida y agua *ad libitum*. Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (40 mg/kg, ip), y una vez que los animales estaban anestesiados, fueron colocados en el estereotáxico (David Kopf) para la cirugía.

Tres electrodos de acero inoxidable se fijaron en los huesos parietales y frontales del cráneo de las ratas. Dos electrodos más fueron insertados en los músculos del cuello de los animales, de tal modo que se pudo registrar la señal del EEG y el EMG, respectivamente. Una cánula calibre 23 fue implantada estereotáxicamente en el ventrículo

lateral derecho (VLD) de acuerdo al Atlas de Paxinos y Watson (1986) (AP=-0.8, L=1.4, H=-3.8). Todos los electrodos y la cánula se cubrieron con cemento dental.

b) Administraciones en el núcleo pedunculopontino tegmental.

En esta parte del estudio se emplearon 50 ratas macho Wistar (280-320 g) las cuales fueron operadas bajo las mismas condiciones que anteriormente describimos. Además de los electrodos para el registro el EEG y EMG, se implantó estereotóxicamente una cánula en el núcleo pedunculopontino tegmental (PPTg), de acuerdo al Atlas de Paxinos y Watson (1986) (AP=-7.9 mm, L=1.5 mm, H=-7.2 mm). La cánula-guía permaneció ≈ 1.0 mm por encima del PPTg. Todos los electrodos y la cánula se cubrieron con cemento dental.

Todos los animales fueron colocados por separado en cajas por un periodo no menor a 7 días (periodo post-operatorio) para su recuperación, en un ambiente con una temperatura $21 \pm 1^\circ\text{C}$, con un periodo de luz-obscuridad de 12-12 hrs. (08.00 a 20.00 hrs.) y la comida y el agua estuvieron disponibles *ad libitum*. Una semana después de la cirugía, los animales se habituaron a las condiciones de registro por lo menos durante 24 hrs. Una vez concluido el periodo de habituación, se llevaron a cabo los experimentos.

6.2.2 Administraciones intracerebroventriculares.

Administración de AA, ANA y OLE. Para las administraciones icv, 18 grupos se formaron: El primer grupo, Control (Ctl, n=10) recibió 5 μl de vehículo (ethanol 5% en salina); el 2º grupo (n=10) recibió ANA (1.25 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$); el 3er grupo (n=5) recibió 1 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ de AA.

Para el análisis de los efectos de OLE, se construyó una curva dosis-respuesta, de tal modo que empleamos 3 grupos iguales (n=5), los cuales fueron tratados con 1 μg , 25 μg y 50 μg . Todas las dosis en un volumen de 5 μl .

SR141716A. En el caso del SR141716A, este se administró a una dosis de 3 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$. Después, para determinar su potencial bloqueo, formamos los siguientes grupos iguales

(n=5) en donde se administró SR141716A (3µg/2.5µl) y 15min después recibió AA (1µg/2.5µl), ANA (1.25µg/ 2.5µl) u OLE (25µg/2.5µl).

NDGA. Para evaluar si la administración del NDGA podía bloquear los efectos inducidos por AA, ANA y OLE empleamos el siguiente esquema metodológico: Se emplearon 4 grupos iguales (n=5). El primer grupo recibió 30.24µg/5µl del NDGA. Los tres grupos restantes recibieron NDGA (30.24µg/2.5µl) y 15min después recibieron AA (1µg/2.5µl), ANA (1.25µg/ 2.5µl) u OLE (25µg/2.5µl).

U73122. Finalmente, en el caso del experimento en donde trabajamos con el U73122, seguimos el mismo esquema anteriormente descrito. Aquí se utilizaron 4 grupos iguales (n=5). El grupo de U73122 recibió 9.2µg/5µl y empleamos tres grupos más en donde se administró el U73122 (9.2µg/2.5µl) y 15min después recibió AA (1µg/2.5µl), ANA (1.25µg/ 2.5µl) u OLE (25µg/2.5µl).

6.2.3 Administraciones en el núcleo pedunculopontino tegmental.

Administración de AA, ANA y OLE. Para los experimentos en administraciones en PPTg, 10 grupos iguales se formaron (n=5): El grupo Ctl recibió 1 µl de vehículo; a los grupos que recibieron AA y ANA se les administró la misma dosis que en el experimento icv, con excepción del grupo que recibió OLE. A este último se le microinyectó 25µg. Todas las administraciones se realizaron en un volumen de 1µl.

SR141716A. En la sección del experimento en donde trabajamos con el SR141716A, se emplearon 2 grupos iguales (n=5). Al primer grupo se le administró SR141716A (3 µg/1 µl) y al último grupo se le microinyectó SR141716A (3µg/0.5µl) y 15 min. después recibió ANA (1.25µg/0.5µl).

NDGA. En esta parte del experimento se utilizaron 2 grupos (n=5). El grupo 1 recibió NDGA (30.24µg/1µl) y al grupo 2 se le administró NDGA (30.24µg /0.5µl) y 15 min. después ANA (1.25 µg/0.5µl)

U73122. En esta última sección del experimento, se emplearon 10 ratas divididas en dos grupos iguales ($n=5$). A un grupo se le microinyectó U73122 ($9.2\mu\text{g}/1\mu\text{l}$) y al siguiente grupo U73122 ($9.2\mu\text{g}/0.5\mu\text{l}$) y 15 min. después ANA ($1.25\mu\text{g}/0.5\mu\text{l}$).

Todas las administraciones se realizaron a un flujo de $1\mu\text{l}/\text{min}$. El inyector se proyectó ≈ 1.0 mm más allá de la cánula-guía y fue mantenido por lo menos durante 1 min. Al final de la microinyección, se colocó de nuevo el mandril en la cánula-guía.

Todas las ratas se registraron inmediatamente después de las microinyecciones durante un tiempo de 4 hrs comenzando a las 8:00A.M. Para los registros de sueño, se empleó un polígrafo Grass Modelo 7 (papel 5mm/seg) y los registros una vez concluidos, se calificaron visualmente clasificándolos en 4 estados de vigilia: VIG, SOL1, SOL2 y SMOR.

Al final de todos los experimentos, los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico y se perfundieron intracardialmente con PBS seguido de paraformaldehído al 10%. Los cerebros se removieron y fueron preparados para histología. Congelados, los cerebros fueron cortados a $50\mu\text{m}$ y se tiñeron con violeta de Cresilo para la verificación de la posición de la cánula.

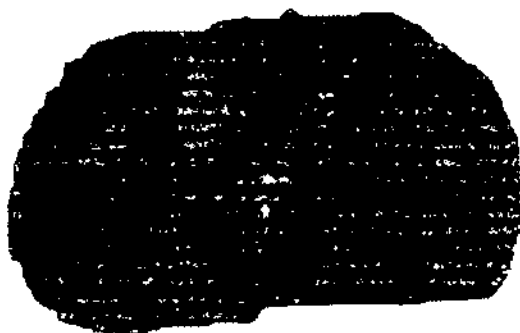
6.3 Análisis estadístico de los datos.

Los datos se analizaron en base al tiempo total de los estados de vigilia expresados en porcentajes (Media \pm EE). El análisis estadístico se llevo a cabo empleando el programa STATVIEW, en donde con un análisis de varianza (ANOVA) se determinaron las diferencias de los tratamientos. Una vez que se encontraron diferencias estadísticamente significativas, se empleó la prueba post hoc de *Sheffé*. En todos los casos, se determinaron las diferencias estadísticas con un nivel de significancia $p \leq 0.05$.

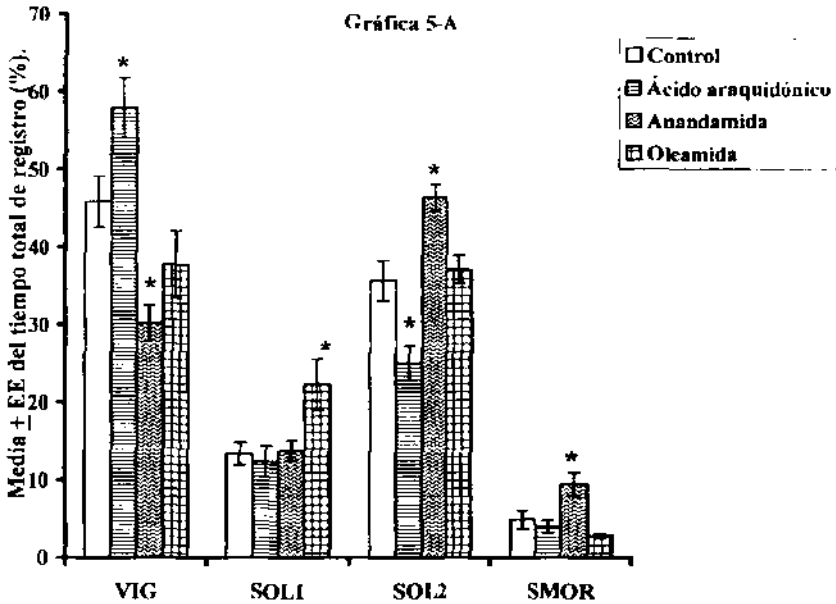
VII.- RESULTADOS.

a) Administraciones intracerebroventriculares de AA, ANA y OLE.

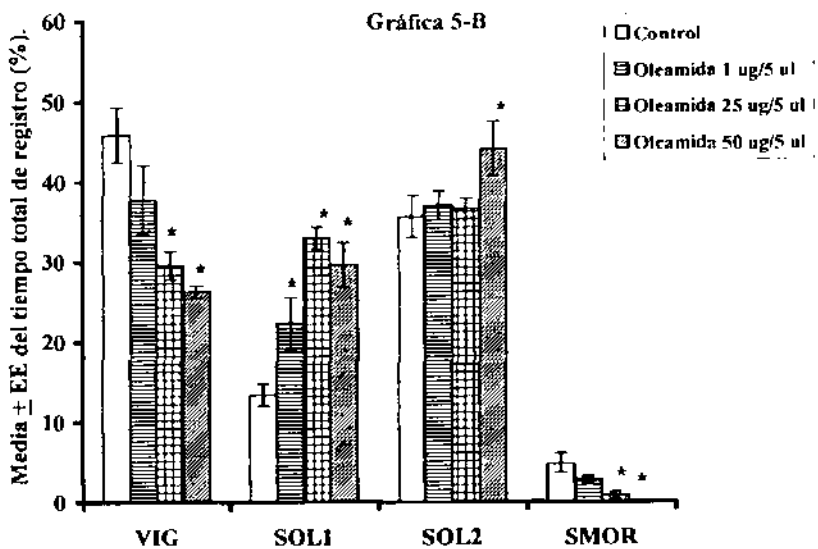
Antes de describir los resultados de nuestro estudio, mostramos en el siguiente corte histológico, la posición de la cánula.



Al analizar los estados de vigilancia después de 4 hrs. de registro, encontramos en la Gráfica 5-A que la administración de AA indujo un incremento en la VIG mientras que el SOL2 disminuyó. Por otro lado, el grupo tratado con ANA presentó un decremento de la VIG así como un incremento del SOL2 y del SMOR. El grupo tratado con OLE aunque presenta una tendencia a decrementar la VIG y el SMOR, esto no es significativo por lo que solo ocasionó un incremento significativo en el SOL1 (VIG, $GL=3,31$; $F=12.855$, ANOVA, $p<0.0001$; Control vs. Anandamida $p<0.01$ por Sheffé; Control vs. Ácido araquidónico $p<0.01$ por Sheffé. SOL1, $GL=3,31$; $F=3.972$, ANOVA, $p<0.01$; Control vs. Oleamida $p<0.05$ por Sheffé. SOL2, $GL=3,31$; $F=16.506$, ANOVA, $p<0.0001$; Control vs. Anandamida $p<0.01$ por Sheffé; Control vs. Ácido araquidónico $p<0.01$ por Sheffé. SMOR, $GL=3,31$; $F=5.125$, ANOVA, $p<0.005$; Control vs. Anandamida $p<0.01$ por Sheffé. * vs. Control).

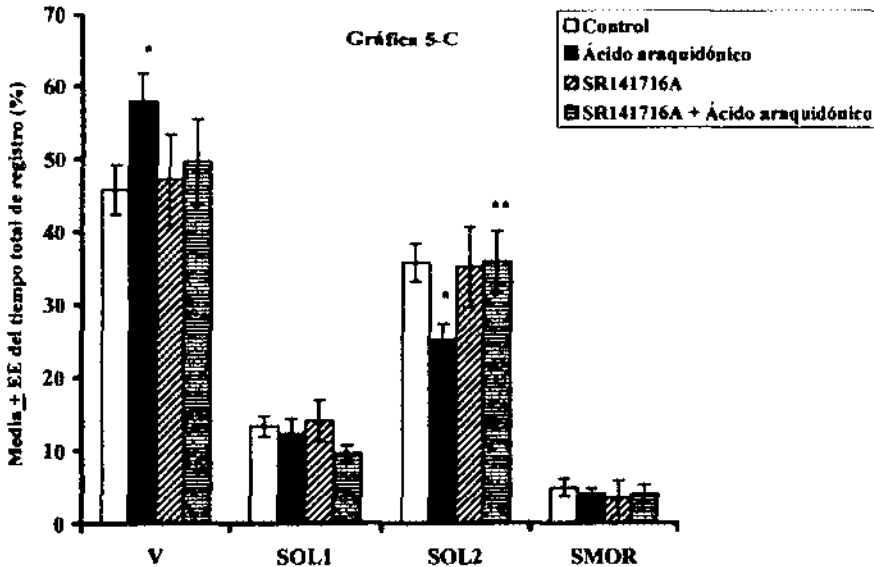


Dado que la dosis original que manejamos no ocasionó cambios significativos, decidimos aumentar la dosis de tal modo que los efectos que OLE ocasiona en el sueño, claramente se aprecian en la curva dosis respuesta que desarrollamos, mostrada en la Gráfica 5-B (VIG. $GL=3,21$; $F=7.67$, ANOVA, $p<0.001$; Control vs. Oleamida ($25\mu\text{g}/5\mu\text{l}$) $p<0.01$ por Sheffé; Control vs. Oleamida ($50\mu\text{g}/5\mu\text{l}$) $p<0.004$ por Sheffé. SOL1, $GL=3,21$; $F=18.534$, ANOVA, $p<0.0001$; Control vs. Oleamida ($1\mu\text{g}/5\mu\text{l}$) $p<0.05$ por Sheffé; Control vs. Oleamida ($25\mu\text{g}/5\mu\text{l}$) $p<0.0001$ por Sheffé; Control vs. Oleamida ($50\mu\text{g}/5\mu\text{l}$) $p<0.0003$ por Sheffé. SOL2, $GL=3,21$; $F=1.926$, ANOVA, $p<0.01$; Control vs. Oleamida ($50\mu\text{g}/5\mu\text{l}$) $p<0.03$ por Sheffé. SMOR, $GL=3,21$; $F=4.588$, ANOVA, $p<0.012$; Control vs. Oleamida ($25\mu\text{g}/5\mu\text{l}$) $p<0.012$ por Sheffé; Control vs. Oleamida ($50\mu\text{g}/5\mu\text{l}$) $p<0.0317$ por Sheffé. * vs. Control).



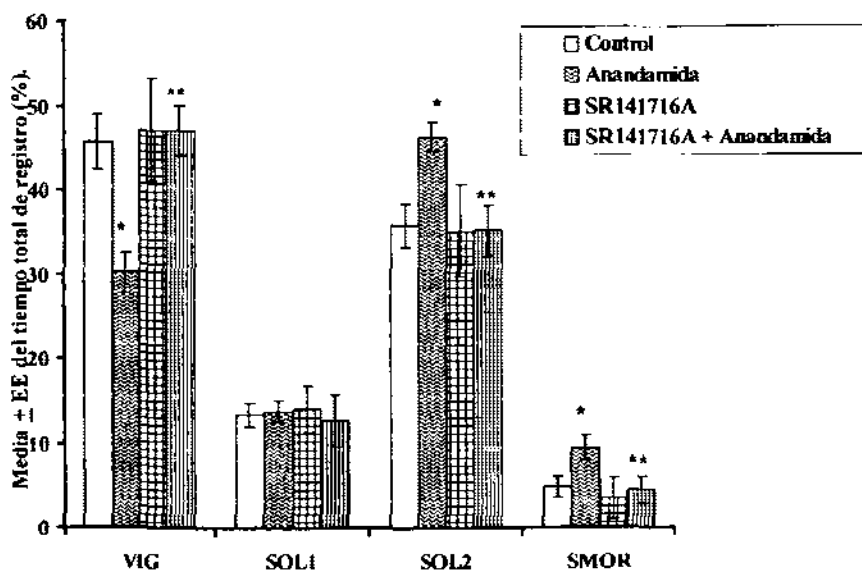
SR141716A.

Los resultados mostrados en la Gráfica 5-C, señalan que el SR141716A no modificó la arquitectura del ciclo sueño-vigilia; este dato concuerda con el reportado por Mendelson y cols. (1999). Sin embargo, el SR141716A fue incapaz de bloquear por completo del efecto descrito anteriormente del AA. Como podemos observar, el incremento que se presenta en la VIG después de la administración del AA persiste aún en presencia del SR141716A, mientras que el decremento en el SOL2 es bloqueado (VIG. $GL= 3,26$; $F= 1.866$, ANOVA, $p<0.01$; Control vs. Ácido araquidónico $p<0.03$ por Sheffé. SOL1, $GL=3,26$; $F= 0.709$, ANOVA, $p<0.05$. SOL2, $GL= 3,26$; $F= 3.074$, ANOVA, $p<0.04$; Control vs. Ácido araquidónico $p<0.01$ por Sheffé; Ácido araquidónico vs. SR141716A + Ácido araquidónico $p<0.03$ por Sheffé. SMOR, $GL= 3,26$; $F= 0.184$, ANOVA, $p>0.906$. * vs. Control).



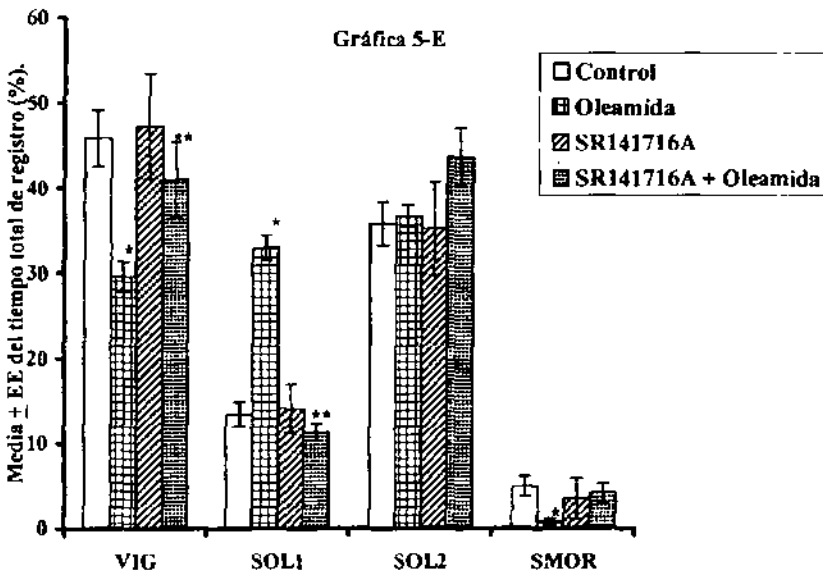
Cuando administramos SR141716A + ANA, encontramos que las alteraciones ocasionadas por ANA, son revertidas (VIG, $GL=3,26$; $F=6.117$, ANOVA, $p<0.0027$; Control vs. Anandamida $p<0.01$ por Sheffé; Anandamida vs. SR141716A + Anandamida $p<0.036$ por Sheffé. SOL1, $GL=3,26$; $F=0.079$, ANOVA, $p>0.971$. SOL2, $GL=3,26$; $F=4.059$, ANOVA, $p<0.01$; Control vs. Anandamida $p<0.05$ por Sheffé; Anandamida vs. SR141716A + Anandamida $p<0.01$ por Sheffé. SMOR, $GL=3,26$; $F=2.744$, ANOVA, $p<0.05$; Control vs. Anandamida $p<0.03$ por Sheffé; Anandamida vs. SR141716A + Anandamida $p<0.05$ por Sheffé. * vs. Control; ** vs. Anandamida).

Gráfica 5-D



Finalmente, en la Gráfica 5-E encontramos que, al utilizar la dosis media de OLE (25 μ g) se presenta un decremento tanto en la VIG como en el SMOR, mientras hay aumento de manera considerable en la cantidad de SOL1. La administración de SR141716A como bien ya mencionamos antes, no modificó al sueño. La inyección de SR141716A y 15

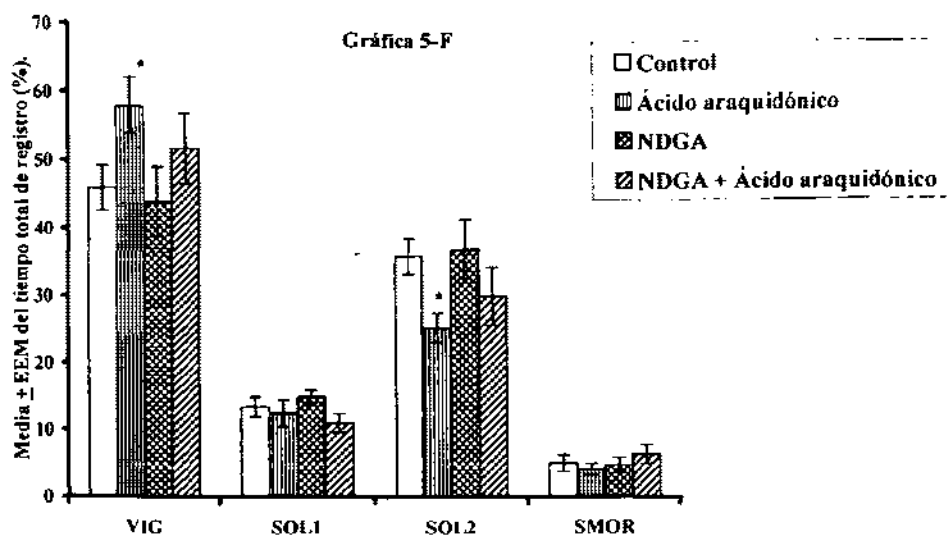
min. después OLE, bloqueó únicamente el decremento en la VIG y el aumento en el SOL1, podemos observar que existe una tendencia a revertir la disminución en el SMOR, pero éste no alcanza significancia estadística (VIG, $GL= 3,21$; $F= 3.377$, ANOVA, $p<0.0375$; Control vs. Oleamida $p<0.008$ por Sheffé; Oleamida vs. SR141716A + Oleamida $p<0.05$ por Sheffé. SOL1, $GL=3,21$; $F= 27.516$, ANOVA, $p<0.0001$; Control vs. Oleamida $p<0.0001$ por Sheffé; Oleamida vs. SR141716A + Oleamida $p<0.0001$ por Sheffé. SOL2, $GL= 3,21$; $F= 1.131$, ANOVA, $p>0.3592$. SMOR, $GL= 3,21$; $F= 1.334$, ANOVA, $p< 0.05$; Control vs. Oleamida $p<0.05$ por Sheffé. * vs. Control; ** vs. Oleamida).



NDHA.

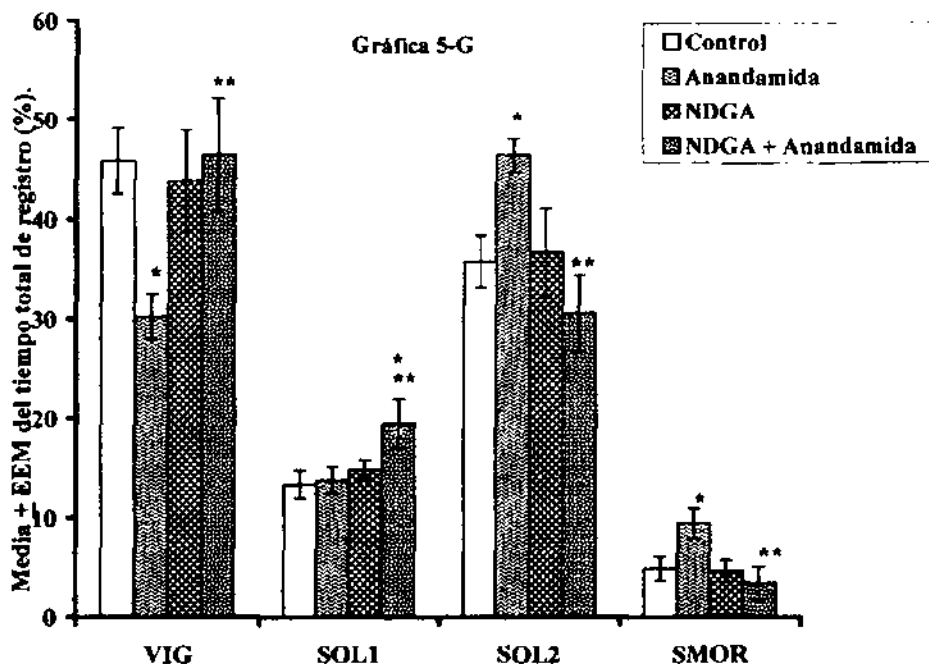
Después de describir que el bloqueo del receptor CB_1 prevenía las alteraciones inducidas por el AA, ANA y, decidimos explorar las probables vías intracelulares activadas por estos lípidos. Para esto, administramos el inhibidor de la PLA_2 , el NDGA. Cuando administramos este fármaco ($30.24\mu g$), no se modificaron los tiempos totales de los estados de vigilancia *per se*. Cuando lo administramos 15 min. antes de AA encontramos que éste

no logra bloquear los efectos ya descritos del AA (VIG. $GL= 3,26$; $F= 2.852$. ANOVA, $p<0.05$; Control vs. Ácido araquidónico $p<0.02$ por Sheffé. SOL1, $GL=3,26$; $F= 1.959$. ANOVA, $p>0.1450$. SOL2, $GL= 3,26$; $F= 2.361$. ANOVA, $p<0.05$; Control vs. Ácido araquidónico $p<0.03$ por Sheffé. SMOR, $GL= 3,26$; $F= 0.536$, ANOVA, $p> 0.6617$. Gráfica 5-F * vs. Control).

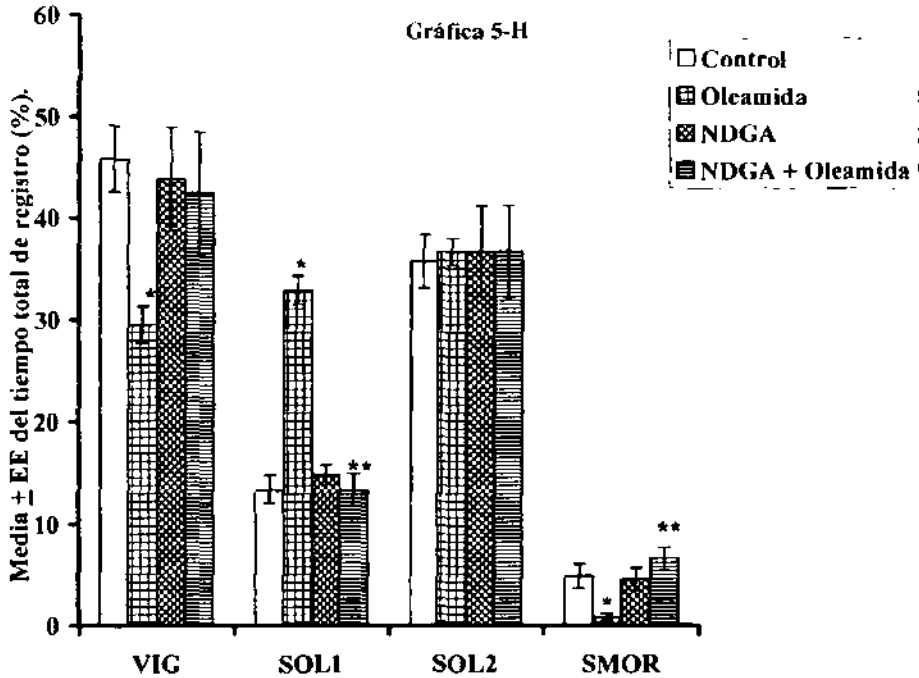


En la Gráfica 5-G encontramos que la administración del NDGA antes de ANA, bloquea los efectos ocasionados por ANA descritos anteriormente, indicando con esto que ANA modifica el sueño activando una PLA_2 (VIG. $GL= 3,31$; $F= 3.490$, ANOVA, $p<0.02$; Control vs. Anandamida $p<0.05$ por Sheffé; Anandamida vs NDGA + Anandamida $p<0.02$ por Sheffé. SOL1, $GL=3,31$; $F= 2.472$. ANOVA, $p<0.05$; Control vs. NDGA + Anandamida $p<0.01$ por Sheffé; Anandamida vs. NDGA + Anandamida $p<0.02$ por Sheffé. SOL2, $GL= 3,31$; $F= 3.663$, ANOVA, $p<0.02$; Control vs. Anandamida $p<0.01$ por Sheffé; Anandamida vs. NDGA + Anandamida $p<0.04$ por Sheffé. SMOR, $GL= 3,31$; $F= 3.477$,

ANOVA, $p < 0.02$; Control vs. Anandamida $p < 0.02$ por Sheffé; Anandamida vs. NDGA + Anandamida $p < 0.01$ por Sheffé. * vs. Control; ** vs. Anandamida).



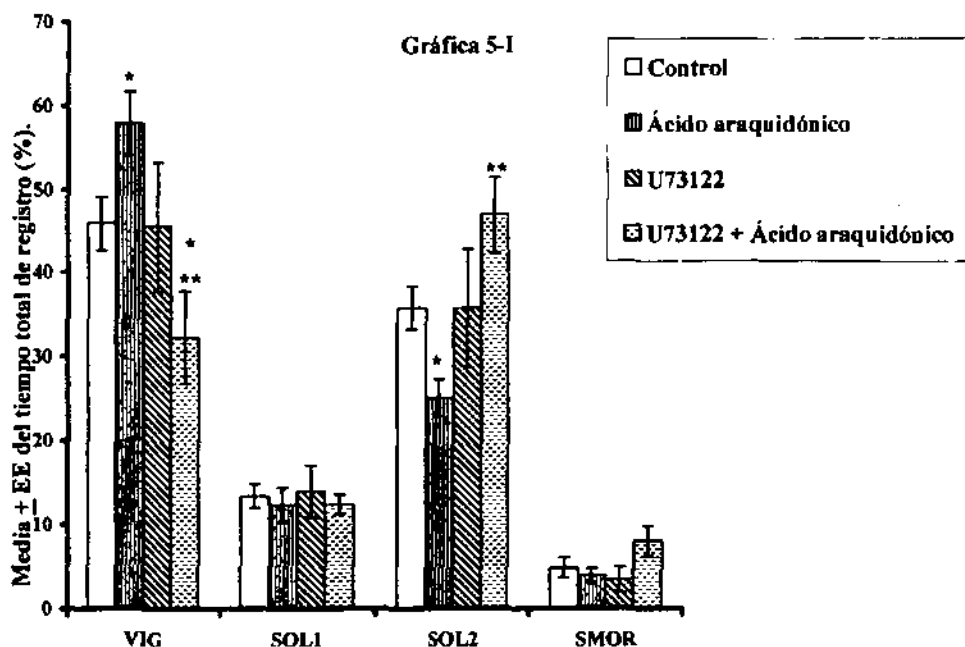
Los resultados del último experimento se encuentran en la Gráfica 5-H, la cual muestra que solamente el incremento en el SOL1 y el decremento observado en el SMOR ocasionados ambos por OLE, son revertidos por el NDGA (VIG, $GL= 3,25$; $F= 2.010$, ANOVA, $p<0.05$; Control vs. Oleamida $p<0.02$ por Sheffé. SOL1, $GL=3,25$; $F= 33.917$, ANOVA, $p<0.0001$; Control vs. Oleamida $p<0.0001$ por Sheffé; Oleamida vs. NDGA + Oleamida $p<0.0001$ por Sheffé. SOL2, $GL= 3,25$; $F= 0.021$, ANOVA, $p>0.9957$. SMOR, $GL= 3,25$; $F= 2.562$, ANOVA, $p<0.05$; Control vs. Oleamida $p<0.03$ por Sheffé; Oleamida vs. NDGA + Oleamida $p< 0.01$ por Sheffé. * vs. Control; ** vs. Oleamida).



U73122

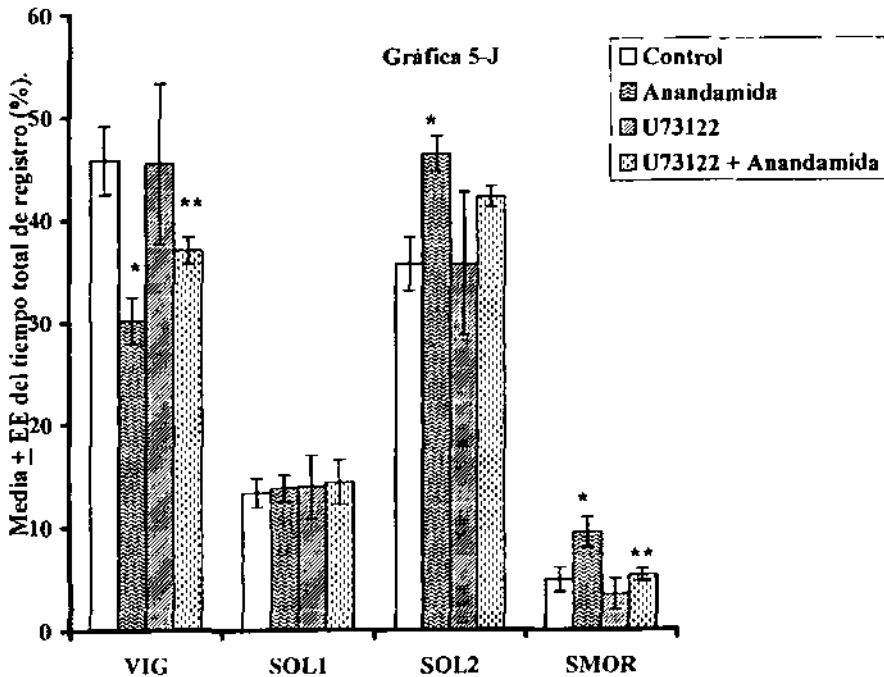
Hasta el momento, habíamos encontrado que al bloquear el receptor para cannabinoides, el CB₁, lográbamos revertir los efectos inducidos por los lípidos cerebrales AA, ANA y OLE. Además inhibiendo la actividad de la PLA₂, lográbamos parcialmente bloquear los efectos inducidos por los lípidos ya descritos. Este dato indicaba que además del CB₁, las moléculas que estudiamos, empleaban a la PLA₂ para llevar a cabo las alteraciones del sueño. Sin embargo, se ha descrito que el receptor CB₁ activa una PLC, por lo que en esta última parte del estudio, decidimos trabajar con un inhibidor de la PLC, el U73122 y de este modo evaluar si ésta podría ser una ruta más por la cual AA, ANA y OLE modificaban el sueño.

En la Gráfica 5-I observamos que la administración de U73122 (9.2µg) no modifica la arquitectura del ciclo sueño-vigilia. Una vez administrado 15 min. antes de AA, éste bloquea los efectos ocasionados por el AA (VIG. $GL= 3,26$; $F= 4.700$, ANOVA, $p<0.0094$; Control vs. Ácido araquidónico $p<0.04$ por Sheffé; Ácido araquidónico vs. U73122 + Ácido araquidónico $p<0.01$ por Sheffé. SOL1, $GL=3,26$; $F= 0.108$, ANOVA, $p>0.9547$. SOL2, $GL= 3,26$; $F= 5.705$, ANOVA, $p<0.0039$; Control vs. Ácido araquidónico $p<0.02$ por Sheffé; Ácido araquidónico vs. U73122 + Ácido araquidónico $p<0.005$ por Sheffé. SMOR, $GL= 3,26$; $F= 1.839$, ANOVA, $p> 0.1648$. * vs. Control; ** vs. Ácido araquidónico).



En la Fig. 5-J, describimos que el empleo del U73122 bloquea únicamente el decremento en la VIG y el aumento en el SMOR, ambos como resultado de la administración de ANA (VIG. $GL= 3,26$; $F= 4.078$, ANOVA, $p<0.01$; Control vs.

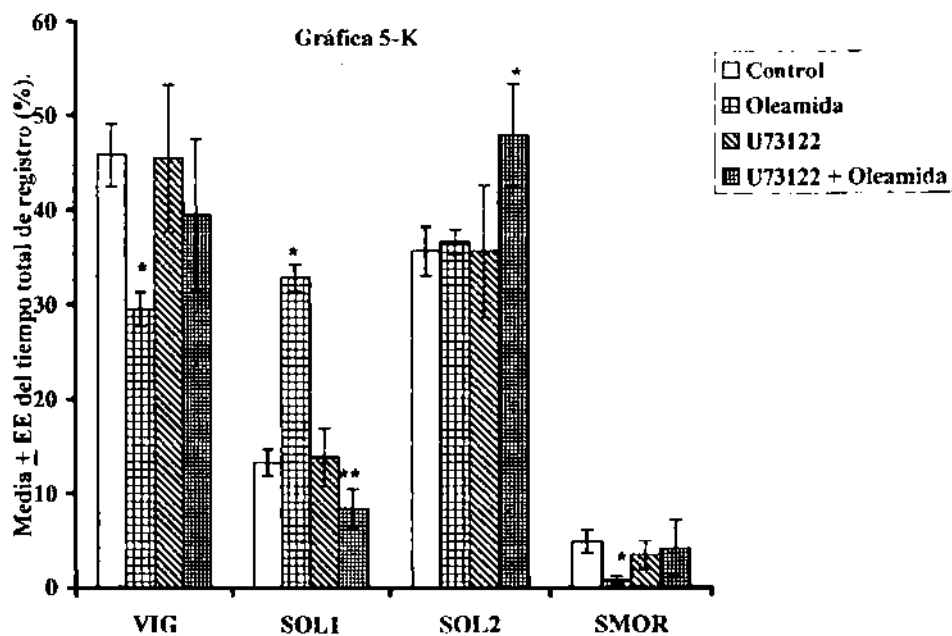
Anandamida $p < 0.03$ por Sheffé; Anandamida vs. U73122 + Anandamida $p < 0.05$ por Sheffé. SOL1, $GL=3,26$; $F= 0.048$, ANOVA, $p > 0.9852$. SOL2, $GL= 3,26$; $F= 3.000$, ANOVA, $p < 0.048$; Control vs. Anandamida $p < 0.03$ por Sheffé. SMOR, $GL= 3,26$; $F= 2.942$, ANOVA, $p < 0.05$; Control vs. Anandamida $p < 0.02$ por Sheffé; Anandamida vs. U73122 + Anandamida . * vs. Control; ** vs. Anandamida).



En el caso de los cambios en el sueño ocasionados por OLE, solamente logramos bloquear el incremento en el SOL1 empleando el U73122 (VIG. $GL= 3,20$; $F= 2.136$, ANOVA, $p < 0.05$; Control vs. Oleamida $p < 0.02$ por Sheffé. SOL1, $GL=3,20$; $F= 24.056$, ANOVA, $p < 0.0001$; Control vs. Oleamida $p < 0.0001$ por Sheffé; Oleamida vs. U73122 + Oleamida $p < 0.0001$ por Sheffé. SOL2, $GL= 3,20$; $F= 1.607$, ANOVA, $p < 0.05$; Control vs.

U73122 + Oleamida $p < 0.05$ por Sheffé. SMOR, $GL = 3,20$; $F = 1,787$, ANOVA, $p < 0.05$;

Control vs. Oleamida $p < 0.05$ por Sheffé. Gráfica 5-K * vs. Control; ** vs. Oleamida).

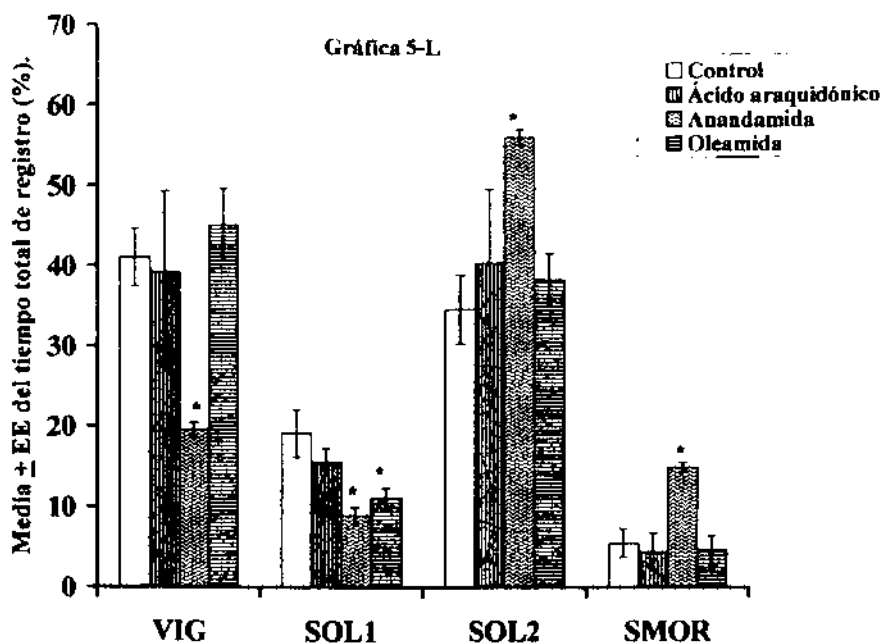


b) Administraciones en el núcleo tegmental pedunculopontino de AA, ANA y OLE.

Antes de describir los resultados, mostramos la posición de la cánula en el siguiente corte histológico.



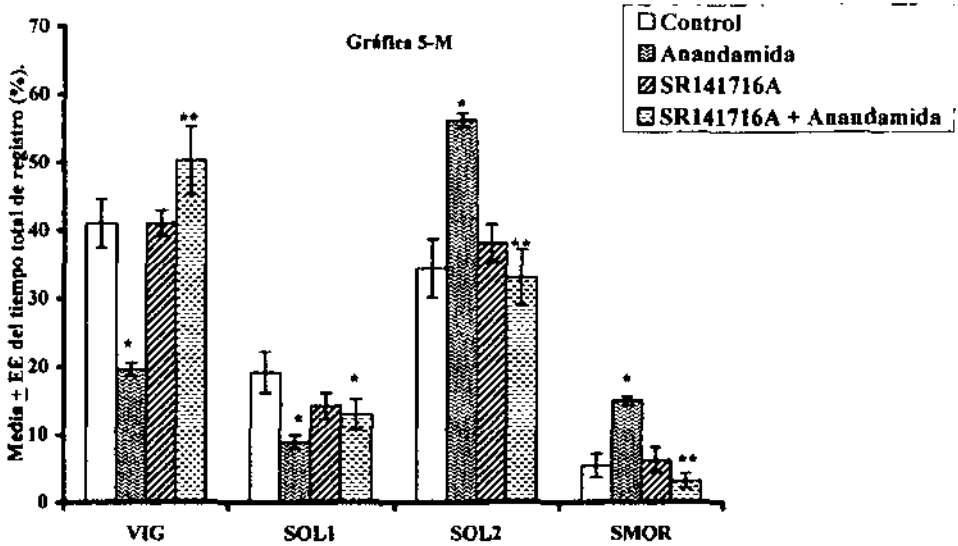
Los resultados de los registros de sueño de los animales a los que se les administró AA en PPT no mostraron que esta manipulación experimental modificara la arquitectura del ciclo sueño-vigilia; sin embargo, la administración de OLE disminuyó el SOL1, mientras que los cambios más notorios fueron inducidos por ANA al decrementar significativamente la VIG y el SOL1 e inducir un incremento en el SOL2 y el SMOR. (VIG, $GL= 3,16$; $F= 3.786$, ANOVA, $p<0.03$; Control vs. Anandamida $p<0.01$ por Sheffé. SOL1, $GL= 3,16$; $F= 5.542$, ANOVA, $p<0.0084$; Control vs. Anandamida $p<0.001$ por Sheffé; Control vs. Oleamida $p<0.05$ por Sheffé. SOL2, $GL= 3,16$; $F= 3.143$, ANOVA, $p<0.05$; Control vs. Anandamida $p<0.01$ por Sheffé. SMOR, $GL= 3,16$; $F= 7.871$, ANOVA, $p<0.0019$; Control vs. Anandamida $p<0.01$ por Sheffé. Gráfica 5-L * vs. Control).



SR141716A.

Una vez que encontramos que la administración de ANA en PPTg ocasionaba un decremento en VIG y SOL1, así como un incremento en SOL2 y SMOR, decidimos trabajar con el SR141716A tratando de responder a la pregunta si estos efectos podrían ser debidos a la activación del CB_1 , y que estas alteraciones podían ser prevenidas como lo observamos en los experimentos previamente descritos. En la Gráfica 5-M mostramos los tiempos totales de registro de los 4 estados de vigilancia en donde se aprecian los efectos que ANA ocasionó y que ya describimos en la gráfica anterior. El SR141716A no modificó las distintas fases del sueño, mientras que su administración es suficiente para revertir todos los efectos ocasionados por ANA (VIG. $GL=3,16$; $F=15.428$, ANOVA, $p<0.0001$; Control vs. Anandamida $p<0.003$ por Sheffé; Anandamida vs. SR141716A + Anandamida $p<0.0001$ por Sheffé. SOL1, $GL=3,16$; $F=3.717$, ANOVA, $p<0.03$; Control vs. Anandamida $p<0.03$ por Sheffé; Control vs. SR141716A + Anandamida $p<0.05$ por Sheffé. SOL2, $GL=3,16$; $F=10.108$, ANOVA, $p<0.0006$; Control vs. Anandamida $p<0.003$ por Sheffé; Control vs.

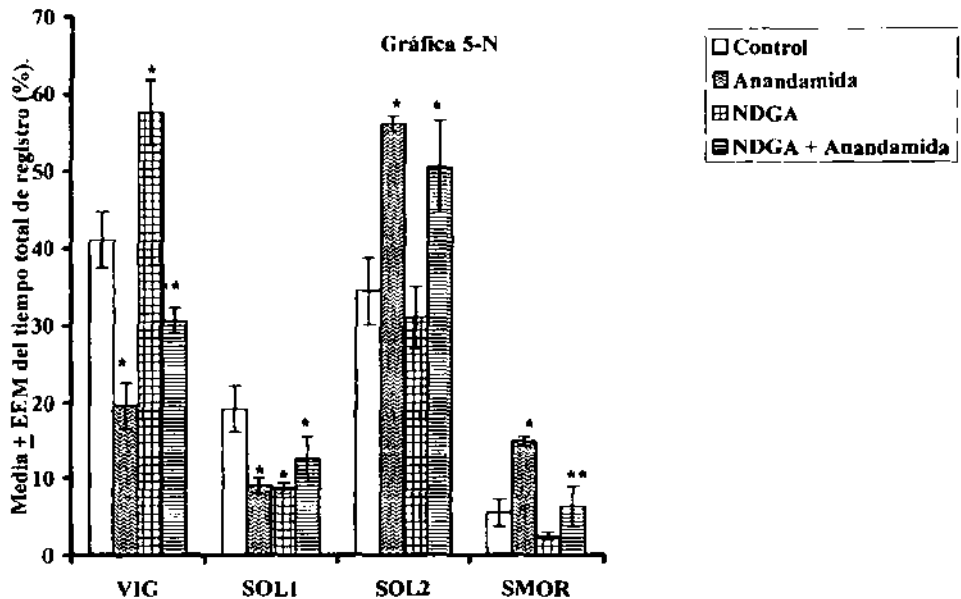
SR141716A + Anandamida $p < 0.05$ por Sheffé; Anandamida vs. SR141716A + Anandamida $p < 0.001$ por Sheffé. SMOR, $GL = 3,16$; $F = 11.755$, ANOVA, $p < 0.0003$; Control vs. Anandamida $p < 0.004$ por Sheffé; Anandamida vs. SR141716A + Anandamida $p < 0.0005$ por Sheffé. * vs. Control; ** vs. Anandamida).



NDGA.

Siguiendo la misma metodología que llevamos a cabo en los estudios de administraciones icv, microinyectamos el NDGA a una dosis de $30.24 \mu\text{g}/1 \mu\text{l}$ y encontramos que se incrementa de manera significativa la VIG a expensas del SOL1. Los efectos de ANA ya fueron descritos, mientras que con la combinación NDGA + Anandamida, persiste la disminución en el SOL1 así como el incremento en el SOL2. Únicamente se bloquea la disminución en la VIG y el aumento en el SMOR, este dato indica claramente que los efectos de ANA no pueden ser bloqueados totalmente al inhibir la actividad de la PLA₂ (VIG. $GL = 3,16$; $F = 13.585$, ANOVA, $p < 0.0001$; Control vs. Anandamida $p < 0.02$ por Sheffé; Control vs. NDGA $p < 0.01$ por Sheffé; Anandamida vs. NDGA + Anandamida $p < 0.05$ por Sheffé. SOL1, $GL = 3,16$; $F = 4.634$, ANOVA, $p < 0.01$; Control vs. Anandamida $p < 0.04$ por Sheffé; Control vs. NDGA $p < 0.03$ por Sheffé; Control vs. NDGA +

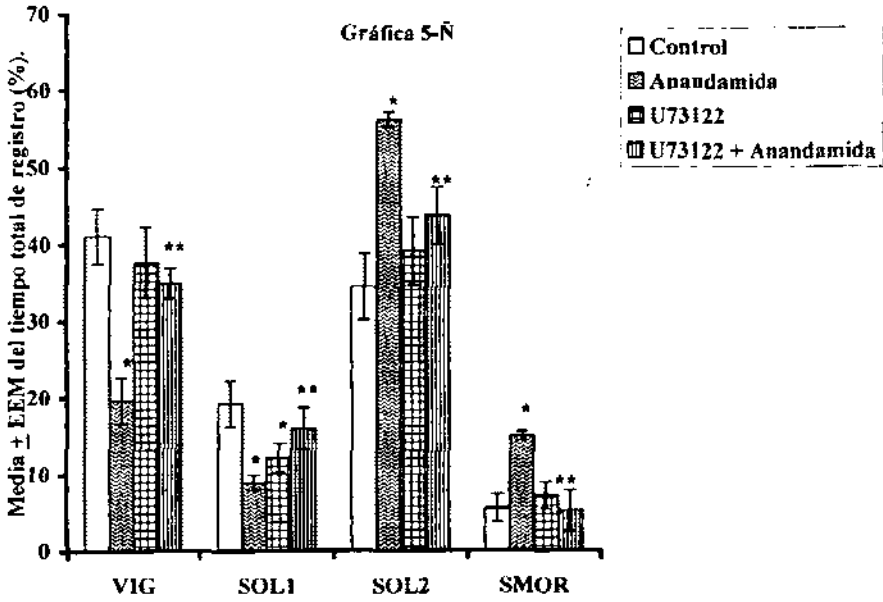
vs. Anandamida $p < 0.02$ por Sheffé; Control vs. NDGA + Anandamida $p < 0.01$ por Sheffé. SMOR, $GL = 3,16$; $F = 10.410$, ANOVA, $p < 0.0005$; Control vs. Anandamida $p < 0.009$ por Sheffé; Anandamida vs. NDGA + Anandamida $p < 0.01$ por Sheffé. Gráfica 5-N * vs. Control; ** vs. Anandamida).



U73122.

Finalmente, al microinyectar el U73122 ($9.2 \mu\text{g}/1 \mu\text{l}$) encontramos que se presenta un decremento del SOL1 que puede ser a expensas del aumento en el SOL2 y SMOR, aunque los cambios de estos dos últimos no sean estadísticamente significativos. EL U73122 bloquea eficazmente los cambios que ANA ocasiona en el ciclo sueño-vigilia (VIG. $GL = 3,16$; $F = 8.836$, ANOVA, $p < 0.001$; Control vs. Anandamida $p < 0.02$ por Sheffé; Anandamida vs. U73122 + Anandamida $p < 0.02$ por Sheffé. SOL1, $GL = 3,16$; $F = 3.662$, ANOVA, $p < 0.03$; Control vs. Anandamida $p < 0.05$ por Sheffé; Control vs. U73122 $p < 0.04$ por Sheffé; Anandamida vs. U73122 + Anandamida $p < 0.04$ por Sheffé. SOL2, $GL = 3,16$; $F = 6.428$, ANOVA, $p < 0.004$; Control vs. Anandamida $p < 0.007$ por Sheffé; Anandamida vs. U73122 + Anandamida $p < 0.02$ por Sheffé. SMOR, $GL = 3,16$; $F = 5.574$. ANOVA, $p <$

0.008; Control vs. Anandamida $p < 0.02$ por Sheffé; Anandamida vs. U73122 + Anandamida $p < 0.02$ por Sheffé. Gráfica 5-Ñ * vs. Control; ** vs. Anandamida).



VII. DISCUSIÓN.

8.1 Efectos en el sueño después de la administración icv de AA, ANA y OLE.

En nuestro estudio, se demuestra por primera vez los efectos del AA, ANA y OLE en el sueño.

El AA modifica el ciclo sueño-vigilia. El efecto que el AA ocasiona en el sueño es un incremento de la VIG a expensas del SOL2. Esto podría explicarse considerando que el AA favorece la transmisión sináptica glutamatérgica activando receptores tipo NMDA (Min-Che y cols., 1992; Miller y cols., 1992; Casado y Ascher, 1998) e incrementando la liberación de glutamato (Nishizaki y cols., 1999). Existen reportes que indican que el glutamato es liberado en la corteza cerebral en altas concentraciones asociadas con la VIG (Jasper y cols., 1965).

Tampoco podemos descartar la posibilidad de que el AA actúe a través de receptores colinérgicos. Almeida y cols. (1999) reportaron que el AA favorece la liberación de ACh en células hipocámpales. Este hecho sugeriría que éste lípido podría favorecer la promoción de VIG a través del sistema colinérgico. Recordemos que las concentraciones de ACh se han observado incrementadas durante la VIG (Williams y cols., 1994).

Otra posible explicación es que el AA actúe a través de alguno de sus metabolitos. Por ejemplo, sabemos que entre los principales eicosanoides derivados del AA se encuentra la PGE₂ (Needleman y cols., 1986). Como comentamos en la Introducción, la PGE₂ se ha relacionado con el despertar (Gerozissis y cols., 1995; Hayaishi, 1991).

Por otro lado, las alteraciones que observamos después de la administración de ANA en el sueño, como son el incremento en el SOL2 y SMOR a expensas de la VIG, representan un dato muy importante ya que es la primera vez que se describe el efecto inducido por este endocanabinoide en el sueño. Los efectos que encontramos concuerdan parcialmente con los reportados por diversos grupos, señalando el papel inductor de ondas lentas por la administración de marihuana (Feinberg y cols., 1976).

No podemos descartar que los efectos que encontramos sean a través de un sistema que no involucre al CB₁. Es importante considerar que ANA también modifica la actividad de otros sistemas de neurotransmisión (Hampson y cols., 1998; Kimura y cols., 1998). Sobre este último punto, se sabe que la liberación de 5-HT es inhibida por la activación del receptor CB₁ (Nakazi y cols., 2000). De este modo, la disminución ocasionada en la VIG por la administración de ANA podría ser la resultante de la inhibición de la actividad del NR. Otra posible explicación, sería que se presentara una disminución en la concentración de glutamato. Gerdeman y Lovinger reportaron este año que la activación del CB₁ ocasiona un decremento en las corrientes postsinápticas excitatorias en rebanadas de estriado (Gerdeman y Lovinger, 2001). Los autores terminan su artículo interpretando su hallazgo como la activación del CB₁ induce un decremento en la liberación de glutamato. En la Introducción mencionamos que los niveles máximos de este neurotransmisor estaban relacionados con la VIG (Jasper y cols., 1965; Azuma y cols., 1996).

El incremento en el SMOR ocasionado por ANA podría ser la consecuencia de una liberación incrementada de ACh. Acguas y cols. (2000) reportaron que la administración intravenosa de agonistas al CB₁, incrementaban de una manera dosis-dependiente la concentración de ACh en corteza prefrontal y en hipocampo de ratas en libre movimiento.

Por otro lado, la disminución de la VIG ocasionada por ANA podría estar relacionada con el reporte de Gessa y cols. (1997). Ellos han reportado que la administración de cannabinoides sintéticos inhibe la liberación de ACh hipocampal.

Suponemos que ANA podría estar modulando la actividad de las células Wake/On así como las REM-On. Recordemos que ambas coexisten en el complejo PPT/LDT. Las primeras disparan exclusivamente durante la VIG, mientras que las segundas presentan una máxima actividad eléctrica durante el SMOR. Así, ANA activaría a las neuronas responsables de la generación del SMOR y al mismo tiempo inhibiría a las responsables de la VIG.

A pesar de que existe evidencia que sugiere que ANA podría modificar el sueño a través de sistemas de neurotransmisión como el serotoninérgico, glutamatérgico o colinérgico, sugerimos que los cambios que encontramos en el ciclo sueño-vigilia tras la administración de ANA son debidos a la activación de receptores CB₁. Esto dado que las alteraciones ocasionadas por ANA son bloqueadas con el SR141716A, además de que nuestros resultados se ven respaldados con los reportados por Santucci y cols. (1998) en donde ellos encontraron que al administrar el antagonista de los CB₁, se presenta un incremento de la VIG a expensas del SOL y SMOR.

En el caso de los efectos observados después de la administración de OLE, encontramos que se presenta una disminución de la VIG y del SMOR mientras se presenta un aumento en el SOL1 y SOL2, este es un efecto dosis-dependiente. Se ha descartado que los efectos de OLE sean a través de una perturbación membranal (Gobbi y cols., 1999), por lo que entonces se apoya la hipótesis de que OLE activa a diferentes sistemas de neurotransmisión incluido el CB₁ (Huidobro-Toro y Harris, 1996; Lees y cols., 1998; Yost y cols., 1998; Thomas y cols., 1999). Aunque no podemos descartar que OLE pudiera poseer receptores específicos, se ha reportado que puede modular la actividad de receptores tales como los a GABA (Lees y cols., 1998; Yost y cols., 1998) y a 5-HT (Huidobro-Toro y Harris, 1996; Boger y cols., 1998; Thomas y cols., 1998; Thomas y cols., 1999) por lo que el efecto inductor de ondas lentas podría ser a través de la activación de dichos receptores, ya que por ejemplo el GABA se ha encontrado incrementado durante el SOL (Nitz y Siegel, 1997).

Un punto que puede fortalecer esta probable hipótesis es el resultado de los experimentos de Miguel y cols (1998). Estos autores encontraron que administraciones agudas de Δ^9 -THC ocasionaban un incremento de GABA en el hipotálamo. De tal modo que no podemos desacreditar la hipótesis de que OLE induzca ondas lentas a través del sistema GABAérgico.

Los niveles de OLE que se han detectado en LCR de la rata [44 ng/ml] (Hanus y cols., 1999), se incrementan conforme el animal es privado de sueño y regresan a su valor basal al permitir que el animal recupere el sueño perdido (Basile y cols., 1999). Este dato sugiere que OLE una vez que se acumula en el LCR, activa a determinados grupos celulares, como los tálamicos y, éste ha sido el mecanismo neurofisiológico propuesto por el cual OLE induce SOL (Thomas y cols., 1999).

8.1.2 Efectos en el sueño inducidos por la administración icv de AA, ANA y OLE bloqueados con el SR141716A.

Como podemos observar en las gráficas de los experimentos icv con el SR141716A, esta droga no modifica la arquitectura del ciclo sueño-vigilia, lo cual concuerda con lo reportado por Mendelson y Basile (1999).

Como se comentó en la Introducción, el AA posee algunas características estructurales para unirse al CB₁ (Felder y cols., 1993; Di Marzo, 1998; Mechoulam y Ben-Shabat, 1999), suponiendo con esto que sus efectos podrían ser bloqueados con el SR141716A. Sin embargo, las alteraciones que ocasionó éste lípido no fueron bloqueadas totalmente por el SR141716A. Esto sugiere que el AA podría estar actuando a través de otro tipo de receptor.

Podríamos pensar que la VIG ocasionada por la administración de AA es generada por receptores tipo no CB₁, mientras que el decremento en el SOL2 sería una consecuencia de la activación de receptores tipo CB₁, ya que solamente este efecto fue el que se bloqueó con el SR141716A.

Por otro lado, el SR141716A muestra ser un eficaz antagonista al bloquear los efectos de ANA. Este dato es importante ya que señala que ANA modifica el sueño mediante la activación de los CB₁. Este dato es apoyado por numerosos reportes que

indican que el SR141716A bloquea efectos inducidos por ANA evaluados en diferentes conductas (Bisogno y cols., 1998; Mafflet y Beninger, 1998; Costa y cols., 2000).

Es necesario señalar que existe una cantidad muy significativa del CB₁ localizado en regiones como el puente (Matsuda y cols., 1993; Bisogno y cols., 1999), de este modo, podemos suponer que el incremento en el SMOR es debido a la actividad de estos receptores en dicha región del SNC. Además, al unirse ANA al CB₁, disminuye la síntesis de AMPc lo que sería un mecanismo intracelular semejante al empleado por receptores muscarínicos, los cuales han sido propuestos como los responsables de la génesis del SMOR (Velázquez-Moctezuma y cols., 1989; Baghdoyan y Lydic, 1999).

Finalmente, las alteraciones que ocasionó OLE son bloqueadas con el SR141716A. Aunque como hemos comentado anteriormente, existe controversia sobre la unión de OLE al CB₁ (Boring y cols., 1996; Cheer y cols., 1999), por lo que se ha sugerido que OLE podría estar actuando a través de otros sistemas. Sin embargo, existen reportes que han indicado que los efectos que ocasiona OLE son bloqueados con el SR141716A (Bisogno y cols., 1998; Mendelson y Basile, 1999).

A pesar de que el estudio de Mendelson y Basile (1999) es el antecedente más directo sobre los efectos de OLE en el sueño y su bloqueo por el SR141716A, es conveniente comentar que ellos señalan que dichos cambios se presentan en latencias al SOL, por lo que aún existía la duda sobre si OLE afectaba el sueño a través del sistema de receptores CB₁. Nuestros resultados muestran que los efectos de OLE son bloqueados al emplear el SR141716A, proponiendo así que este lípido actúa a través de este sistema de receptores.

Un punto interesante a discutir es el efecto observado en el SMOR después de la administración de OLE. El SMOR se reduce significativamente y a pesar de que es un efecto contrario al observado después de la administración de ANA, ambos efectos son bloqueados por el SR141716A. Una posible explicación a este fenómeno es de que OLE

podría estar ocupando un sitio alostérico en el CB₁, dato que se sustenta con el hecho de que OLE modifica la actividad de los receptores para 5-HT₇ actuando a través de un sitio alostérico (Thomas y cols., 1998; Hedlund y cols., 1999).

8.1.3 Efectos en el sueño inducidos por la administración icv de AA, ANA y OLE bloqueados con el NDGA.

En nuestro estudio, empleamos el inhibidor de la PLA₂, el NDGA, el cual no modificó los estados de vigilancia. Tampoco logró revertir los efectos ocasionados por AA. Podemos suponer, con base a nuestros resultados, que el AA modifica el sueño a través de un sistema que no emplea una PLA₂. Podría ser un receptor metabotrópico acoplado a otra enzima. En la Introducción mencionamos que la PLA₂ es una enzima necesaria para la síntesis de AA (Lih y cols., 1993), puede ser activada por receptores metabotrópicos (Axelrod, 1990; Murayama y cols., 1990) y además se ha reportado que es activada por cannabinoides para liberar AA (Burstein y cols., 1994). Podría también verse involucrado un receptor ionotrópico.

Pero es un hecho que la inhibición de la PLA₂ no fue suficiente para revertir el efecto del AA en el sueño. También podríamos suponer que al inhibir la PLA₂, se incrementa la concentración de AA endógeno por lo que se presentan tendencias semejantes a las inducidas por el AA después de administrar la combinación NDGA + AA.

Cuando administramos el NDGA antes de ANA, logramos bloquear tanto los efectos inductores del SOL2 y SMOR, como la disminución ocasionada por ANA en la VIG. Este dato sugiere que ANA actúa a través de una PLA₂. Suponemos, basándonos en la literatura, que probablemente ANA al unirse al CB₁, active a una PLA₂ y de este modo se lleven a cabo sus efectos intracelulares. Sin embargo, hacen falta experimentos que demuestren que verdaderamente el CB₁ está acoplado a una PLA₂.

El hecho de que ANA pudiera estar empleando una PLA₂, es un dato fortalecido con el reporte de Watmann y cols. (1995) en donde ellos señalan que ANA activa la cascada de

señales de la MAPK, la PLA₂ también activa a la MAPK (Lih y cols., 1993). El punto aquí a discutir sería el mecanismo por el cual la PLA₂ es activada, si es que no está acoplada al CB₁, ya que una vez que se activa el sistema de receptores CB₁, la neurona se hiperpolariza, por lo que el Ca²⁺ entrante se reduce dramáticamente. Entonces, la PLA₂ podría ser solamente activada por fosforilación, esto sería entonces una vía intracelular por la cual ANA actúe.

Por último, el NIDGA solamente bloqueó el incremento en SOL1 y el decremento en SMOR ocasionados por OLE. Este dato es interesante ya que es difícil explicar porqué solamente esos efectos fueron los bloqueados. Sin embargo, se presentan tendencias a revertir el efecto con el NIDGA en la VIG aunque esto no sea estadísticamente diferente.

Nuestros datos sugieren por primera vez que OLE puede estar llevando a cabo sus efectos en el sueño a través de una enzima intracelular como la PLA₂. La única enzima relacionada con OLE ha sido la FAAH. Recientemente se encontró que la inhibición de esta enzima prolonga los efectos de OLE en el sueño (Huitrón-Reséndiz y cols., 1998).

8.1.4 Efectos en el sueño inducidos por la administración icv de AA, ANA y OLE bloqueados con el U73122.

Recordemos que el U73122 es un inhibidor eficaz de la PLC (Thompson y cols., 1991; Vickers, 1993), por lo cual fue empleado en nuestros experimentos. Encontramos que al administrar el U73122 antes de AA, se bloquean los efectos inducidos por el lípido en estudio. Esto sugiere que el AA activa una PLC para llevar a cabo el incremento en la VIG y el decremento en el SOL2. Por otro lado, se sabe que el AA puede activar de manera directa a la PLC (McGahon y Lynch, 1998), por lo que los cambios en el sueño que encontramos en nuestros experimentos podrían deberse a que, el AA estaría ocupando algún receptor metabotrópico y éste activaría una PLC; de este modo al emplear el U73122, los efectos que el AA ocasiona en el ciclo sueño-vigilia, serían bloqueados.

Cuando administramos el U73122 y después ANA, logramos revertir los efectos que ocasiona el endocanabinoide en el sueño, a excepción del incremento en el SOL2, que aunque se presenta una tendencia a revertir el efecto, éste no alcanza diferencia estadística. El hecho de que el U73122 bloquea los efectos ocasionados por ANA, indica claramente que ANA al unirse al CB₁, activa una PLC. Este dato ha sido corroborado con los estudios de Ho y cols. (1999) y Gruol y cols. (1999), quienes demostraron que el CB₁ se encuentra acoplado a una PLC. De tal modo que una cascada de señales intracelulares desatada por el CB₁, involucra a la PLC. El incremento en el SMOR ocasionado por ANA y bloqueado por el U73122 podría deberse a que se ha demostrado que receptores muscarínicos también se encuentran acoplados a PLC (Min y cols., 2000). Recordemos que los receptores muscarínicos han sido relacionados con la génesis del SMOR (Velázquez-Moctezuma y cols., 1989), por lo que entonces una vez que ANA se acopla al CB₁, se activa una PLC la cual entonces es necesaria para la generación de SMOR inducida por ANA.

En el caso de OLE, solamente logramos bloquear el aumento en el SOL1, aunque se presentan tendencias a revertir el efecto en VIG y en SMOR, pero estas no alcanzan diferencias estadísticamente significativas, esto podría superarse al incrementar el número de animales en los grupos experimentales. El hecho de que no se haya bloqueado totalmente los efectos de OLE con el U73122, sugiere que OLE actúa a través de otro sustrato enzimático para llevar a cabo sus efectos o que probablemente se requiera de otra dosis.

8.2 Efectos en el sueño inducidos por la administración de AA, ANA y OLE en PPTg.

Los únicos cambios que observamos después la administración de los lípidos fueron los obtenidos con ANA, ya que AA y OLE no modificaron de manera significativa el ciclo sueño-vigilia. Este dato sugiere que esta es una región sensible a ANA, este dato se puede correlacionar con el reportado por Bisogno y cols. (1999) en el cual dichos autores encuentran altas concentraciones de ANA así como en la expresión del CB₁ en puente. Además del dato mencionado, recientemente describimos concentraciones significativas de ANA en dicha región (Murillo-Rodríguez y cols., 2001 en preparación). Esto podría

explicar porque ANA induce un incremento en el SOL2 y en el SMOR, al activar receptores CB_1 en PPTg.

8.2.1 Efectos en el sueño después de la administración en PPTg de ANA bloqueados con el SR141716A.

Una vez que describimos los efectos de ANA en el sueño y que estos eran bloqueados con el SR141716A, proseguimos a evaluar el mismo efecto con microinyecciones en PPTg. Encontramos que el empleo del SR141716A bloquea los efectos de ANA sobre el sueño. Indicando con esto que tanto en icv como en PPTg, ANA modifica el sueño a través del sistema de receptores para cannabinoides tipo CB_1 .

Entonces sugerimos que la generación de SMOR inducida por ANA en PPTg, es consecuencia de la activación de este sustrato neuroanatómico generador del SMOR. Se ha demostrado una desincronización cortical inducida por la aplicación de carbacol en PPTg (Kinney y cols., 1998), por lo que una vez que se activan los receptores muscarínicos, se disminuye la síntesis de AMPc (Capece y Lydic, 1997). Este podría ser el mecanismo intracelular que probablemente el CB_1 comparta con el sistema de receptores que modulan al SMOR.

8.2.2 Efectos en el sueño después de la administración en PPTg de ANA bloqueados con el NDGA.

Los efectos de ANA después de su administración en PPTg no fueron bloqueados totalmente con el NDGA; solamente el decremento en la VIG y el incremento en SMOR fueron los cambios que se lograron prevenir. Esto podría suponer que la activación de una PLA_2 por parte de ANA no es muy necesaria, ya que sus efectos se bloquean parcialmente. Lo que sugiere que ANA actúe a través de otro sustrato intracelular.

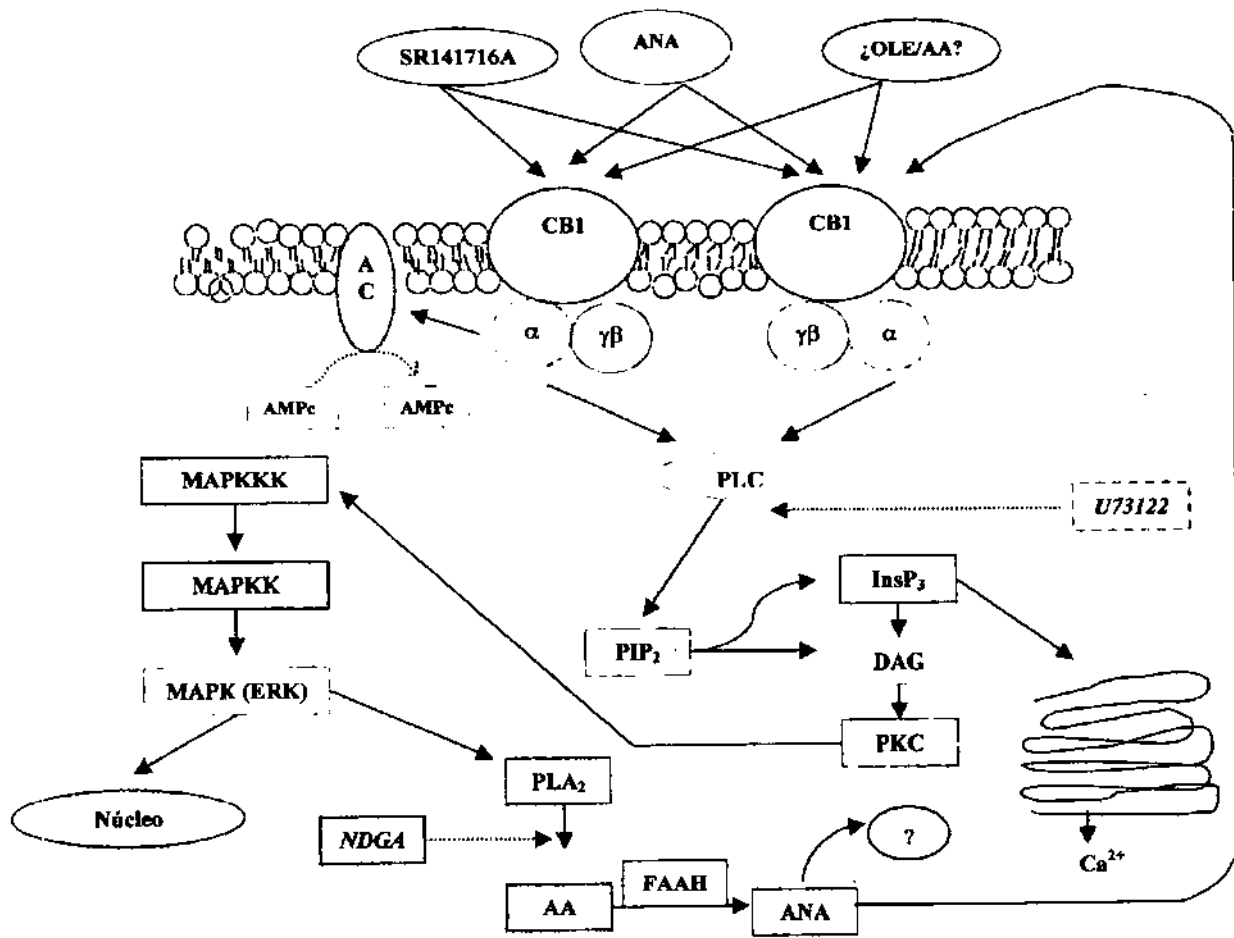
Podemos proponer también que una vez que se inhibe la actividad de la PLA_2 , el AA endógeno sintetiza más ANA por eso aunque se bloquean los efectos en VIG y SMOR,

se pueden apreciar las tendencias a que el efecto persista, y esto se comprueba al observar el efecto obtenido con la combinación NDGA + Anandamida en SOL1 y SOL2.

8.2.3 Efectos en el sueño después de la administración en PPTg de ANA bloqueados con el U73122.

En la última parte del estudio, encontramos que el U73122 bloquea totalmente los efectos ocasionados por ANA. La probable explicación a este resultado esta relacionada con los efectos que observamos en las administraciones icv, mecanismo que se ha discutido anteriormente.

Hasta el momento, no se ha demostrado que el CB₁ se encuentre acoplado a una PLC en núcleos pontinos; sin embargo, los antecedentes que ofrece la literatura pueden ayudarnos a proponer este mecanismo.



En el esquema anteriormente mostrado (Fig. 4), se aprecian los niveles celulares que afectamos farmacológicamente en nuestro estudio. Con el SR141716A trabajamos al nivel de receptor; mientras que con el U73122 y el NDGA inhibimos la actividad de la PLC y la PLA₂ respectivamente.

Suponemos que una vez que tanto ANA y probablemente el AA y OLE se acoplen al CB₁, este activa a las PG_i las cuales inhiben la síntesis de AMPc, esto en respuesta al decremento en la actividad del AC. También apreciamos que el CB₁ puede activar una PLC la cual hidroliza InsP₃ y DAG a partir del sustrato membranaral PIP₂. El InsP₃ libera Ca²⁺ intracelular de las fosas en el RE mientras que el DAG activa una PKC. Esta última puede fosforilar la MAPK y ésta, translocarse al núcleo a regiones promotoras para la expresión de determinados genes. Este hecho, ha sido corroborado con el hecho de que tanto el AA, ANA así como OLE, inducen la expresión de ciertos genes como *c-fos*.

Por otro lado, la MAPK puede activar a la PLA₂ pero esta actividad es bloqueada con el NDGA lo cual inhibiría la liberación de AA de los fosfolípidos membranales. Sin embargo, naturalmente la PLA₂ libera AA el cual sintetiza ANA como consecuencia de la actividad de la FAAH.

A pesar de que en nuestro esquema se muestran diversos elementos intracelulares que no fueron evaluados, podemos sugerir que al emplear el SR141716A se inhibió toda la vía de transducción de señales. Mientras que con el U73122 inhibimos la actividad de la PLC por lo que probablemente la síntesis de PIP₂, la formación de InsP₃, DAG, la activación de la PKC así como la liberación de Ca²⁺ intracelular, se vió afectada de manera significativa.

Finalmente al inhibir a la PLA₂ con el NDGA, la cascada de señales hasta la activación de la PLC suponemos se encuentra intacta, pero a partir de la MAPK, ésta vía de señalización es bloqueada. Esto es debido a que al inhibir la PLA₂, la síntesis de ANA se ve

disminuida y debemos recordar además de que determinados tipos de PLA₂ pueden encontrarse acopladas a receptores metabotrópicos. A pesar de que aún no se ha demostrado que el CB₁ se encuentra acoplado a una PLA₂, éste hecho no lo podemos descartar. Por último, es conveniente señalar que diversos elementos no mostrados en nuestro esquema (canales, proteínas transportadoras, enzimas de degradación, etc) podrían también verse afectados por la activación e inhibición del CB₁ así como de alguna de sus vías intracelulares.

IX.- CONCLUSIONES.

En la Figura mostrada a continuación, se pueden apreciar los efectos intracelulares que probablemente se vieron modificados en nuestro estudio.

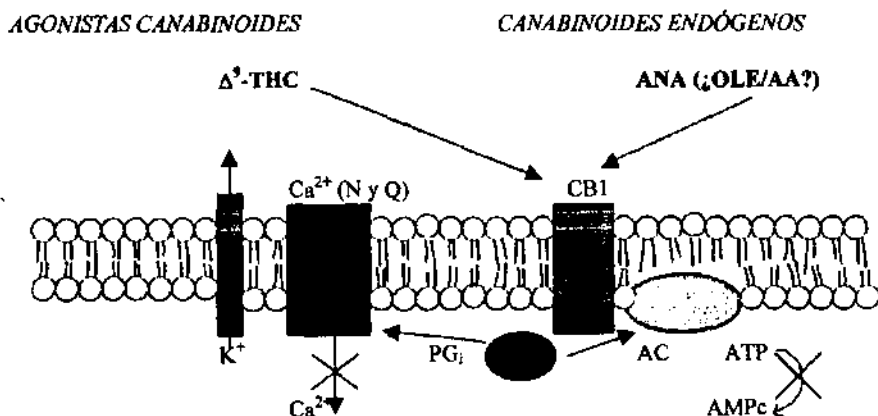


Fig. 5. El Δ^9 -THC y Anandamida se unen al CB₁ y estimulan al receptor el cual está acoplado a PG_i y de este modo, se presenta una inhibición en la actividad de la AC y una disminución en la síntesis de AMPc. Esto además inhibe la entrada de Ca²⁺ a través de los canales tipo N y Q. La activación del CB₁ estimula el flujo de K⁺ a través de canales rectificantes. Esquema tomado de: *Axelrod J. and Felder C. (1998). Cannabinoid receptors and their endogenous agonist, anandamide. Neurochem. Res. 23 (5): 575-581.*

En el presente trabajo, demostramos que los efectos que inducen AA, ANA y OLE en el sueño, pueden ser bloqueados al usar el antagonista al CB₁.

La inhibición de la PLA₂ y PLC logra también bloquear los efectos que ocasionan los lípidos, sugiriendo con esto que estas moléculas activan de algún modo aún no descrito, a elementos intracelulares como dichas fosfolipasas, probablemente como consecuencia del acoplamiento con el CB₁.

Finalmente, ANA es la única molécula que afecta de manera significativa los estados de vigilancia tras su administración en PPTg, sugiriendo con esto que esta región del SNC es sensible a este endocanabinoide y, que sus efectos son bloqueados al utilizar los tres diferentes niveles de bloqueo como son el SR141716A (a nivel de receptor) y el NHAA y el U73122, a nivel intracelular enzimático.

Como una conclusión general a la que podemos llegar es señalar que tanto el AA, ANA y OLE modifican de manera significativa y diferencial al ciclo sueño-vigilia.

X.- FUTURAS PERSPECTIVAS.

En cuanto a la modificación del ciclo sueño-vigilia, es probable que éstos lípidos actúen sobre los mecanismos neuroanatómicos y neuroquímicos generadores del sueño ya descritos y, de este modo participen en la generación de esta conducta. Su receptor, el CB₁, a pesar de que se sugiere en este estudio su participación en la promoción del SMOR, se desconoce si se encuentre colocalizado con receptores muscarínicos, lo que podría suponer que ANA actúa sobre sustratos neuroanatómicos específicos responsables de la génesis del SMOR. Es conveniente estudiar la coexistencia del CB₁ con receptores muscarínicos, propiamente los M₂.

Pensamos que éstas moléculas podrían estar llevando a cabo otras funciones. Con los resultados de diversos grupos, parece que ANA y OLE no serían lípidos con una sola función, que sería la de inducir sueño.

Recordemos que la localización de ANA se encuentra prácticamente en todo el organismo, en regiones que resulta todo un enigma saber cual es el papel funcional de éste lípido.

ANA podría estar involucrada en procesos hipnópticos. Por ejemplo, las concentraciones de ANA se encuentran elevadas en pacientes con esquizofrenia (Leweke y cols., 1999), sujetos que presentan un incremento muy significativo en la cantidad de SMOR (Thaker y cols., 1990). Las administraciones de ANA, como hemos demostrado en nuestro estudio, aumentan la cantidad de SMOR, lo que podría suponerse que el papel de ANA en el sueño podría también estar vinculado en el sentido de modular las ensoñaciones, fenómenos típicos del SMOR. La localización receptores CB_1 en sistema límbico, sugiere que ANA sería una molécula que podría estar modulando el componente emocional de los sueños.

Aún hay mucho camino por recorrer para averiguar si ANA forma parte de la bioquímica de los sueños.

XI.- REFERENCIAS.

1. Acquas E., Pisanu A., Marrocu P. and Di Chiara G. (2000). Cannabinoid CB₁ receptor agonist increase rat cortical and hippocampal acetylcholine release in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* 401: 179-185.
2. Adams P.B., Lawson S.L., Sanigorski A. and Sinclair A.J. (1996). Arachidonic acid to eicosapentanoic acid ratio in blood correlates positively with clinical symptoms of depression. *Lipids* 31 (Suppl) S157-S161.
3. Almeida T., Cunha R.A. and Ribeiro J.A. (1999). Facilitation by Arachidonic acid of acetylcholine release from the rat hippocampus. *Brain Res.* 826 (1): 104-111.
4. Ameri A. (1999). The effects of cannabinoids on the brain. *Progr. Neurobiol.* 58: 315-348.
5. Armstrong-James M. and Fox K. (1988). Evidence for a specific role for cortical NMDA receptors in slow wave sleep. *Brain Res.* 451 (1-2): 189-196.
6. Aserinsky F. and Kleitman N. (1953). Regulatory occurring periods of eye motility and concomitant phenomena during sleep. *Science* 118: 273-274.
7. Axelrod J. (1990). Receptor-mediated activation of phospholipase A₂ and arachidonic acid release in signal transduction. *Biochem. Soc. Trans.* 18: 503-507.
8. Axelrod J., and Felder C.C. (1998). Cannabinoid receptors and their endogenous agonist, anandamide. *Neurochem. Res.* 23: 575-581.
9. Azuma S., Kodama T., Honda K. and Inoué S. (1996). State-dependent changes of extracellular glutamate in the medial preoptic area in freely behaving rats. *Neurosci. Lett.* 214: 179-182.
10. Baghdoyan H.A. and Lydic R. (1999). M2 muscarinic receptor subtype in the feline medial pontine reticular formation modulates the amount of Rapid Eye Movements Sleep. *Sleep* 22 (7): 835-847.
11. Barg J., Fride E., Hanus L., Levy R., Matus-Leibovitch N., Heldman E., Bayewitch M., Mechoulam R. and Vogel Z. (1995). Cannabinomimetic behavioral effects of and adenylate cyclase inhibition by two new endogenous anandamides. *Eur. J. Pharmacol.* 287: 145-152.
12. Basile A.S., Hanus L. and Mendelson W. (1999). Characterization of the hypnotic properties of oleamide. *Neuroreport* 10 (5): 947-951.
13. Benkert O. and Kohler B. (1972). Intrahypothalamic and intrastriatal dopamine and norepinephrine injection in relation to motor hyperactivity in the rat. *Psychopharmacol.* 24 (2): 318-325.
14. Berglund B.A., Boring D.L., Wilken G.H., Makriyannis A. and Howlett A.C. (1998). Structural requirements for arachidonyl ethanolamide interaction with CB₁ and CB₂ cannabinoid receptors: pharmacology of the carbonyl and ethanolamide groups. *Prost. Leuk. Essent. Fatty Acids.* 59 (2): 111-118.
15. Berglund B.A., Fleming P.R., Rice K.C., Shim J.-Y., Welsh W.J. and Howlett A.C. (2000). Development of a novel class of monocyclic and bicyclic alkyl amides that exhibit CB₁ and CB₂ cannabinoid receptor affinity and receptor activation. *Drugs Design and Discovery* 16: 281-294.
16. Birnbaumer L. (1990). G proteins in signal transduction. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30: 675-705.
17. Birnbaumer L., Nakahara T. and Yang P.-Ch. (1974). Studies on receptor-mediated activation of adenylyl cyclases. II. Nucleotide and nucleoside regulation of the activities of the beef renal medullary adenylyl cyclase and their stimulation by neurohypophysial hormones. *J. Biol. Chem.* 249: 7857-7866.
18. Bisogno T., Berrendero F., Ambrosino G., Cebalra M., Ramos J.A., Fernández-Ruiz J.J. and Di Marzo V. (1999). Brain regional distribution of endocannabinoids: Implications for their biosynthesis and biological function. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 256: 377-380.
19. Bisogno T., Katayama K., Melck D., Ueda N., De Petrocellis L., Yamamoto S. and Di Marzo V. (1998). Biosynthesis and degradation of bioactive fatty acid amides in human breast cancer and rat pheochromocytoma cells. Implications for cell proliferation and differentiation. *Eur. J. Biochem.* 254: 634-642.
20. Boger D.L., Patterson J.E. and Jin Q. (1998). Structural requirements for 5-HT_{2A} and 5-HT_{1A} serotonin receptor potentiation by the biologically active lipid oleamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 4102-4107.
21. Borbély A. and Tobler I. (1980). The search for and endogenous sleep substance. *TIPS* 1: 356-358.
22. Boring, D.L., Berglund, B.A. and Howlett, A.C. (1996). Cerebrodiene, arachidonyl-ethanolamide, and hybrid structures: potential for interaction with brain cannabinoid receptors. *Prost. Leukot. Essent. Fatty Acids* 55 (3):207-210.
23. Bosch R.R., Patel A.M.P., Van Emst-de Vries S.E., Smeets R.L.L., De Pont J.J.H.H. and Willems P.H.G.M. (1998). U73122 and U73343 inhibit receptor-mediated phospholipase D activation downstream of phospholipase C in CHO cells. *Eur. J. Pharmacol.* 346: 345-351.

24. Bouaboula M., Bourrie B., Rinaldi-Carmona M., Shire D., Le Fur G. and Casellas P. (1995). Stimulation of cannabinoid receptor CB1 induces krox-24 expression in human astrocytoma cells. *J. Biol. Chem.* 270: 13973-13980.
25. Bouaboula M., Poinotchazel C., Bourrie B., Canat X., Calandra B., Rinaldi-Carmona M., Le Fur G. and Casellas P. (1996). Activation of mitogen-activated protein-kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor. *Biochem J.* 312: 637-341.
26. Brown R.E., Stevens D.R. and Hass H.L. (2001). The physiology of brain histamine. *Progr. Neurobiol.* 63: 637-672.
27. Buckley N.E., Hansson S., Harta G. and Mezzy E. (1998). Expression of the CB₁ and CB₂ receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat. *Neurosci.* 82 (4): 1131-1149.
28. Burstein S., Budrow J., Debatis M., Hunter S.A. and Subramanian A. (1994). Phospholipase participation in cannabinoid-induced release of free arachidonic acid. *Biochem. Pharmacol.* 48 (6): 1253-1264.
29. Cadas H., di Tomaso E. and Piomelli D. (1997). Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain. *J. Neurosci.* 17: 1226-1242.
30. Capece M.L. and Lydic R. (1997). cAMP and protein kinase A modulate cholinergic rapid eye movement sleep generation. *Am. J. Physiol.* 273: 1430-1440.
31. Cape E.G. and Jones B.E. (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.
32. Carskadon M.A. and Dement W.C. (2000). Normal human sleep: An overview. *En: Principles and Practice of Sleep Medicine.* Kryger, Roth, Dement (Eds.) W.B. Saunders Company. U.S.A. pp: 15-25.
33. Casado M. and Ascher P. (1998). Opposite modulation of NMDA receptors by lysophospholipids and arachidonic acid: common features with mechanosensitivity. *J. Physiol.* 513 (2): 317-330.
34. Celesia G.G. and Jasper H.H. (1966). Acetylcholine released from cerebral cortex in relation to state of activation. *Neurology.* 16: 1053-1064.
35. Cheer J.F., Cadogan A.-K., Mardsen C.A., Fone K.C.F. and Kendall D.A. (1999). Modification of 5-HT₂ receptor mediated behaviour in the rat by oleamide and the role of cannabinoid receptors. *Neuropharmacology.* 38: 533-541.
36. Chemelli R.M., Willie J.T., Sinton C.M., Elmquist J.K., Scammell T., Lee C., Richardson J.A., Williams S.C., Xiong Y., Kisanuki Y., Fitch T.E., Nakazato M., Hammer R.F., Saper C.B. and Yanagisawa M. (1999). Narcolepsy in orexin knockout mice: Molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 48: 437-451.
37. Clemente C.D. and Sterman M.B. (1967). Limbic and other forebrain mechanisms in sleep induction and behavioral inhibition. *Progr. Brain Res.* 27: 34-47.
38. Clements, M.P. (1995). Increase in release of arachidonic acid following passive avoidance training in the day-old chick. *J. Neurochem.* 67: 1317-1323.
39. Clements MP. and Rose SP. (1996). Time-dependent increase in release of arachidonic acid following passive avoidance training in the day-old chick. *J. Neurochem.* 67 (3): 1317-1323.
40. Cockroft S. and Gomperts B.D. (1985). Role of guanine nucleotide binding protein in the activation of polyphosphoinositide phosphodiesterase. *Nature* 314: 534-536.
41. Corsi Cabrera M. (1983). *Psicofisiología del sueño.* Editorial Trillas. México D.F.
42. Costa B., Giagnoni G. and Colleoni M. (2000). Precipitated and spontaneous withdrawal in rats tolerant to anandamide. *Psychopharmacology.* 149: 121-128.
43. Cravatt B.F., Giang D.K., Mayfield S.P., Boger D.L., Lerner R.A. and Gilula N.B. (1996). Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 384: 83-87.
44. Cravatt, B.F., Prospéro-García, O., Siuzdak G., Gilula, N., Henriksen, S.J., Boger, D.L. and Lerner, R.A. (1995). Chemical characterization of a family of brain lipids that induce sleep. *Science* 268: 1506-1509.
45. Danesh U., Weber P.C. and Sellmayer A. (1994). Arachidonic acid increases c-fos and Erg-1 mRNA in 3T3 fibroblast by formation of prostaglandin E2 and activation of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 269 (44): 27258-27263.
46. Datta S. (1999). PGO Waves generation: Mechanism and functional significance.. *En: Rapid Eye Movement Sleep.* Mallick and Inoué (Eds). Narosa Publishing House, New Delhi, India. pp: 91-106.
47. de Lecea J., Criado J.R., Prospéro-García O., Gautvik K.M., Schweitzer P., Danielson P., Dunlop D.L.M., Siggins G.R., Henriksen S.J. and Sutcliffe J.G. (1996). A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. *Nature* 381: 242-245.

48. de Mignel R., Romero J., Muñoz R.M., García-Gil L., González S., Villanua M.A., Makrjannis A., Ramos J.A. and Fernández-Ruiz J.J. (1998). Effects of cannabinoids on prolactin and gonadotrophin secretion: involvement of changes in hypothalamic gamma-aminobutyric acid (GABA) inputs. *Biochem. Pharmacol.* 56 (10): 1331-1338.
49. Deutsch D. and Chin S.A. (1993). Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochem. Pharmacol.* 46 (5): 791-796.
50. Devane W.A. and Axelrod J. (1994). Enzymatic synthesis of anandamide, an endogenous ligand for the cannabinoid receptor, by brain membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 6698-6671.
51. Devane W.A., Hanus L., Breuer A., Pertwee R.G., Stevenson L.A., Griffin G., Gibson D., Mandelbaum A., Etinger A. and Mechoulam R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258: 1946-1949.
52. Devane W.A., Dysarz F.A., Johnson M.R., Melvin L.S and Howlett A.C. (1988). Determination and characterization of cannabinoid receptor in rat brain. *Mol. Pharmacol.* 34: 605-613.
53. Di Marzo V. (1998) "Endocannabinoids" and other fatty acid derivatives with cannabimimetic properties: biochemistry and possible physiopathological relevance. *Biochem. Biophys. Acta* 1392: 153-175.
54. Di Marzo V., De Petrocellis L., Bisogno T. and Melck D. (1999). Metabolism of anandamide and 2-arachidoylglycerol: An historical overview and some recent developments. *Lipids* 34: S319-S325.
55. Di Marzo V., Hill M.P., Bisogno T., Crossman A.R. and Brotchie J.M. (2000). Enhanced levels of endogenous cannabinoids in the globus pallidus are associated with a reduction in movement in an animal model of Parkinson's disease. *FASEB J.* 14 (10): 1432-1438.
56. Di Marzo V., Sepe N., De Petrocellis L., Berger A., Crozier G., Fride E. and Mechoulam R. (1998). Trick or treat from food endocannabinoids?. *Nature* 396: 636-637.
57. Di Tomasso E., Beltramo M. and Piomelli D. (1996). Brain cannabinoids in chocolate. *Nature* 382: 677-678.
58. El Mansari M., Sakai K. and Jouvet M. (1989). Unitary characteristics of presumptive cholinergic tegmental neurons during the sleep-waking cycle in freely moving cats. *Exp. Brain Res.* 76: 519-529.
59. Fan G.H., Zhu T.H., Zhang W.B. and Pei G. (1998). Suppression of phospholipase C blocks G_i-mediated inhibition of adenylyl cyclase activity. *Eur. J. Pharmacol.* 341: 317-322.
60. Fan P. (1995). Cannabinoids agonist inhibit the activation of 5-HT₃ receptors in rat nodose ganglion neurons. *J. Neurophysiol.* 73 (2): 907-910.
61. Farooqui A.A., Hirashima Y. and Horrocks L.A. (1992). Brain phospholipases and their role in signal transduction. In: *Neurobiology of Essential Fatty Acids*. Bazan N.G., Toffano G. and Murphy M. (Eds.) Plenum Press, New York, pp11-25.
62. Farooqui A.A., Yang H.-Ch., Rosenberg T.A. and Lloyd A.H. (1997). Phospholipase A₂ and its role in brain tissue. *J. Neurochem.* 69: 889-901.
63. Faulhaber J., Steiger A. and Lancel M. (1997). The GABA_A agonist THIP produces slow wave sleep and reduces spindling activity in NREM sleep in humans. *Psychopharmacol.* 130: 285-291.
64. 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): 782-794.
65. 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.
66. Felder Ch., Briley E., Axelrod J., Simpson J.T., Mackie K. and Devane W. (1993). Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7656-7660.
67. Felder Ch., Nielsen A., Briley EM, Palkovits M, Priller J, Axelrod J, Nguyen D.N, Richardson JM, Riggin 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.
68. Felder C.C. and Glass M. (1998). Cannabinoid receptors and their endogenous agonists. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38: 179-200.
69. Femel V., Koski G. and Pappenheimer J. (1971). Factors in cerebrospinal fluid from goats that affect sleep and activity in rats. *J. Physiol.* 216: 565-589.
70. Findlay A.L.R. and Hayward J.N. (1969). Spontaneous activity of single neurons in the hypothalamus of rabbits during sleep and waking. *J. Physiol.* 20: 237-258.
71. Freud S. (1943). La interpretación de lo sueños. En: Editorial Sudamericana. Obras completas. Vol. 6-7. Buenos Aires, Argentina.
72. Fride E. and Mechoulam R. (1993). Pharmacological activity of the cannabinoid receptor agonist, anandamide, a brain constituent. *Eur. J. Pharmacol.* 231: 313-314

73. Gaoni Y. and Mechoulam R. (1964). Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J. Am. Chem. Soc.* 86: 1646-1647.
74. Garcia D.E., Brown S., Hille B. and Mackie K. (1998). Protein Kinase C disrupts cannabinoid actions by phosphorylation of the CB1 cannabinoid receptor. *J. Neurosci.* 18 (8): 2834-2841.
75. Garcia-Garcia F. and Drucker-Colin R. (1999). Endogenous and exogenous factors on sleep-wake cycle regulation. *Progr. Neurobiol.* 58: 297-314.
76. Gerdeman G. and Lovinger D.M. (2000). CB₁ cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum. *J. Neurophysiol.* 85 (1): 468-471.
77. Gerozissis K., de Saint Hilaire Z., Orosco M., Rouch C. and Nicolaï S. (1995). Changes in hypothalamic prostaglandin E₂ may predict the occurrence of sleep or wakefulness as assessed by parallel EEG and microdialysis in the rat. *Brain Res.* 689: 239-244.
78. Gervasoni D., Darracq L., Fort P., Chouvet G. and Luppi P-H. (1998). Electrophysiological evidence that noradrenergic neurons of the rat locus coeruleus are tonically inhibited by GABA during sleep. *J. Neurosci.* 10: 964-970.
79. Gessa G.L., Mascia M. S., Casu M.A. and Carta G. (1997). Inhibition of hippocampal acetylcholine release by cannabinoids: reversal by SR141716A. *Eur. J. Pharmacol.* 327: R1-R2.
80. Giang, D.K. and Cravatt, B.F. (1997). Molecular characterization of human and mouse fatty acid amide hydrolases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 2238-2242.
81. Glass M., Dragunow M. and Fauli 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.
82. Glass M., Faul R.L.M. and Dragunow M. (1993). Loss of cannabinoid receptors in the substantia nigra in Huntington's disease. *Neurosci.* 56 (3): 523-527.
83. Gobbi M., Mennini T., Valle F.D., Cervo L., Salmons M. and Diomedea L. (1999). Oleamide-mediated sleep induction does not depend on perturbation of membrane homeoviscosity. *FEBS Lett.* 463: 281-284.
84. Gómez del Pulgar T., Velasco G. and Guzmán M. (2000). The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt. *Biochem. J.* 347: 369-373.
85. Goparaju S.K., Ueda N., Yamaguchi H. and Yamamoto S. (1998). Anandamide amidohydrolase reacting with 2-arachidonoylglycerol, another cannabinoid receptor ligand. *FEBS Lett.* 422: 69-73.
86. Gritti I., Mainville L., Mancina M. and Jones B.E. (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.
87. Gruol D.L., Conroy S.M., Trotter C. and Netzeband J.G. (1999). Cannabinoids enhance NMDA-evoked calcium signals in cerebellar granule neurons via phospholipase C and calcium release from IP₃-gate stores. *Soc. Neurosci. Abst.* 25: 1460.
88. Guan X., Cravatt B.F., Ehring GR., Hall JE., Boger DL., Lerner RA. and Gilula N. (1997). The sleep-inducing lipid oleamide deconvolutes gap junction communication and calcium waves transmission in glial cells. *J. Cell Biol.* 139 (7): 1785-1792.
89. Hagan J.J., Leslie R.A., Patel S., Evans M.L., Wattam T.A., Holmes S., Bendham C.D., Taylor S.G., Routhledge C., Hemmati P., Minton R.P., Ashmeade T.E., Shah A.S., Hatcher J.P., Hatcher P.D., Jones D.N.C., Smith M.L., Piper D.C., Hunter A.J., Porter R.A. and Upton N. (1999). Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 10911-10916.
90. Hampson A.J., Bornheim L.M., Seanziani M., Yost C.S., Gray A.T., Hansen B.M., Leonoudakis D.J. and Bickler P.E. (1998). Dual effect of anandamide on NMDA receptor-mediated responses and neurotransmission. *J. Neurochem.* 70: 671-676.
91. Hanus L.O., Fales H.M., Spande T.F. and Basile A.S. (1999). A gas chromatographic-Mass spectral assay for the quantitative determination of oleamide in biological fluids. *Ann. Biochem.* 270: 159-166.
92. Hayashi O. (1991). Molecular mechanisms of sleep-wake regulation: roles of prostaglandins D₂ and E₂. *FASEB J.* 5: 2575-2581.
93. Hedlund P.B., Carson M.J., Sutcliffe J.G. and Thomas E.A. (1999). Allosteric regulation by Oleamide of the binding properties of 5-hydroxytryptamine₇ receptors. *Biochem. Pharmacol.* 58: 1807-1817.
94. Herkenham M., Lynn A.B., Little M.D., Johnson M.R., Melvin L.S., de Costa B.R. and Rice K. (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 1932-1936.
95. Hernández-Preón R. and Chávez-Ibarra G. (1963). Sleep induced by electrical or chemical stimulation of the forebrain. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 24: 188-198.

96. Hess R. Jr., Koella W.P and Akert K. (1953). Cortical and subcortical recordings in natural and artificially induced sleep in cats. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 5: 75-90.
97. Hilliard C.J. (2000). Biochemistry and pharmacology of the endocannabinoids arachidonylethanolamide and 2-arachidonylglycerol. *Prost. Lip. Med.* 61: 3-18.
98. Ho Y.B., Uezono Y., Takada S., Takase I. and Izumi F. (1999). Coupling of the expressed cannabinoid receptor CB1 and CB2 receptors to phospholipase C and G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels. *Rec. Chann.* 6 (5): 363-374.
99. Hobson J.A., McCarley R.W. and Wyzinski P.W. (1975). Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science* 189: 55-58.
100. Hollister L.E. (1986). Health aspects of cannabis. *Pharmacol. Rev.* 38 (1):1-20.
101. Höltscher C. (1995). Prostaglandins play a role in memory consolidation in the chick. *Eur. J. Pharmacol.* 294: 253-259.
102. Höltscher C. and Rose S.P.R. (1994). Inhibitors of phospholipase A₂ produce amnesia for a passive avoidance task in the chick. *Behav. Neur. Biol.* 61: 225-232.
103. Howlett A.C. and Fleming R.M. (1984). Cannabinoid inhibition of adenylyl cyclase: Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol. Pharmacol.* 26: 532-538.
104. Howlett A.C. and Mukhopadhyay S. (2000). Cellular signal transduction by anandamide and 2-arachidonylglycerol. *Chem. Phys. Lipids* 108: 53-70.
105. Huguenard J.R. (1998). Anatomical and physiological considerations in thalamic rhythm generation. *J. Sleep Res.* 7 Suppl 1: 24-29.
106. Huidobro-Toro J.P. and Harris R.A. (1996). Brain lipids that induce sleep are novel modulators of 5-hydroxytryptamine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8078-8082.
107. Huitrón-Reséndiz S., Patterson J.E., Griffin P.S., Boger D.L., Cravatt B.F. and Henriksen S.J. (1998). Inhibitors of the enzyme oleamide hydrolase and hydrolysis resistant oleamide analogs alter sleep patterns in rats. *Soc. Neurosci. Abst.* 24: 695.
108. Hulme E.C., Birdsall N.J.M. and Buckley N.J. (1990). Muscarinic receptors subtypes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30: 633-673.
109. Ineri L., Bianchi S., Angeli P. and Mancina M. (1994). Selective blockade of different brain stem muscarinic receptor subtypes: effects on the sleep-wake cycle. *Brain Res.* 636: 68-72.
110. Inagaki N., Yamatodani A., Ando-Yamamoto M., Tohyama M., Watanabe T., Wada H. (1988). Organization of histaminergic fibers in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 273 (3): 283-300.
111. Inoué S., Honda K., Kimura M. and Zhang S.-Q. (1999). Endogenous sleep substances and REM Sleep. En: *Rapid Eye Movement Sleep*. Mallick and Inoué (Eds.) Marcel Dekker, Inc. U.S.A. pp:248-263.
112. Jacobs B.L. and McGinty D.J. (1971). Amygdala unit activity during sleep and wakefulness. *Exp. Neurol.* 33:1-15
113. Jan Ch-R., Ho Ch-M., Wu S-N, and Tseng Ch-J. (1998). The phospholipase C inhibitor U73122 increases cytosolic calcium in MDCK cells by activating calcium influx and releasing stored calcium. *Life Sci.* 63 (10): 895-908.
114. Jarrahan A., Maana S., Edgemond W.S., Campbell W.B. and Hilliard C.J. (2000). Structure-activity relationships among N-arachidonylethanolamine (anandamide) head group analogues for the anandamide transporter. *J. Neurochem.* 74: 2597-2606.
115. Jasper H.H., Khan R.T. and Elliot K.A.C. (1965) Amino acids released from the cerebral cortex in relation to its state of activation. *Science* 147: 1448
116. Jiménez-Anguiano A., Báez-Saldaña A. and Drucker-Colín R. (1993). Cerebrospinal fluid (CSF) extracted immediately after REM sleep deprivation prevents REM rebound and contains vasoactive intestinal peptide (VIP). *Brain Res.* 631: 345-348.
117. Jones B. (1991). Paradoxical sleep and its chemical/structural substrates in the brain. *Neurosci.* 40 (3): 637-656.
118. 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.
119. Jones B.E. and Yang T. (1985). The efferent projections from the reticular formation and the locus coeruleus studied by anterograde and retrograde axonal transport in the rat. *J. Comp. Neurol.* 242: 56-92.
120. Jones B.E. and Mühlthaler M. (1999). Cholinergic and GABAergic neurons of the basal forebrain: Role in cortical activation. En: *Handbook of Behavioral State Control. Cellular and Molecular Mechanisms*. Lydic and Baghdoyan (Eds). CRC Press U.S.A. pp: 213-234.
121. Kafi S. and Gaillard J.M. (1976). Brain dopamine receptors and sleep in the rat: effects of stimulant blockade. *Eur. J. Pharmacol.* 38 (2): 357-363.

122. Katan M. (1998). Families of phosphoinositide-specific phospholipase C: structure and function. *Biochem. Biophys. Acta* 1436: 5-17.
123. Kaneko C.R.S., Evinger C. and Fuchs A.F. (1981). Role of cat pontine burst neurons in generation of saccadic eye movements. *J. Neurophysiol.* 46: 761-784.
124. Katsuki H. and Okuda S. (1995). Arachidonic acid as a neurotoxic neurotrophic substance. *Progr. Neurobiol.* 4: 607-636.
125. 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.
126. Kim D.J. and Thayer S.A. (2000). Activation of CB1 cannabinoid receptors inhibits neurotransmitter release from identified synaptic sites in rat hippocampal cultures. *Brain Res.* 852: 398-405.
127. Kimura T., Ohta T., Watanabe K., Yoshimura H. and Yamamoto I. (1998). Anandamide, an endogenous cannabinoid receptor ligand, also interacts with 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptor. *Biol. Pharm. Bull.* 21 (3): 224-226.
128. Kinney G.G., Vogel G.W. and Feng P. (1998). Brainstem carbachol injections in the urethane anesthetized rat produce hippocampal theta rhythm and cortical desynchronization: a comparison of pedunculopontine tegmental versus nucleus pontis oralis injections. *Brain Res.* 809: 307-313.
129. Kodama T. (1999). Neurotransmitters changes and REM sleep. En: *Rapid Eye Movement Sleep*. Mallick and Inoué (Eds.) Marcel Dekker, Inc. U.S.A. pp:194-213.
130. Kodama T., Takahashi Y. and Honda Y. (1990). Enhancement of acetylcholine release during paradoxical sleep in the dorsolateral tegmental field of the cat brain stem. *Neurosci. Lett.* 114: 277-282.
131. Kodama T., Lai X. and Siegel J.M. (1998). Enhanced glutamate release during REM sleep in the rostromedial medulla as measured by in vivo microdialysis. *Brain Res.* 780: 178-181.
132. Krueger J., Pappenheimer J. and Karnovsky M. (1982). The composition of sleep-promoting factor isolated from human urine. *J. Biol. Chem.* 257: 1664-1669.
133. Lai Y-Y. and Siegel J.M. (1999). Muscle atonia in REM Sleep. En: *Rapid Eye Movement Sleep*. Mallick and Inoué (Eds.) Narosa Publishing House, New Delhi, India. pp: 69-90.
134. Langstein J., Hofstädter F. and Schwarz H. (1996). Cis -9,10- octadecenoamide, an endogenous sleep-inducing CNS compound, inhibits lymphocyte proliferation. *Res. Immunol.* 147: 389-396.
135. Laugharne J.D.E., Mellor J.E. and Peet M. (1996). Fatty acids and schizophrenia. *Lipids* 31:S163-S165.
136. Lees G., Edwards M.D., Hassoni A.A., Ganelli C.R. and Galanakis D. (1998). Modulation of GABA_A receptors and inhibitory synaptic currents by the endogenous CNS sleep regulator cis-9, 10-octadecenoamide (COA). *Brit. J. Pharmacol* 124: 873-882.
137. Lerner, R.A., Siuzdak, G., Prospéro-García, O., Henriksen, S.J., Boger, D.L. and Cravatt, B.F. (1994). Cerebrodienne: A brain lipid isolated from sleep-deprived cats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9505-9508.
138. Leweke F.M., Giuffrida A., Wurster U., Emrich H.M. and Piomelli D. (1999). Elevated endogenous cannabinoids in schizophrenia. *Neuroreport* 10: 1665-1669.
139. Lih L.-L., Wartmann M., Lin A.Y., Knopf J.L., Seth A. and Davis R.L. (1993). cPLA₂ is phosphorylated and activated by MAP Kinase. *Cell* 72: 269-278.
140. Lin L., Faraco J., Ji R., Kadotani H., Rogers W., Lin X., Qui X., deJong P.J., 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.
141. Long, S.D. and Pekala, P.H. (1996). Regulation of GLUT4 gene expression by arachidonic acid. *J. Biol. Chem.* 271 (2): 1138-1144.
142. Los Clásicos. La Divina Comedia. 7ª Edición. W.M. Jackson Inc. (Eds) 1976, México.
143. Luppi P-H., Peyron Ch., Rampon C., Gervasoni D., Barbagli B., Boissard and Fort P. (1999). Inhibitory mechanisms in the dorsal raphe nucleus and locus coeruleus during sleep. En: *Handbook of Behavioral State Control. Cellular and Molecular Mechanisms*. Lydic and Baghdoyan (Eds). CRC Press U.S.A. pp:195-212.
144. Maccarrone M., Attina M., Cartoni A., Bari M. and Finazzi-Agno A. (2001). Gas chromatography-mass spectrometry analysis of endogenous cannabinoids in healthy and tumoral human brain and human cells in culture. *J. Neurochem.* 76 (2): 594-601.
145. Mackie K and Hillie B. (1992). Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3825-3829.
146. Mackie K., Devane W.A. and Hille B. (1993). Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits calcium currents as a partial agonist in N18 neuroblastoma cells. *Mol. Pharmacol.* 44: 498-503.

147. Mackie K., Lai Y., Westenbroek R. and Mitchell R. (1995). Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in ATT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptors. *J. Neurosci.* 15: 6552-6561.
148. Mallet P. and Beninger R.J. (1998) The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716A attenuates the memory impairment produced by Δ^9 -tetrahydrocannabinol or anandamide. *Psychopharmacol.* 140: 11-19.
149. Marrosu F., Portas C., Mascia M.J., Casu M.A., Fa M., Giagheddo M., Imperato A. and Gessa G.L. (1995). Microdialysis measurement of cortical and hippocampal acetylcholine release during sep-wake cycle in freely moving cats. *Brain Res.* 671 (2): 329-332.
150. Martin B.R. (1986). Cellular effects of cannabinoids. *Pharmacol. Rev.* 38 (1): 45-74.
151. Martin S.A., Kornovsky M.L., Krueger J.M., Pappenheimer J.R. and Biemann K. (1984). Peptideglycans as promoters of slow-wave sleep. I. Structure of the sleep-promoting factor isolated from human urine. *J. Biol. Chem.* 259 (20): 12652-12658.
152. Matsuda L.A., Lolait S.J., Brownstein M.J., Young A.C. and Bonner T.I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346: 561-564.
153. Maurelli S., Bisogno T., De Petrocellis L., Di Luccia A., Marino G. and Di Marzo V. (1995). Two novel classes of neuroactive fatty acid amides are substrates for mouse neuroblastoma "anandamide amidohydrolase". *FEBS Lett.* 377: 82-86.
154. Mazzuchelli-O'Flaherty A.L., O'Flaherty J.J. and Hernández-Peón R. (1967). Sleep and other behaviors responses induced by acetylcholinergic stimulation of frontal and mesial cortex. *Brain Res.* 4 (2): 268-283.
155. McCormick D.A. (1992). Neurotransmitter actions in the thalamus and cerebral cortex and their role in neuromodulation of thalamocortical activity. *Progr. Neurobiol.* 39 (4): 337-388.
156. McGahan B. and Lynch M.A. (1998). Analysis of the interaction between arachidonic acid and metabotropic glutamate receptor activation reveals that phospholipase C acts as a coincidence detector in the expression of long-term potentiation in the rat dentate gyrus. *Hippocampus* 8: 48-56.
157. McGinty D.J. and Serman M.B. (1968). Sleep suppression after basal forebrain lesions in cat. *Science* 160: 1253-1255.
158. McGinty D.J. and Harper R.M. (1976). Dorsal raphe neurons: depression of firing during sleep in cats. *Brain Res.* 101: 569-575.
159. Mechoulam R. (1999). Recent advances in Cannabinoid research. *Forsch. Kompl.* 6 (Suppl. 3): 16-20.
160. Mechoulam R., and Ben-Shabat S. (1999). From *gan-zi-gun-nu* to anandamide and 2-arachidonoylglycerol: the ongoing story of cannabis. *Nat. Prod. Rep.* 16: 131-143.
161. Mechoulam R., Ben-Shabat S., Hanus L., Ligumsky M., Kaminski N.E., Schatz A.R., Gopher A., Almon S., Martin B.R., Compton D.R., Pertwee R.G., 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.
162. Mechoulam R., Frider E., Hanus L., Sheskin T., Bisogno T., Di Marzo V., Bayewitch M. and Vogel, Z. (1997). Anandamide may mediate sleep induction. *Nature* 389: 25-26.
163. Mechoulam R., Frider E. and Di Marzo V. (1998). Endocannabinoids. *Eur. J. Pharmacol.* 359: 1-18.
164. Mendelson W.B. and Basile A.S. (1999). The hypnotic actions of oleamide are blocked by a cannabinoid receptor antagonist. *Neuroreport* 10: 3237-3239.
165. Mesulam M.M., Mufson E.J., Wainer B.A. and Levey A.I. (1983). Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neurosci.* 10 (4): 1185-1201.
166. Mikiten T., Niebyl P. and Hendley C. (1961). EEE desynchronization during behavioral sleep associated with spike discharges from the thalamus of the cat. *Fed. Proc.* 327.
167. Miller B., Sarantis M., Traynelis S. and Attwell D. (1992). Potentiation of NMDA receptor currents by arachidonic acid. *Nature* 355: 722-725.
168. Min D.S., Cho N.J., Ion S.H., Lee Y.H., Hahn S.-J., Lee K.-H., Kim M.-S. and Jo Y.-H. (2000). Phospholipase C, Protein Kinase C, Ca^{2+} /Calmodulin-dependent Protein Kinase II, and Tyrosine Phosphorylation are involved in carbachol-induced Phospholipase D activation in Chinese Hamster Ovary Cells expressing muscarinic acetylcholine receptor of *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurochem.* 75: 274-281.
169. Min-Che J.H., Xian H. and Bacaner M. (1992) Long-chain fatty acids activate calcium channels in ventricular myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 6452-6456.
170. Mombouli J-V., Schaeffer G., Holzmann S., Kostner G.M. and Graier W.F. (1999). Anandamide-induced mobilization of cytosolic Ca^{2+} in endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 126: 1593-1600.

171. Monnier M. and Hosli L. (1965). Humoral transmission of sleep and wakefulness. II. Hemodialysis of a sleep inducing humor during stimulation of the thalamus somnogenic area. *Pfluegers Arch.* 282: 68-75.
172. Monnier M., Sauer R. and Hatt AM. (1970). The activating effect of histamine on the central nervous system. *Int. Rev. Neurobiol.* 12: 265-305.
173. Morales F.R. and Chase M.H. (1978). Intracellular recording of lumbar motoneuron membrane potential during sleep and wakefulness. *Exp. Neurol.* 62: 821-827.
174. Moreton J.E. and Davis W.M. (1973). Electroencephalographic study of the effects of tetrahydrocannabinol on sleep in the rat. *Neuropharmacol.* 12: 897-907.
175. Moruzzi G. and Magoun H. (1949). Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 1: 455-473.
176. Munro S, Thomas K.L. and Abu-Shaar M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365: 61-65.
177. Murayama T., Kajiyama Y. and Nomura Y. (1990). Histamine-stimulated and GTP-binding proteins-mediated phospholipase A₂ activation in rabbit platelets. *J. Biol. Chem.* 265 (8): 1459-1464.
178. Murillo-Rodríguez E., Giordano M., Sánchez-Alavez M., Navarro L., Palomero-Rivero M., Martínez de la Escalera G., Drucker-Colín R., Henriksen S.J. and Prospéro-García O. (1998a). Oleamide, a sleep-inducing lipid, impairs long-term memory, motor behavior and induces analgesia. *Soc. Neurosci. Abst.* 24: 687.
179. Murillo-Rodríguez E., Sánchez-Alavez M., Navarro L., Martínez-González D., Drucker-Colín R. and Prospéro-García O. (1998b). Anandamide modulates sleep and memory in rats. *Brain Res.* 812: 270-274.
180. Murillo-Rodríguez E., Désamud F., Giuffrida A., Prospéro-García O. and Piomelli D. (2001). Diurnal variations of endogenous cannabinoids-like compounds in the rat. En preparación.
181. Nakamura S. (1993). Involvement of phospholipase A₂ in axonal regeneration of brain noradrenergic neurones. *Neuroreport* 4: 371-374.
182. Nakazi M., Bauer U., Nickel T., Kathmann M. and Schlicker E. (2000). Inhibition of serotonin release in the mouse brain via presynaptic cannabinoid CB₁ receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 361: 19-24.
183. Nauta W.S.H. (1946). Hypothalamic regulation of sleep in rats: An experimental study. *J. Neurophysiol.* 9: 285-316.
184. Needleman P., Turk J., Jakschik A., Morrison A.R. and Lefkowitz J.B. (1986). Arachidonic acid metabolism. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 69-102.
185. Nishino S., Ripley B., Overem S., Lammers G.J. and Mignot E. (2000). Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *Lancet* 355: 39-41.
186. Nishizaki T., Nomura T., Matsuoka T. and Tsujishita Y. (1999). Arachidonic acid as a messenger for the expression of long-term potentiation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 254: 446-449.
187. Nitz D. and Siegel J.M. (1996). GABA release in posterior hypothalamus across sleep-wake cycle. *Am. J. Physiol.* 271 40: R1707-R1712.
188. Nitz D. and Siegel J.M. (1997). GABA release in the dorsal raphe nucleus: role in the control of REM sleep. *Am. J. Physiol.* 273 (42): R451-R455.
189. Nuevo Testamento. Versión Popular. 3ª Edición. Soc. Bíblicas Unidas. 1979. Bogotá, Colombia.
190. Obai Jr F. and Krueger J.M. (1999). Hormones and REM Sleep. En: *Rapid Eye Movement Sleep*. Mallick and Inoué (Eds). Narosa Publishing House, New Delhi, India. pp 233-247.
191. Onuf H., Ueno R., Fujita I., Nishino H., Oomura Y. and Hayaishi O. (1988). Prostaglandin D₂ a cerebral sleep-inducing substance in monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4082-4086.
192. Patel N.A., Moldow R.L., Patel J.A., Wu d-G. and Chang S.L. (1998). Arachidonyl ethanolamide (AEA) activation of FOS proto-oncogene protein immunoreactivity in the rat brain. *Brain Res.* 797: 225-233.
193. Pavel S., Psatta D. and Goldstein R. (1977). Slow wave sleep induced in cats by extremely small amounts of synthetic and pineal vasotocin injected into the third ventricle of the brain. *Brain Res. Bull.* 2 (4): 251-254.
194. Paxinos G. and Watson C. (1982). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic press. Australia.
195. Piper D.C., Smith M.I., and Hunter A.J. (1999) The effect of the novel neuropeptide, orexin-A, on the sleep-wake cycle of the rat. *Sleep Res. Online* 2 (Suppl 1): 73
196. Porcella A., Maxia C., Gessa G.L. and Pani L. (2000). The human eye expresses high levels of CB1 cannabinoid receptor mRNA and protein. *Eur. J. Neurosci.* 12 (3): 1123-1127.
197. Porkka-Heiskanen T., Strecker R.E., Thakkar M., Bjorkum A.A., Greene R.W. and McCarley R.W. (1997). Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness. *Science* 276 (5316): 1265-1268.
198. Portas C.M. and McCarley R.W. (1994). Behavioral state-related changes of extracellular serotonin concentration in the dorsal raphe nucleus: A microdialysis study in the freely moving cat. *Brain Res.* 648: 306-312.

199. Prospéro-García O., Morales M., Arankowsky-Sandoval G. and Drucker-Colin R. (1986). Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and cerebrospinal fluid (CSF) of sleep-deprived cats restores REM sleep in insomniacs recipients. *Brain Res.* 385: 169-173.
200. Ram A., Pandey H.P., Matsumura H., Kasahara-Orita K., Nakijama T., Takahata R., Satoh S., Terao A. and Hayaishi O. (1997). CSF levels of prostaglandins, especially the level of prostaglandin D2, are correlated with increasing propensity towards sleep in rats. *Brain Res.* 751: 81-89.
201. Randall M.D and Kendall DA. (1998). Endocannabinoids: a new class of vasoactive substances. *TIPS* 19: 55-58
202. Ranson S.W. (1939). Somnolence caused by hypothalamic lesions in the monkey. *Arch. Neurol. Psychiat.* 49: 1
203. 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.
204. Reggio P.H. and Traore H. (2000). Conformational requirements for endocannabinoids interaction with the cannabinoid receptors, the anandamide transporter and fatty acid amidohydrolase. *Chem Phys. Lip.* 108: 15-35.
205. Rhee S.G. and Choi K.D. (1992). Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes. *J. Biol. Chem.* 267 (25): 12393-12396.
206. Rinaldi-Carmona M., Barth F., Heaulme M., Shire D., Calandra B., Congy C., Martinez S., Maruani J., Nalati G., Caput D., Ferrara P., Soubrie P., Breliere J-C. and LeFur G. (1995). Biochemical and pharmacological characterization of SR141716A, the first potent and selective brain cannabinoid receptor antagonist. *Life Sci.* 56: 1941-1947.
207. Ritenour-Rodgers K.J., Driscoll W.J., Merkle K.A., Merkle D.J. and Mueller G.P. (2000). Induction of peptidylglycine α -amidating monooxygenase in N₁₈TG₂ cells: A model for studying oleamide biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 267: 521-526.
208. Robinson A. and Guilleminault C (1999). Narcolepsy. *En: Sleep Disorders Medicine*, Second Edition, Chokroverty y Daroff (Ed). Butterworth Heinemann USA. pp: 427-440.
209. Rodbell M., Krans H.M.J., Pohl S.L. and Birnbaumer L. (1971). The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. III. Binding of glucagon: Method of assay and specificity. *J. Biol. Chem.* 246: 1861-1871.
210. Rosenthal L. (2000). History of sleep physiology and Medicine. *En: Principles and practice of Sleep Medicine*. Kryger, Roth, Dement (Eds.) W.B. Saunders Company. U.S.A. pp: 1-14
211. Ross B.M., Hudson C., Erlich J.C., Warch J.J. and Kish S.J. (1995). PLA₂ activity is increased in blood of patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Soc. Neurosci. Abstr.* 21: 1736.
212. Sakai K. and Jouvet M. (1980). Brain stem PGO-on cells projecting directly to the cat dorsal lateral geniculate nucleus. *Brain Res.* 194: 500-505.
213. Sakurai T., Amemiya A., Ishii M., Matsuzaki I., Chemelli R.M., Tanaka H., Williams S.C., Rickson J.A., Kozlowski G.P., Wilson S. Arch J.R.S., Buckingham R.E., Haynes A.C., Carr S.A., Annan R.S., McNulty D.E., Liu W-S., Terret J.A., Elshourbagy N.A., Bergsma D.J. and Tanigisawa M. (1998). Orexins and orexins receptors: A family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92: 573-585.
214. Sánchez-Alavez M., Gómez-Chavarrín M., Navarro L., Jiménez-Anguiano A., Murillo-Rodríguez E., Prado-Alcalá R.A., Drucker-Colin R. and Prospéro-García O. (2000). Cortistatin modulates memory processes in rats. *Brain Res.* 858: 78-83
215. Sankaran B., Osterhout J., Wu D. and Smrcka A.V. (1998). Identification of a structural element in phospholipase C beta 2 that interacts with G protein betagamma subunits. *J. Biol. Chem.* 273 (12): 7148-7154.
216. Santucci V., Storme J.J., Soubrie P. and Le Fur G. (1996). Arousal-enhancing properties of the CB1 cannabinoid receptor antagonist SR141716A in rats as assessed by electroencephalographic spectral and sleep-waking analysis. *Life Sci.* 58 (6): PL103-PL110.
217. Schmidt M., Nehls C., Rumenapp U. and Jakobs K.H. (1996). m3 muscarinic receptor-induced and G_i-mediated heterologous potentiation of phospholipase C stimulation: role of phosphoinositide synthesis. *Mol. Pharmacol.* 50: 1038-1046.
218. Schoenenberger G.A. and Monnier M. (1977). Characterization of a delta-electroencephalogram (-sleep)-inducing peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74 (3): 1282-1286.
219. Sellmayer A., Danesch U. and Weber P.C. (1996). Effects of different polyunsaturated fatty acids on growth-related early gene expression and cell growth. *Lipids* 31 (suppl.): S37-S40.
220. Semba K. (1999). The mesopontine cholinergic system: A dual role in REM sleep and Wakefulness. *En: Handbook of Behavioral State Control. Cellular and Molecular Mechanisms*. Lydic and Baghdayan (Eds). CRC Press U.S.A. pp: 161-180.

221. Sepe N., De Petrocellis L., Montanaro F., Cirmino G. and Di Marzo V. (1998). Bioactive long chain *N*-acylethanolamines in five species of edible bivalve molluscs. Possible implications for mollusc physiology and sea food industry. *Biochim. Biophys. Acta* 1389: 101-111.
222. Sheskin T., Hanus L., Slager J., Vogel Z. and Mechoulam R. (1997). Structural requirements for binding of anandamide-type compounds to the brain cannabinoid receptor. *J. Med. Chem.* 40 (5): 659-667.
223. Shiromani P.J., Scammell T., Sherin J.E. and Saper C. (1999). Hypothalamic regulation of sleep. En: *Handbook of Behavioral State Control. Cellular and Molecular Mechanisms*. Lydic and Baghdoyan (Eds). CRC Press U.S.A. pp:311-326.
224. Shute C.C.D. and Lewis P.R. (1967). The ascending cholinergic reticular system: neocortical, olfactory and subcortical projections. *Brain Res.* 90: 497-520.
225. Siegel J.M. (2000). Brainstem Mechanisms generating REM Sleep. En: *Principles and Practice of Sleep Medicine*. Kryger, Roth, Dement (Eds.) W.B. Saunders Company. U.S.A. pp: 112-133.
226. Smith M.I., Piper D.C., Upton N. and Hunter A. (1999). The effect of orexin-B on sleep stage distribution in rat during the lights on (Sleep) period. *Sleep Research online* 2 (Suppl 1): 82
227. Smith P.B., Compton D.R., Welch S.P., Razdan R.K., Mechoulam R. and Martin B.R. (1994). The pharmacological activity of anandamide, a putative endogenous cannabinoid, in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270 (81): 219-227.
228. Soderstrom K. and Johnson K. (2000). CBI cannabinoid receptor expression in brain regions associated with zebra finch song control. *Brain Res.* 857: 151-157.
229. Soderstrom K., Leid M., Moore F.J. and Murray T.F. (2000). Behavioral, pharmacological, and molecular characterization of an amphibian cannabinoid receptor. *J. Neurochem.* 75: 413-423.
230. Stefano G.B., Liu Y. and Goligorsky M.S. (1996). Cannabinoid receptors are coupled to nitric oxide release in invertebrate immunocytes, microglia, and human monocytes. *J. Biol. Chem.* 271 (32): 19238-19242
231. Stein E.A., Fuller S.A., Edgemond W.S. and Campbell W.B. (1996). Physiological and behavioral effects of the endogenous cannabinoid, arachidonylethanolamide (anandamide), in the rat. *Brit. J. Pharmacol.* 119: 107-114.
232. Steffia N., Schweitzer P. and Piomelli D. (1997). A second endogenous cannabinoid ligand that modulates long-term potentiation. *Nature* 388: 773-778.
233. Steriade M., Contreras D. and Amzica F. (1994). Synchronized sleep oscillations and their paroxysmal developments. *Trends Neurosci.* 17: 199-208.
234. Steriade M. and Llinás R. (1988). The functional states of the thalamus and the associated neuronal interplay. *Physiol. Rev.* 68 (3): 649-742.
235. 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.
236. Serman M.B. and Clemente C.D. (1962). Forebrain inhibitory mechanisms: sleep patterns induced by basal forebrain stimulation in the behaving cat. *Exp. Neurol.* 6: 103.
237. Straiker A., Stella N., Piomelli D., Mackie K., Karten H.J. and Maguire G. (1999). Cannabinoid CBI receptors and ligands in vertebrate retina: Localization and function of an endogenous signaling system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (25): 14565-14570.
238. Sugiura T., Kondo S., Kodaka T., Tonegawa T., Nakane S., Yamashita A., Ishima Y. and Waku K. (1996). Enzymatic synthesis of oleamide (cis-9,10- octadecenoamide), an endogenous sleep-inducing lipid, by rat brain microsomes. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 40 (5): 931-938.
239. 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. Commun.* 215: 89-97.
240. Swisher J.E. (1962). Manifestations of active sleep in rat. *Science* 138: 1110-1111.
241. Taber L., Chiu C-H. and Whelan J. (1998). Assesment of the arachidonic acid content in foods commonly consumed in the American diet. *Lipids* 33 (12):1151-1157.
242. Tay A., Simon J.S., Squire J., Hamel K., Jacob H.J. and Skorecki K. (1995). Cytosolic phospholipase A₂ gene in human and rat: Chromosomal localization and polymorphic markers. *Genomics* 26 (1): 138-141.
243. Taylor G.H. (1998). Analysis of the medical use of marijuana and its societal implications. *J. Am. Pharm. Assoc.* 38: 220-227.
244. Thaker G.K., Wagman A.M.I. and Tamminga C.A. (1990). Sleep polygraphy in schizophrenia: methodological issues. *Biol. Psych.* 28: 240-246.
245. Thakkar M., Portas C.M. and McCarley R.W. (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.

246. Thomas E.A., Carson M.J. and Sutcliffe J.G. (1998). Oleamide -induced modulation of 5-hydroxytryptamine receptor-mediated signaling. *Ann. NY Acad. Sci.* 183-189.
247. Thomas E.A., Cravatt B.F., Danielson P.E. Gilula N.B. and 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.
248. Thomas E.A., Cravatt B.F. and Sutcliffe G. (1999). The endogenous lipid Oleamide activates serotonin 5-HT₁ neurons in mouse thalamus and hypothalamus. *J. Neurochem.* 72: 2370-2378.
249. Thompson A.K., Mostafapour S.P., Denlinger L.C., Bleasdale J.E. and Fisher S.K. (1991). The aminosteroid U-73122 inhibits muscarinic receptor sequestration and phosphoinositide hydrolysis in SK-N-SH neuroblastoma cells. A role for Gp in receptor compartmentation. *J. Biol. Chem.* 266 (35): 2385-2362.
250. Trulsson M.E. and Jacobs B.L. (1979). Raphe unit activity in freely moving cats: Correlation with level of behavioral arousal. *Brain Res.* 163: 135-140.
251. Velázquez-Moctezuma J., Gillin J.C. and Shiromani P.J. (1989). Effect of specific M₁ and M₂ muscarinic receptor agonists on REM sleep generation. *Brain Res.* 503 (1):128-131
252. Venance L., Piomelli D., Glowinsky J. and Gjaume Ch. (1995). Inhibition by anandamide of gap junctions and intercellular calcium signalling in striatal astrocytes. *Nature* 376: 590-594.
253. Vickers J.D. (1993). U73122 affects the equilibria between the phosphoinositides as well as phospholipase C activity in unstimulated and thrombin-stimulated human and rabbit platelets. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266 (3): 1156-1163.
254. Villablanca J. (1966). Behavioral and polygraphic study of sleep and wakefulness in chronic decerebrate cats. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 21: 562-577.
255. Voth E.A. and Schwartz R.H. (1997). Medical applications of delta-9-tetrahydrocannabinol and marijuana. *Ann. Intern. Med.* 126: 791-798.
256. Wartmann M., Campbell D., Subramanian A., Burstein S.H. and Davis R.J. (1995). The MAP Kinase signal transduction pathway is activated by the endogenous cannabinoid anandamide. *FEBS Lett.* 359: 133-136.
257. Webster H.H. and Jones B.E. (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.
258. Wiley J., Balster R. and Martin B. (1995). Discriminative stimulus effects of anandamide in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 276: 49-54.
259. Williams C.M. and Kikham T.C. (1999). Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacol.* 143: 315-317.
260. Williams J.A., Comisarow J., Day J., Fibiger H.C. and Reiner P.B. (1994). State-dependent release of acetylcholine in rat thalamus measured by *in vivo* microdialysis. *J. Neurosci.* 14 (9): 5236-5242.
261. Williams J.H., Errington M.L., Lynch M.A. and Bliss T.V.P. (1989). Arachidonic acid induces a long-term activity dependent enhancement of synaptic transmission in the hippocampus. *Nature* 341: 739-742.
262. Winson J. (1972). Interspecies differences in the occurrence of theta. *Behav. Biol.* 7: 479-487.
263. Yost C.S., Hampson A.J., Leonoudakis D., Kobblin D.D., Bornheim M. and Gray A.T. (1998). Oleamide potentiates benzodiazepine-sensitive gamma-aminobutyric acid receptor activity but does not alter minimum alveolar anesthetic concentration. *Anesth. Analg.* 86 (6): 1294-1300.
264. Zepelin 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.
265. Zias J., Stark H., Seligman J., Levy R., Werker E., Breuer A. and Mechoulam R. (1993). Early medical use of cannabis. *Nature* 363: 215-216.
266. Zolotski R.K., Cabeza R. De J. and Gillin C. (1999). Biochemical Pharmacology of Sleep. En: *Sleep Disorders Medicine.* Chokroverty y Daroff (Eds.). Butterworth Heinemann, U.S.A. pp:63-94.

XII.- ARTÍCULO ANEXO Y TRABAJOS EN CONGRESOS.

Los resultados parciales del actual trabajo se enviaron para su presentación y discusión a los siguientes congresos:

9.1 Murillo-Rodríguez, E., Jiménez-Anguiano, A., Sánchez-Alavez, M., Navarro, L., Palomero-Rivero, M., Drucker-Colín, R. y Prospéro-García, O. *Efectos de Oleamida, un nuevo lípido cerebral, sobre la memoria*. XL Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Morelia, Michoacán, México. Sept 21-25, 1997.

9.2 Prospéro O., Jiménez, A., Murillo, E., Navarro, L., Sánchez, M., Gómez, M., Palomero, M., Schwanke, E y Drucker, R. *Oleamida y Cortistatina en la regulación de la memoria*. XL Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Morelia, Michoacán, México. Sept 21-25, 1997.

9.3 Murillo-Rodríguez E., Navarro L., Sánchez-Alavez M., Martínez-González D., Palomero-Rivero M., Méndez-Díaz M., Drucker-Colín R. y Prospéro-García O. *Potencial papel regulador de la marihuana endógena sobre el ciclo sueño-vigilia*. XLI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. San Luis Potosí, San Luis Potosí. México. Sept 20-24, 1998.

9.4 Palomero-Rivero M., Murillo-Rodríguez E., Navarro L., Martínez-González D., Sánchez-Alavez M., Méndez-Díaz M., Drucker-Colín R. y Prospéro-García O. *Anandamida, la marihuana del cerebro, modula la memoria*. XLI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. San Luis Potosí, San Luis Potosí. México. Sept 20-24, 1998.

9.5 Murillo-Rodríguez E., Sánchez-Alavez M., Méndez-Díaz M., Navarro L., Palomero-Rivero M., Drucker-Colín R. and Prospéro-García O. *Endocannabinoids: Sleep and Memory*. Multi-Site Training Program for Basic Sleep Research. Molecular and Cellular Foundations of Sleep Disorders. 1998 Sleep Training Workshop. Los Angeles/Lake Arrowhead, CA. USA. Oct 2-8, 1998.

9.6 Murillo-Rodríguez E., Giordano M., Sánchez-Alavez M., Navarro L., Palomero-Rivero M., Martínez de la Escalera G., Drucker-Colín R., Henriksen SJ. and Prospéro-García O. *Oleamide, a sleep-inducing lipid, impairs long-term memory, motor behavior and induces analgesia*. Annual Meeting Society for Neuroscience. Los Angeles, CA. USA. Nov 7-12, 1998.

9.7 Aguilar-Vazquez A., Murillo-Rodríguez E., Sánchez-Alavez M., Navarro L., Méndez-Díaz M., Palomero-Rivero M., Martínez-González D., Drucker-Colín R. and Prospéro-García O. *Intracerebral administrations of anandamide facilitates sleep while deteriorates memory*. Annual Meeting Society for Neuroscience. Los Angeles, CA. USA. Nov 7-12, 1998.

9.8 Murillo-Rodríguez E., Navarro L., Méndez-Díaz M., Sánchez-Alavez M., Palomero-Rivero M., Drucker-Colín R. and Prospéro-García O. *Anandamide and Oleamide: Sleep-inducing brain lipids*. 13th Annual Meeting Associated Professional Sleep Societies. Orlando, FLO. USA. Jun 19-24, 1999.

9.9 Murillo-Rodríguez E., Galicia O., Sánchez-Alavez M., Palomero-Rivero M., Navarro L., Millán-Aldaco D., Drucker-Colín R. y Prospéro-García O. *El bloqueo del receptor a NMDA revierte el incremento en el sueño MOR ocasionado por el endocanabinoide anandamida*. XLII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Zacatecas, Zacatecas. México. Sept 26-30, 1999.

9.10 Gómez-Chavarín M., Murillo-Rodríguez E., Navarro L., Drucker-Colín R. y Prospéro-García O. *Anandamida y oleamida inhiben la formación de AMP cíclico en puente e hipocampo*. XLII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Zacatecas, Zacatecas. México. Sept 26-30, 1999.

9.11 Murillo-Rodríguez E., Sánchez-Alavez M., Palomero-Rivero M., Navarro L., Drucker-Colín R. and Prospéro-García O. *Anandamide sleep-inducing effect is prevented by PLC inhibition*. World Federation of Sleep Research Societies. Second International Congress. Dresden, Germany. Oct 5-9, 1999.

- 9.12 Murillo-Rodríguez E., Gómez-Chavarrín M., Sánchez-Alavez M., Palomero-Rivero M., Méndez-Díaz M., Navarro L. and Prospéro-García O. *Anandamide administration into PPT enhances REM sleep in rats*. Annual Meeting Society for Neurosciences. Congress 29th Annual Meeting. Miami Beach, FLO. USA. Oct 23-28, 1999.
- 9.13 Murillo-Rodríguez E., García-Sierra Y., Navarro L. y Prospéro-García O. *Canabinoides y sueño*. III Reunión Nacional de Sueño. México D.F. México Dic. 1-4, 1999.
- 9.14 Murillo-Rodríguez E., García-Sierra Y., Navarro L. and Prospéro-García O. *Oleamide and anandamide modulating sleep via cannabinoid receptor system*. 14th Annual Meeting Associated Professional Sleep Societies. Las Vegas, NV USA. Jun 14-21, 2000.

Reprinted from

BRAIN RESEARCH

Brain Research 812 (1998) 270-274

Short communication

Anandamide modulates sleep and memory in rats

Eric Murillo-Rodríguez ^a, Manuel Sánchez-Alavez ^a, Luz Navarro ^a, Dolores Martínez-González ^a,
Rene Drucker-Colín ^{a,b}, Oscar Prospéro-García ^{a,*}

^a *Grupo de Neurociencias, Departamento de Fisiología, Fac. de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-250, México, D.F. 04510, México*

^b *Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-250, México, D.F. 04510, México*



Short communication

Anandamide modulates sleep and memory in rats

Eric Murillo-Rodríguez ^a, Manuel Sánchez-Alavez ^a, Luz Navarro ^a, Dolores Martínez-González ^a,
Rene Drucker-Colín ^{a,b}, Oscar Prospéro-García ^{a,*}

^a Grupo de Neurociencias, Departamento de Fisiología, Fac. de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-250, México, D.F. 04510, México

^b Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-250, México, D.F. 04510, México

Accepted 8 September 1998

Abstract

In this study we have assessed the effect of the intracerebro-ventricular administration of anandamide (ANA) as well as its precursor metabolite arachidonic acid (AA), on the sleep-wakefulness cycle, memory formation, locomotor activity and pain perception. Our results have indicated that ANA strikingly increases slow-wave sleep (SWS2) and rapid-eye movement (REM) sleep at the expense of wakefulness (W); while deteriorating memory consolidation. ANA also increases locomotor activity but does not modify pain perception threshold. In contrast, AA increases W and reduces SWS2, while deteriorating memory consolidation and increasing locomotor activity. AA has no effect on pain perception. These results suggest that the brain cannabinoid system participates in the modulation of the vigilance states and mnemonic processes. Additionally, they suggest that the effect on pain perception may be a peripheral rather than a central effect. © 1998 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Arachidonic acid; Rapid-eye movement (REM) sleep; Pain; Locomotor activity

Anandamide (arachidonyl ethanolamide, ANA) [8] and *sn*-2 arachidonylglycerol [29] are recently described lipids that bind cannabinoid receptors [11]. Systemic ANA administration mimics the activity of Δ^9 tetrahydrocannabinol (THC), the most active biological component of marijuana [13], by inducing memory impairment [4,19,23] and motor incoordination [13] as well as analgesia [28,31]. At least two cannabinoid receptors have been described: CB1, with a distribution restricted to the central nervous system (CNS) [7,14,21] and CB2, with peripheral distribution [20,25].

Although it has been observed that the inhalation of marijuana, as well as the experimental administration of THC, induces sleep in humans [10,26], the actual effect of ANA on the sleep-wakefulness cycle has not been systematically studied.

Another lipid, oleamide (*cis*-9-10-octadecenoamide) that is obtained from the cerebrospinal fluid of sleep deprived cats [5,18] also possess potential cannabinoid activity. It has been observed that oleamide induces sleepiness in rats when administered systemically [5]. In addition, it has been observed that both lipids interact to produce some biological effects *in vitro* [2,6]. Due to this fact, we believe that anandamide may be capable of inducing sleep via a potential interaction with oleamide [22]. All of these observations postulate the existence of a cannabinoid system that may be participating in sleep regulation.

On the other hand, anandamide seems to have modulating effects on memory [4]. This potential effect is expected, since CB1 receptors are distributed in the hippocampus [14] and because marijuana usage disrupts memory formation [9]. In addition, arachidonic acid, which is an ANA precursor metabolite, seems to share this activity [1,3].

In this study we have attempted to further our understanding of the potential modulating effect of anandamide on the sleep-wakefulness cycle and on mnemonic processes. In order to test this hypothesis we designed the following experiments.

* Corresponding author. Fax: +52-5-623-2241; E-mail: opg@servidor.unam.mx

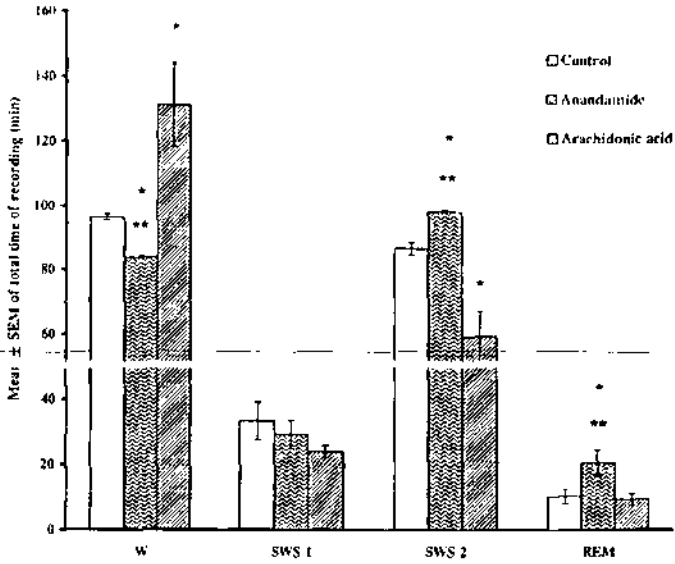


Fig. 1. This figure illustrates the effect of the i.c.v. administration of anandamide and arachidonic acid on the sleep-wakefulness cycle. A reduction in wakefulness, resulting in an increase of both SWS2 and REM is caused by anandamide. The opposite effect is induced by arachidonic acid, which increases wakefulness and decreases SWS2. * $p < 0.05$

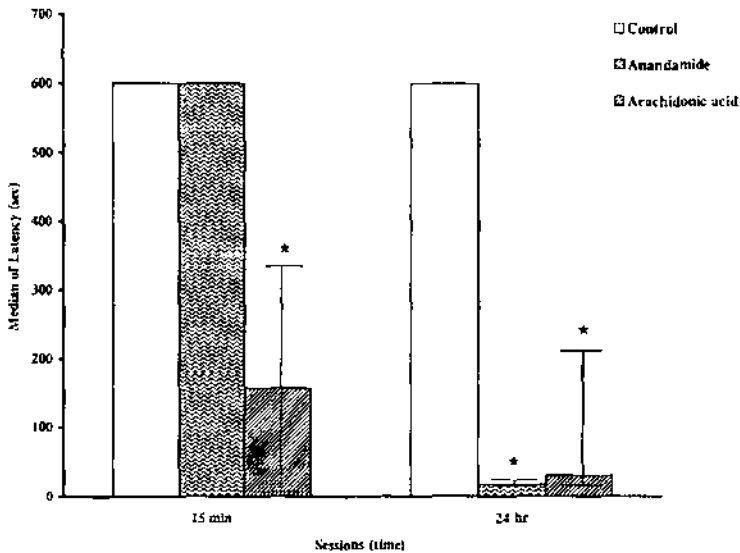


Fig. 2. This figure depicts the deleterious effect of both anandamide and arachidonic acid on memory retrieval. At 15 min, this graph shows the deleterious effect of AA on STM; while ANA has no effect. At 24 h ANA interferes with LTM. Data are expressed as median and interquartile range. * $p < 0.05$.

duced by AA compared to vehicle (control vs. ANA vs. AA, mean \pm S.E.M. (counts/10 min): 2764.75 \pm 520 vs. 1853.5 \pm 734 vs. 5659.4 \pm 997, $p < 0.05$).

Pain perception. ANA or AA induced no changes in pain perception in our animals.

In summary our results show that ANA is capable of modifying the sleep-wakefulness cycle, basically by inducing SWS2 and REM sleep. In contrast, AA induces an increase in W and a decrease in SWS2. In addition, ANA has deleterious effects on long-term memory but not on short term memory. In contrast, AA, the precursor metabolite, alters both short- and long-term memory. ANA increases locomotor activity during the entire period of evaluation (10 min), while AA only caused a moderate increase. In addition, a very interesting finding was the fact that both ANA and AA do not modify the pain perception threshold.

These findings suggest that ANA participates in the regulation of the level of alertness. This is not surprising since metabolites obtained from the Cannabis plant, i.e., THC, cause a similar effect [10]. It is very interesting that this lipid, ANA as well as other lipids derived from AA, such as prostaglandins, i.e., PGD₂ modulate the sleep-wakefulness cycle [12]. Also of interest is the increase on REM sleep induced by ANA, particularly since ANA also deteriorates memory consolidation. This is a contrasting effect, since a memory consolidating function has been attributed to REM sleep [27].

On the other hand, the precursor metabolite AA was able of modifying the sleep-wakefulness cycle by increasing W and decreasing SWS2 during the 4 h following the i.c.v. injection. Due to this fact, we believe that AA possess an effect by itself that is opposite to that induced by its metabolites ANA or PGD₂.

As for memory effects, ANA causes in our animals the previously reported deleterious effect. AA also produces impairment in memory retention. This is a controversial issue since there are a few reports suggesting an AA facilitating effect on memory. However, most of these studies have been performed in chicks [3,15,16]. In addition, there are also studies indicating that AA enhances long-term depression in rat hippocampal slices [1]. Also, the ability of mice to solve a maze was correlated with a reduction of AA [30]. In support of this finding, it has been reported that an increase in brain AA is associated with cognitive impairment, as shown by evaluating rats in the passive avoidance test [24]. Moreover, this increase was associated with tissue damage [24]. A potential role for AA in the cognitive abnormalities associated with Alzheimer's disease has also been claimed [17].

ANA effects on locomotor activity are quite contrasting with the effect on sleep, since we would expect a relaxing rather than an exciting action. However, this may be an acute and transient effect followed by the quiescence necessary for sleep onset as our sleep recordings show. As for memory evaluation, since ANA does not affect short-

term memory but increases locomotor behavior, we believe that this latter effect did not influence this task.

Finally, the fact indicating that the i.c.v. administration of ANA does not modify pain perception threshold suggests that a peripheral rather than a central effect may mediate this action. Although to our knowledge, there is scant information about the role of peripheral cannabinoid receptors (CB2), these CB2 receptors may be participating in regulating behaviors different to those mediated by the central cannabinoid receptor CB1. In this way, CB2 receptors may be preferentially involved in pain regulation.

In conclusion, our study provides for the very first time evidence indicating that anandamide participates in the regulation of the sleep-wakefulness cycle and expands the studies suggesting that endogenous cannabinoids modulate memory. In addition, by administering ANA i.c.v. our results suggest that not all the ANA effects described are mediated by a central action.

Acknowledgements

This work was supported by Grant IN 209797 from DGAPA-UNAM, 25488-N and 25128-N from CONACYT to OPG and LN. The authors wish to thank Ms. Alicia Mondragon for her technical support and Mr. Manuel Zarate for the care of the animals.

References

- [1] V.Y. Bolshakov, S.A. Siegelbaum, Hippocampal long-term depression: arachidonic acid as a potential retrograde messenger, *Neuropharmacology* 34 (1995) 1581–1587.
- [2] D.L. Boring, B.A. Berglund, A.C. Howlett, Cerebrolin, arachidonyl-ethanolamide, and hybrid structures: potential for interaction with brain cannabinoid receptors, *Prostaglandins Leukotrienes Essent. Fatty Acids* 55 (1996) 207–210.
- [3] M.P. Clements, S.P.R. Rose, Time-dependent increase in release of arachidonic acid following passive avoidance training in the day-old chick, *J. Neurochem.* 67 (1996) 1317–1323.
- [4] C. Collin, W.A. Devane, D. Dahl, C.J. Lee, J. Axelrod, D.L. Alkon, Long-term synaptic transformation of hippocampal CA1 γ -aminobutyric acid synapses and the effect of anandamide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 10167–10171.
- [5] B.F. Cravatt, O. Prospéro-García, G. Szudak, N.B. Gilula, S.J. Henriksen, D.L. Boger, R.A. Lerner, Chemical characterization of a family of brain lipids that induce sleep, *Science* 268 (1995) 1506–1509.
- [6] B.F. Cravatt, D.K. Giang, S.P. Mayfield, D.L. Boger, R.A. Lerner, N.B. Gilula, Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty acid amides, *Nature* 384 (1996) 83–87.
- [7] W.A. Devane, F.A. Dysarz, M.R. Johnson, L.S. Melvin, A.C. Howlett, Determination and characterization of cannabinoid receptor in rat brain, *Mol. Pharmacol.* 34 (1988) 605–613.
- [8] W.A. Devane, L. Hanus, A. Breuer, R.G. Perwee, L.A. Stevenson, G. Griffin, D. Gibson, A. Mandelbaum, A. Elinger, R. Mechoulam, Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor, *Science* 258 (1992) 1946–1949.
- [9] J.M. Fletcher, J.B. Page, D.J. Francis, K. Copeland, M.J. Naus, C.M. Davis, R. Morris, D. Krausskopf, P. Salt, Cognitive correlates

- of long-term cannabis use in Costa Rican men, *Arch. Gen. Psychiatry* 53 (1996) 1051-1057.
- [10] F.R. Freeman, The effect of δ -9-tetrahydrocannabinol on sleep, *Psychopharmacology* 35 (1974) 39-44.
- [11] R. Frída, R. Mechoulam, Pharmacological activity of the cannabinoid receptor agonist, anandamide, a brain constituent, *Eur. J. Pharmacol.* 231 (1993) 313-314.
- [12] O. Hayaishi, Molecular mechanisms of sleep-wake regulation: roles of prostaglandins D2 and E2, *FASEB J.* 5 (1991) 2575-2581.
- [13] L.E. Hollister, Health aspects of cannabis, *Pharmacol. Rev.* 38 (1986) 1-20.
- [14] A.C. Howlett, Pharmacology of cannabinoid receptors, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35 (1995) 607-634.
- [15] C. Holscher, Inhibitors of cyclooxygenases produce amnesia for passive avoidance task in the chick, *Eur. J. Neurosci.* 7 (1995) 1360-1365.
- [16] C. Holscher, S.P.R. Rose, Inhibitors of phospholipase A2 produce amnesia in the chick, *Behav. Neurosci. Biol.* 61 (1994) 225-232.
- [17] H. Katsuki, S. Okuda, Arachidonic acid as neurotoxic and neurotrophic substance, *Prog. Neurobiol.* 46 (1995) 607-636.
- [18] K.A. Lerner, G. Sluzdak, O. Prospéro-García, S.J. Henriksen, D.L. Boger, B.F. Cravatt, Cerobrodienol: a brain lipid isolated from sleep-deprived cats, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 9505-9508.
- [19] A.H. Liebman, K.R. Dimen, B.K. Martin, Systemic or intrahippocampal cannabinoid administration impairs spatial memory in rats, *Psychopharmacology* 119 (1995) 289-290.
- [20] I.A. Matsuda, T.J. Bonner, S.J. Lolait, Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain, *J. Comp. Neurol.* 327 (1993) 535-550.
- [21] I.A. Matsuda, S.J. Lolait, M.J. Brownstein, A.C. Young, T.J. Bonner, Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA, *Nature* 346 (1990) 561-564.
- [22] R. Mechoulam, E. Frída, L. Hanus, T. Shekin, T. Bisogno, V. Di Marzo, M. Bayewitch, Z. Vogel, Anandamide may mediate sleep induction, *Nature* 389 (1997) 25-26.
- [23] E. Molina-Holgado, M.I. González, M.C. Loret, Effect of δ -9-tetrahydrocannabinol on short-term memory in the rat, *Physiol. Behav.* 57 (1995) 172-179.
- [24] J. Mesić, G. Zupan, V. Eraković, A. Simonić, J. Varljen, The influence of nimodipine and MK-801 on the brain free arachidonic acid level and the learning ability in hypoxia exposed rats, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 21 (1997) 345-358.
- [25] S. Munro, K.L. Thomas, M. Abu-Shaar, Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids, *Nature* 365 (1993) 61-65.
- [26] O. Ray, C. Ksir, *Drugs, Society, and Human Behavior*, 7th edn., Chaps. 16 and 17, Mosby, Boston, 1996.
- [27] C. Smith, L. Lapp, Increase in number of REMS and REM density in humans following an intensive learning period, *Sleep* 14 (1991) 325-330.
- [28] P.B. Smith, B.R. Martin, Spinal mechanism of δ -9-tetrahydrocannabinol-induced analgesia, *Brain Res.* 578 (1992) 8-12.
- [29] N. Stella, P. Schweitzer, D. Piomelli, A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation, *Nature* 388 (1997) 773-777.
- [30] H. Suzuki, S.J. Park, M. Tamura, S. Ando, Effects of the long-term feeding of dietary lipids on the learning ability, fatty acid composition of brain stem phospholipids and synaptic membrane fluidity in adult mice: a comparison of sardine oil diet with palm oil diet, *Mech. Ageing Dev.* 101 (1998) 119-128.
- [31] S.P. Welch, L.D. Dumlouf, G.S. Patrick, R.K. Razdan, Characterization of anandamide- and fluoranandamide-induced antinociception and cross-tolerance to δ -9-THC after intrathecal administration to mice: blockade of δ -9-THC-induced antinociception, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 273 (1995) 1235-1244.