

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

EL EFECTO DE LOS ENDOCANABINOIDES
ANANDAMIDA Y OLEAMIDA SOBRE EL CICLO
SUEÑO-VIGILIA EN RATAS HEMBRA.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I Ó L O G A
P R E S E N T A:
SINTHIA LIZBETH SÁNCHEZ SERRANO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. OSCAR PROSPÉRO GARCÍA



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

México D. F.

2008



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.

Esta tesis se desarrolló en el laboratorio de Neurociencias, a cargo del Dr. Oscar Próspero García, en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, con el apoyo económico de DGAPA-UNAM IN224306 y de CONACYT 42060.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Dr. Oscar Próspero García por su guía en la concepción, desarrollo y evaluación del proyecto.

A mis sinodales, el Dr. Manuel Miranda Anaya, la Dra. Mónica Méndez Díaz, el M. en C. Alfonso Vilchis Peluyera y la M. en I.B.B. Alette Ortega Gómez por sus correcciones y comentarios sobre estas tesis.

A mis padres Carmen Serrano Tovar y Jorge Manuel Sánchez Neri, primero por la vida, después por sus enseñanzas, su guía, su apoyo y el infinito amor que me profesan. Los amo.

A ti madre, que tanto admiro, posees tantas cualidades que verdaderamente eres mi ejemplo a seguir, siempre tan independiente y sagaz, mirando de frente y buscando ir siempre avante.

A mis hermanos Jorge, Marco y Erick por hacerme reír y no permitir que la amargura se apodere de mí, por siempre hacerme sentir querida y muy protegida.

A mis abuelas Ana María Neri y Hermenegilda Vicenteño por creer en mí y a pesar que ahora no están conmigo, les agradezco cada uno de los días de mi vida que compartí con ustedes, fueron y son la luz de mi sendero.

A toda mi familia, en especial a mis tías Micaela y Leticia y a mis primas Viridiana y Rubí.

A Erika Vázquez por creer en mi, por apoyarme en las vicisitudes, por alentarme a lograrlo, por sus horas de dedicación y sus oídos siempre pacientes, también gracias por Emilio.

A Edith Barriga, gracias por tu amistad y tu infinito cariño que desde hace lustros hacen que siga persiguiendo el ideal en mi vida y que siga creyendo en la virtud, también gracias por Merlina que con su curiosidad y avidez por el conocimiento me llena de motivación y entusiasmo.

A Paulina, Martha y Margarita por compartir tanta curiosidad por la vida, por compartir sus ideales y sus miedos con tanta devoción desde la pubertad.

A mis entrañables amigos de la adolescencia Rafael Cabrera y Roberto García, gracias por ser tan honestos conmigo y mostrarme su apoyo en los momentos más difíciles.

Luis Marcial Gómez como llegar hasta aquí sin nuestras largas pláticas plagadas de dudas existenciales y de la eterna búsqueda de “la respuesta”.

A Alejandro Gómez a pesar de que nos conocemos desde hace poco tiempo haz llenado mi existencia de alegría.

A Olga Flores por su apoyo, tanto en el escrito de esta tesis como en mi vida, es una alegría haberte encontrado en el camino, gracias por mostrarme que aún existen personas virtuosas.

A Khalil Guzmán por enseñarme como un excelente sensei no sólo los conocimientos técnicos, sino por darme lecciones de vida. Gracias por tu apoyo incondicional.

A Andrea Herrera por tantas horas de reflexión y aprendizaje acerca de la vida, por tu apoyo en el laboratorio y por guiarme tan agradablemente en el camino de la vida.

A Edgar Soria por ayudarme a mejorar mi excelente inglés, por sus bromas y por su apoyo en los seminarios.

A todos mis compañeros de laboratorio porque aprendí mucho de ustedes, Mónica, Dulce, Olivia, Gaby, Xatziri, Linda, Dra. Luz Navarro, Dra. Marina, Rubén, Marinita, Diego y Vicky. Especialmente a Eunice Domínguez, a Corinne Montes y a Pavel Rueda.

A mis compañeros de la Facultad por compartir todo el trabajo académico y también la merecida relajación, gracias Rocío, Itzel, Ana, Agustina, Lilibeth, Luis y a toda la generación.

A mis profesores de la carrera en especial al maestro Rubén Hurtado por enseñarme miles de veces a resolver las mismas ecuaciones, a no darme por vencida y a perseguir el triunfo.

¡Gracias a la vida! Que me ha dado tanto.

ÍNDICE TEMÁTICO

Resumen	9
1. MARCO TEÓRICO	11
1.1. El ciclo sueño-vigilia.	11
1.1.1 Definición del ciclo sueño-vigilia.....	11
1.1.2 Desde el punto de vista electrofisiológico el sueño está organizado en fases de Movimientos Oculares Rápidos (MOR) y en Ondas Lentas (SOL).....	21
1.1.3 Neuroanatomía del sueño.....	25
1.1.4 Vigilia.....	25
1.1.5 Sueño de Ondas Lentas (SOL).....	30
1.1.6 Sueño de Movimientos Oculares Rápidos (MOR).....	35
1.1.7 Moléculas promotoras del sueño y la vigilia. Antecedentes.....	40
1.2. Sistema Canabinérgico.	45
1. 2. 1 Canabinoides.	45
1. 2. 2 Canabinoides Endógenos.....	47
1. 2. 2.1 Anandamida.....	48
1. 2. 2. 2 Oleamida.....	50
1. 2. 3 Difusión e inactivación de los endocannabinoides.....	51
1. 2. 4 Hidrólisis.....	52
1. 2. 5 Inhibidores.....	54
1. 2. 6 Receptores a los cannabinoides, CB ₁ y CB ₂	56
1. 2. 6. 1 Distribución de los receptores a cannabinoides.....	59
1. 2. 7 Los cannabinoides: inductores de sueño. Una aproximación práctica, la función del sistema canabinérgico en el sueño.....	62
1. 3. Las hembras, sus ciclo estral y sus variaciones hormonales	65

1. 3. 1. Las ratas hembra poseen un ciclo estral.....	65
1. 3. 2 El estrógeno ejerce sus efectos a través del Receptor a estrógenos.....	68
1. 3. 3 Interacciones entre los sistemas de neurotransmisión y las variaciones hormonales.....	71
1. 3. 4 El sueño está afectado por el sistema canabinérgico y su interacción con las hormonas.....	72
2. PLANTEAMIENTO Y DESARROLLO DEL PROBLEMA.....	76
2.1 Planteamiento del problema	76
2.2 Hipótesis y objetivos.....	77
3. MÉTODO.....	78
3. 1 Sujetos.....	78
3. 2 Cirugía.....	79
3. 3 Fármacos.....	80
3. 4 Registros electroencefalográficos.....	81
3. 5 Toma de muestra para determinar la fase del ciclo estral.....	82
3. 6 Procedimiento.....	82
3. 7 Análisis estadístico.....	85
4. RESULTADOS.....	86
5. DISCUSIÓN Y CONCLUSION.....	97
5. 1. DISCUSIÓN	97
5. 2. CONCLUSIÓN.....	104
6. LECTURAS CITADAS.....	105

Tabla de abreviaturas

2-AG	2-Araquidonilglicerol
AMPc	Monofosfato de Adenosina cíclica
AMT	Transportador de membrana de Anandamida
ANA	Anandamida (Araquidonil-etanolamida)
ARAS	Sistema Reticular de Activación Ascendente
ARN	Ácido Ribonucleico
CBA	Cerebro Basal Anterior
CB₁	Receptor a cannabinoides 1
CB₂	Receptor a cannabinoides 2
CCK-8	Colecistocinina 8
EEG	Electroencefalograma
EMG	Electromiograma
EOG	Electroculograma
ER α	Receptor a estrógenos α
ER β	Receptor a estrógenos β
EPSPs	Potenciales Postsinápticos Excitadores
FAAH	Hidrolasa de los ácidos grasos amidados
FR	Formación Reticular
FSH	Hormona Folículo Estimulante
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GH	Hormona del Crecimiento
GH-RH	Factor Liberador de la Hormona del Crecimiento
GnRH	Hormona liberadora de Gonadotropinas
HA	Hipotálamo Anterior
HL	Hipotálamo Lateral
HP	Hipotálamo Posterior
IPSPs	Potenciales Postsinápticos Inhibidores
LC	<i>Locus Coeruleus</i>
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
LDT	núcleo Latero Dorsal Tegmental
LH	Hormona Luteinizante
LPT	Núcleo Latero Pontino Tegmental
MAGL	Monoacilglicerol Lipasa
MCH	Hormona concentradora de Melanina
NAPE	N-Araquidonil-Fosfatiletanolamina
NAT	N-Acetiltransferasa
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
nMOR	sueño de no Movimientos Oculares Rápidos
NTM	núcleo Tuberomamilar
OLE	Oleamida
PB	Núcleos Parabraquiales
PC	Área pre <i>Coeruleus</i>
PGOs	Espigas ponto-genículo-occipitales
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
POA- APO	Área Preóptica
PPT	Núcleo Pedúnculo Pontino Tegmental
RD	Rafe Dorsal

SLD Núcleo Sublaterodorsal del *Locus Coeruleus*
sMOR sueño de Movimientos Oculares Rápidos
SNC Sistema Nervioso Central
SOL Sueño de Ondas Lentas
SOL I Sueño de Ondas Lentas uno
SOL II Sueño de Ondas Lentas dos
SP Sueño Paradójico
THC Δ^9 Tetrahidrocanabinol
VIP Péptido Vasoactivo Intestinal
vIPAG Sustancia gris periacueductual
VLPO Núcleo preóptico ventrolateral

RESUMEN

La Anandamida, la Oleamida y el receptor a cannabinoides 1 (CB₁) forman parte del sistema canabinérgico. En trabajos realizados por nuestro laboratorio y por otros investigadores se ha mostrado que en ratas macho, el sistema canabinérgico participa en la regulación del ciclo sueño-vigilia, a través de la administración central de los endocannabinoides Anandamida y Oleamida ambos incrementando el Sueño de Ondas Lentas y sólo Anandamida aumenta el sueño de Movimientos Oculares Rápidos, atribuyéndoles una función en la regulación del sueño.

Por otra parte, la arquitectura del ciclo sueño-vigilia se modifica a lo largo del ciclo estral y la afinidad por el CB₁ es sensible a las variaciones en los niveles de hormonas sexuales a lo largo del ciclo estral de la rata. Sin embargo, no se ha demostrado que las variaciones de las hormonas sexuales afecten la función endocannabinérgica y al mismo tiempo la expresión del ciclo sueño-vigilia. En este estudio se caracterizó la expresión del ciclo-sueño-vigilia de la rata wistar en las cuatro fases del ciclo estral y cómo ésta expresión se ve afectada por la administración de los endocannabinoides Anandamida y Oleamida. Observamos una expresión del ciclo sueño-vigilia semejante al reportado en la literatura para las fases de proestro y estro del ciclo estral. La administración de Anandamida revierte la disminución de Sueño de Ondas Lentas y del sueño de Movimientos Oculares Rápidos que de manera natural ocurren en el proestro. Adicionalmente observamos que en el estro Anandamida ejerce el efecto opuesto al inducido durante el proestro. Por otra

parte, Oleamida, incrementa el Sueño de Ondas Lentas sólo las primeras cuatro horas del registro y disminuyéndolo las últimas cuatro horas en la fase del proestro. Además posee un efecto contrario a Anandamida, la Oleamida aumenta el Sueño de Ondas Lentas durante el estro.

Por lo tanto, la interacción entre los componentes del sistema canabinérgico con las variaciones en los niveles de hormonas sexuales, varían con el ciclo estral de la rata, induciendo así efectos distintos sobre el ciclo sueño-vigilia, para cada fase del ciclo estral.

1.1. EL CICLO SUEÑO-VIGILIA.

1. 1. 1Definición del ciclo sueño-vigilia.

Recurriendo a la simplicidad se puede decir que estar despierto o en vigilia es lo opuesto a estar dormido. Los estados de vigilia y sueño se describen frecuentemente uno en términos de otro. Por ejemplo, se describe al sueño como una interrupción sucesiva de la vigilia o que el sueño y la vigilia son estados conductuales alternados, distintos y que son mutuamente excluyentes, pero están interrelacionados (Miller D. B. y O'Callaghan J. P. 2006).

Asimismo, durante la vigilia, se procesan las entradas sensoriales como la visión y el gusto, se dirige la atención y se accede a los recuerdos almacenados en la memoria para ejecutar distintas tareas, se mantiene la postura, se sostiene la actividad motora y la actividad del cerebro anterior. También, es posible monitorear el ambiente, mantenerse alerta y actuar según la información entrante lo demande; dicho monitoreo no es posible durante el sueño (Miller D. B. y O'Callaghan J. P. 2006). Por otra parte, la necesidad de dormir aumenta con la cantidad de tiempo que un sujeto permanece despierto (Hobson J. A. 2005).

Entonces, surge la pregunta, ¿Qué hacemos cuando estamos dormidos, qué es el sueño? El sueño es un fenómeno biológico del cual se puede inferir su importancia al considerar que invertimos un tercio de nuestras vidas en este estado conductual (Fuller P. M. *et al.* 2006). Además, es un fenómeno que ha

perdurado a lo largo de la evolución de los mamíferos (Siegel J. M. 2005). Por ejemplo, se sabe que el sueño no sólo se expresa en los humanos, sino en todo el reino animal con características particulares para cada especie. Así, el tiempo que los animales pasan durmiendo varía entre mamíferos. Podemos mencionar el caso de algunos de ellos, como los murciélagos y las zarigüeyas que duermen de dieciocho a veinte horas diarias. Otros como el elefante y la jirafa duermen mucho menos; es decir, de tres a cuatro horas diarias. Los primates considerados como un grupo, no tienen patrones de sueño distintos a los órdenes *Rodentia*, *Insectivora* o de otros órdenes de mamíferos terrestres (Siegel J. M. 2005). Igualmente, la importancia que el sueño posee, se refuerza por el notable rebote de sueño, esto es un aumento en la cantidad de tiempo que un sujeto pasa dormido, tras la privación total del mismo (ver Montes-Rodríguez C. J. *et al.* 2006). Así como las alteraciones funcionales que se experimentan a consecuencia de la falta de sueño. Un ejemplo claro ocurre con la privación de sueño en ratas. Cuando éstas se privan de sueño total por un periodo de tres semanas y algunas basta con dos semanas, todas mueren (Rechtschaffen A. *et al.* 1983).

Los avances en el estudio del sueño se han logrado a través del planteamiento de tres preguntas fundamentales. ¿Qué es el sueño? ¿Cuáles son los mecanismos que producen este estado? y ¿Cuáles son sus funciones?

Para definir al sueño desde el enfoque conductual existen cuatro criterios: disminución de la actividad motora, disminución de la respuesta a la

estimulación, posturas estereotipadas y una reversibilidad relativamente fácil (comparada con la del coma y la anestesia) (Fuller P. M. *et al.* 2006).

Como lo cita Hobson en su revisión, durante varias décadas y por más de un siglo, la explicación tradicional del sueño fue que este fenómeno es el resultado de una reducción o ausencia de la actividad cerebral inducida por la fatiga. La experiencia subjetiva de la pérdida de la conciencia y la falta de recuerdos de la actividad cerebral durante el sueño reafirmaron esta conclusión (Hobson J. A 2005). Sin embargo, esta idea fue rebatida a partir de estudios realizados en los años treinta por el neurólogo vienés Constantino Von Economo, quien fue el primero en determinar algunas estructuras cerebrales que regulan el sueño; es decir, en describir un sustrato anatómico del sueño. Von Economo observó que las lesiones en el hipotálamo anterior, área preóptica (POA, por sus siglas en inglés), un grupo celular del hipotálamo y cerebro basal anterior (CBA) (ver figura 1.1), que ocurrieron en pacientes a consecuencia de la encefalitis letárgica, una epidemia causada por una infección viral en el cerebro, les inducía insomnio (pérdida de sueño) y que las lesiones en el hipotálamo posterior (ver figura 1.2) producían un estado profundo y prolongado de somnolencia, denominado hipersomnia (citado por Siegel J. 2004).

Sus observaciones atrajeron la inquietud de los investigadores para indagar más extensa y profundamente este fenómeno. De esta manera, en 1939 S. W. Ranson describió que las lesiones realizadas en el hipotálamo posterior de monos inducían hipersomnia y las lesiones efectuadas en el CBA (ver figura 1.1

y 1.2), fueron incapaces de provocar insomnio (Citado por Drucker-Colín R. y Prospéro-García O.1990).

Posteriormente, J. H. Nauta reconsideró las observaciones generadas por Von Economo y realizó experimentos en ratas. A partir de estos experimentos reportó que las lesiones hechas en el hipotálamo anterior inducían insomnio, mientras que las lesiones en la unión mesencéfalo-hipotálamo; es decir, en el hipotálamo posterior mostradas en la figura 1.2, promovían la hipersomnía. Además, realizó descripciones histológicas muy completas de la pérdida anatómica inducida por las lesiones descritas anteriormente y sus resultados apoyaron fuertemente la idea de que estas áreas están involucradas en la modulación del ciclo sueño-vigilia. No obstante, Nauta observó que la lesión combinada de ambas regiones hipotalámicas en el mismo animal no producía o inducía cambios pequeños en el ciclo sueño-vigilia. Basado en los efectos anteriores, Nauta sugirió que el *centro* de la vigilia localizado en el hipotálamo posterior, inhibe activamente el *centro* del sueño en el hipotálamo anterior. De los trabajos efectuados tanto por Ranson como por Nauta se derivó la noción del que el cerebro tenía dos sistemas separados, uno que controla el sueño y otro sistema que controla la vigilia. (Citado por Drucker-Colín R. y Prospéro-García O.1990).

Los anteriores estudios realizados por Von Economo, Ranson y Nauta fueron las primeras exploraciones que determinaron que la promoción y la inhibición del sueño involucran distintas regiones cerebrales.

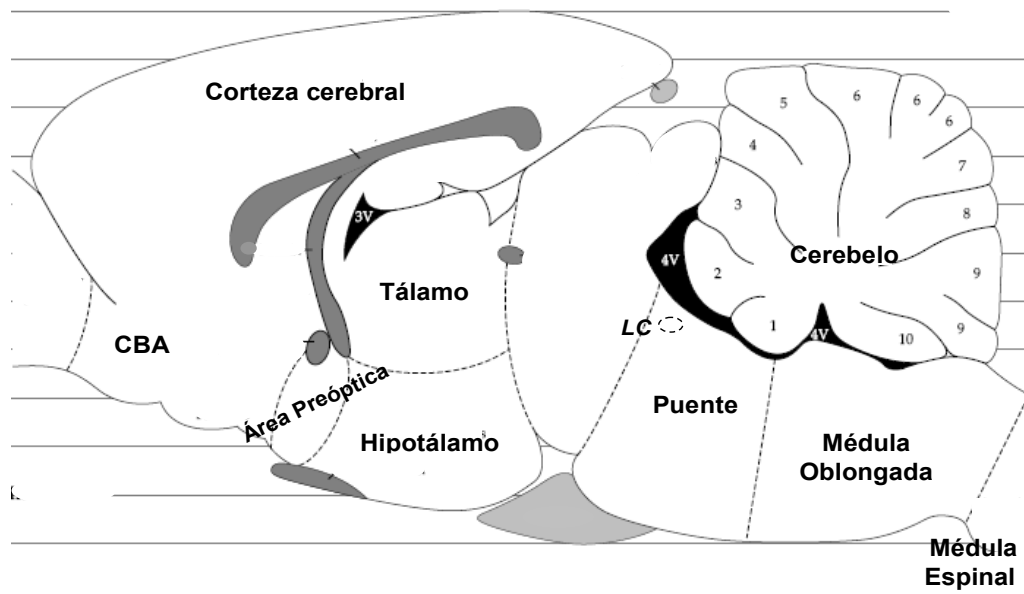


Figura 1. 1. Vista sagital de cerebro de rata. Se muestra la localización del *Locus Coeruleus* (LC), Hipotálamo, Área preóptica, Tálamo, Mesencéfalo, Puente, Cerebro Basal Anterior (CBA), Médula Oblongada. El cerebelo y la corteza se muestran como referencias.

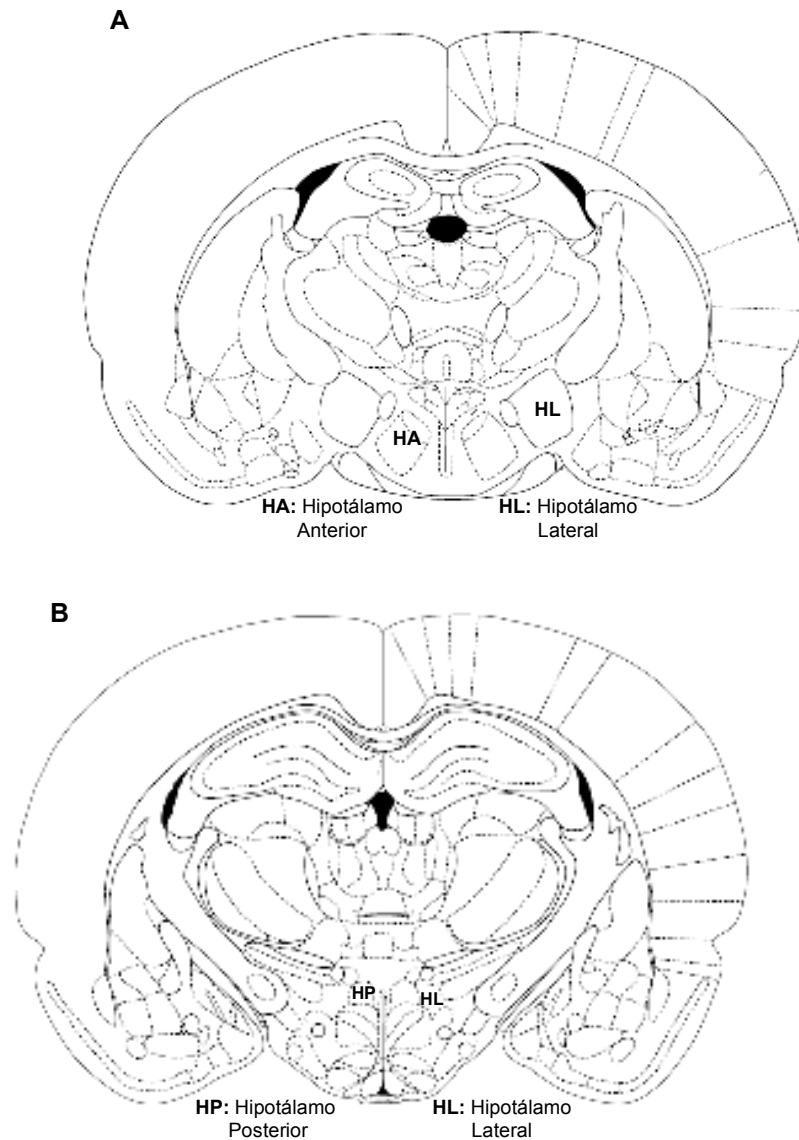


Figura 1. 2. Vista coronal del cerebro de rata. En el panel **A** se muestra la localización del hipotálamo anterior (HA) que está involucrados en la promoción del sueño y del hipotálamo lateral (HL). En el panel **B** se puede observar la localización del hipotálamo posterior (HP) y del hipotálamo lateral (HL) involucrados en la promoción de la vigilia.

Sin embargo, esta no ha sido la única aproximación en las primeras investigaciones del ciclo sueño-vigilia. Una herramienta importante para su estudio científico ha sido el electroencefalograma (EEG). Este instrumento registra la actividad eléctrica del cerebro y provee una medida objetiva y cuantificable del estado del cerebro y del estado de conciencia.

Se ha acreditado al Psiquiatra alemán Hans Berger como el primero en desarrollar un instrumento que registrara la actividad eléctrica generada por el cerebro humano. En 1925, Berger obtuvo el primer registro electroencefalográfico de su hijo. Su trabajo mostró que mediante el EEG se puede diferenciar al sueño de la vigilia (citado por Siegel J. 2004).

Utilizando como herramienta el EEG, en la década de los treinta el neurofisiólogo belga Frederic Bremer sugirió que el sueño era un estado pasivo, debido a que este ocurría a consecuencia de una reducción de la entrada de la estimulación ambiental. Esta aseveración fue el resultado de observaciones que realizó en gatos. Primero desarrolló dos preparaciones: la primera fue denominada "*cerebro aislado*" y consistió en mantener a un gato con su cerebro, en el que realizó un corte en el surco intercolicular (mesencéfalo) como se muestra en la figura 1.3. En la segunda preparación hizo un corte en la unión médula oblongada - médula espinal y la nombró "*encéfalo aislado*" (ver figura 1.3) mientras registraba la actividad cerebral de estos gatos. Cuando Bremer observó el EEG de los gatos con "*cerebro aislado*" éste reflejó que la actividad de los animales era la que correspondía a un estado de sueño. Con esta interpretación, supuso que este permanecer "dormidos" durante todo el registro era resultado de la desaferentación (eliminación de las aferencias sensoriales) que les ocurría a los gatos con "*cerebro aislado*". Es decir, la falta de estimulación sensorial reduce la actividad de la corteza cerebral, por lo tanto, él infirió que disminuye la vigilia y se instala el sueño (citado por Drucker-Colín R. y Próspero-García O.1990).

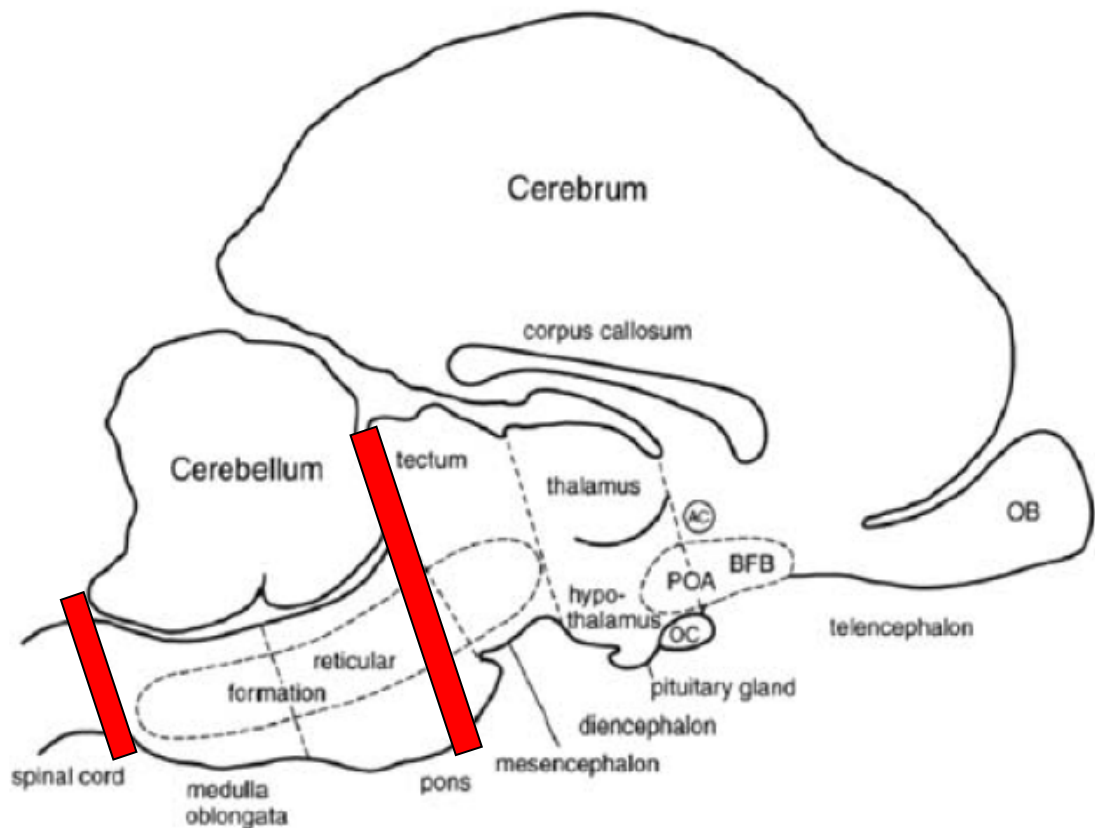


Figura 1. 3. Dibujo esquemático del cerebro de gato. Basado en una sección sagital que muestra la localización de la formación reticular, de la médula oblongada, del tálamo, del hipotálamo, mesencéfalo, puente diencefalo, glándula pituitaria, telencéfalo, cuerpo calloso, cerebelo, bulbo olfatorio (OB), quiasma óptico (OC), área preóptica (POA), *Locus Coeruleus* (LC) y del cerebro basal anterior (BFB). Sobrepuestas se encuentran líneas que describen los cortes realizados por Bremer. Tomado de Siegel J. 2004

En 1944, W R Hess informó que la estimulación de alto voltaje y baja frecuencia de los núcleos intralaminares del tálamo induce sueño en gatos. Posteriormente, Maurice Monnier realizó experimentos que mostraron que la estimulación eléctrica de los mismos núcleos del tálamo también producía sueño. De esta manera se mostró que el tálamo estaba involucrado en la regulación del ciclo sueño-vigilia y que este podía inducir sueño al estimularlo eléctricamente (citado por Drucker-Colín R. y Prospéro-García O.1990).

En la década de los cuarenta Giuseppe Moruzzi y Horace Magoun realizaron un experimento que consistió en registrar la actividad eléctrica cerebral de gatos con la ayuda del EEG. Cuando el registro mostraba la actividad eléctrica característica de un sujeto dormido, estimularon eléctricamente la formación reticular (FR) mesencefálica. Con esta estimulación, se produjo un cambio rápido en el EEG, el cual registró la misma clase de ondas que se registran cuando el sujeto está despierto. A este fenómeno se le conoce como “Despertar Electroencefalográfico” con el cual se mostró que la FR está involucrada en la promoción de la vigilia. Tiempo después los estudios realizados por Lindsley y colaboradores mostraron que la destrucción del área estimulada por Moruzzi y Magoun en animales provoca un estado conductual y un EEG que son característicos de sujetos dormidos (citado por Siegel J. 2004).

Estos hallazgos se convirtieron en la confirmación experimental de las observaciones clínicas de Von Economo en el que el daño de la FR en los pacientes con encefalitis letárgica elimina la vigilia.

En 1953, el doctor Nathaniel Kleitman y su estudiante Eugene Aserinsky mostraron que durante el sueño, el EEG puede ser diferenciado en al menos dos categorías. Encontraron que un tipo de sueño está acompañado por episodios de Movimientos Oculares Rápidos, atonía muscular y está asociado a la ocurrencia de ensoñaciones, a este tipo de sueño lo nombraron sueño (MOR). También es llamado sueño paradójico (SP) porque durante su ocurrencia la actividad electroencefalográfica es de bajo voltaje y alta frecuencia, que es una

actividad relacionada con la vigilia. La otra fase de sueño en la que no se presentan ensoñaciones, ni Movimientos Oculares Rápidos se denominó sueño no MOR (nMOR). Durante el sueño nMOR la actividad eléctrica cerebral se sincroniza progresivamente, las ondas registradas se hacen más lentas y de mayor amplitud, por lo que también se le ha nombrado sueño de ondas lentas (SOL); nombre que utilizaremos a lo largo de esta tesis. Estas dos fases se alternan cíclicamente siguiendo un patrón que se ha demostrado está altamente estructurado (Siegel J. 2004).

En la década de los sesenta, M. B. Sterman y C. D. Clemente probaron que la estimulación eléctrica tanto de alta como de baja frecuencia, en el CBA de gatos mantenidos en una preparación llamada “pontino”, producía sueño (citado por Drucker-Colín R. y Prospéro-García O. 1990).

Adicionalmente, el neurobiólogo francés Michel Jouvet aportó nuevos datos que apoyaban la implicación de otras estructuras en la modulación del sueño. Jouvet describió que los “gatos pontinos”, presentaban periodos cíclicos de atonia muscular y descargas de espigas PGOs (espigas ponto-geniculo-occipitales), lo cual sugirió la importancia del puente en la generación del SP.

Hasta aquí se ha mostrado que con la ayuda del EEG se puede diferenciar al sueño de la vigilia. Que la estimulación eléctrica del tálamo y el CBA promueven el sueño y que la estimulación eléctrica de la FR inhibe el sueño, promoviendo la vigilia.

1. 1. 2 Desde el punto de vista electrofisiológico el sueño está organizado en fases de Ondas Lentas (SOL) y de Movimientos Oculares rápidos (MOR).

Como se mencionó anteriormente, existen cuatro criterios conductuales para definir al sueño. Además, desde el punto de vista electrofisiológico se puede monitorear la actividad eléctrica cerebral durante el sueño con la ayuda de un polígrafo y un juego de electrodos colocados, en el caso de roedores, en el cráneo, en el canto externo de los ojos y músculos de la nuca. La actividad eléctrica muscular es llamada electromiograma (EMG), el registro de movimientos de los ojos electroculograma, (EOG) y la actividad colectiva de las neuronas de la corteza cerebral electroencefalograma (EEG) (Siegel J. 2004).

La evidencia recabada a partir del siglo anterior demuestra que las fuentes generadoras de la actividad registrada por el EEG residen en la corteza cerebral. La actividad eléctrica registrada es el resultado del flujo de corriente extracelular; es decir, la suma de los potenciales postsinápticos excitadores (EPSPs) y los potenciales postsinápticos inhibidores (IPSPs). Y ya que las neuronas piramidales son las principales neuronas de proyección en la corteza y sus dendritas apicales, están orientadas perpendicularmente a la superficie de la corteza cerebral y reciben diversas aferencias sinápticas, se dice que la actividad sináptica de las células piramidales es la principal fuente de actividad que registra el EEG. Es por ello que el EEG representa la actividad promedio de un gran número de agregados neuronales (Pedley T. A. y Traub R. D. 1990).

En la vigilia particularmente, el EEG registrado en la corteza cerebral contiene ondas de alta frecuencia y baja amplitud como se puede apreciar en la figura 1.4, que oscila en el rango de las ondas de la banda beta (β) que tienen un ancho de banda de 13.5 a 20 Hertz (Hz), dichas ondas no se encuentran sincronizadas. Un ejemplo de estas ondas son las beta (β), las cuales según parece, evidencian las diferencias en la sincronización del disparo de las neuronas encargadas del procesamiento cognitivo, motor y de las funciones perceptivas. Con la aparición del SOL, el EEG muestra ondas que aumentan su amplitud (reflejando un aumento en el disparo sincrónico cortical), y una disminución en la frecuencia (Fuller P.M. *et al.* 2006). En roedores, el SOL se subdivide en dos fases; el sueño de ondas lentas uno (SOL I) durante el cual la vigilia desaparece gradualmente y adicionalmente las ondas del EEG se lentifican, con oscilaciones en las que predomina el rango de las ondas theta (θ) que va de 4 a 7 Hz como se observa en la figura 1.4. El sueño de ondas lentas dos (SOL II) está caracterizado por la pérdida completa de la interacción con el medio, así como por la aparición de las ondas delta (δ) en el EEG, en un rango de 1 a 3 Hz (ver figura 1.4). La división de estas dos etapas del SOL esta definida por un aumento en la potencia total, amplitud e incidencia de las ondas (δ) en el EEG que se ve reflejado en un aumento progresivo en la profundidad de sueño del sujeto. La manifestación de las oscilaciones de las ondas (δ) registradas en el EEG refleja la sincronización de la actividad del circuito tálamo cortical (Steriade M. y Timofeev I. 2003). Durante el sueño MOR, el cual cicla periódicamente con el SOL, las transiciones corticales del EEG hacia la actividad de alta frecuencia y baja amplitud se parece al patrón no sincronizado de la

vigilia. Sin embargo, a diferencia de la vigilia, en el EOG aparecen movimientos oculares rápidos, movimientos característicos de esta etapa y el EMG evidencia una marcada atonia (pérdida del tono de los músculos esqueléticos, sólo los músculos extraoculares y los músculos respiratorios permanecen activos). En los roedores, la actividad (θ), que oscila entre los 4 y los 8 Hz, es producida por el hipocampo. Dicha actividad es un marcador electrofisiológico importante tanto para el sueño MOR como para otras conductas específicas en la vigilia, tal como la exploración (Fuller P.M. *et al.* 2007). Las oscilaciones θ se generan por las aferencias colinérgicas y GABAérgicas de las neuronas marcapaso del septum medial y de la extremidad vertical de la banda diagonal, las cuales reciben y transforman la entrada ascendente tónica proveniente del tallo cerebral (Kocsis B. y Kaminsky M. 2006).

Gracias a que ahora se sabe con exactitud el tipo de ondas que caracterizan a cada estado conductual, con la ayuda del registro poligráfico, es posible saber el tiempo que un sujeto transita por cada estado conductual, llamémosle vigilia, SOL y sueño MOR.

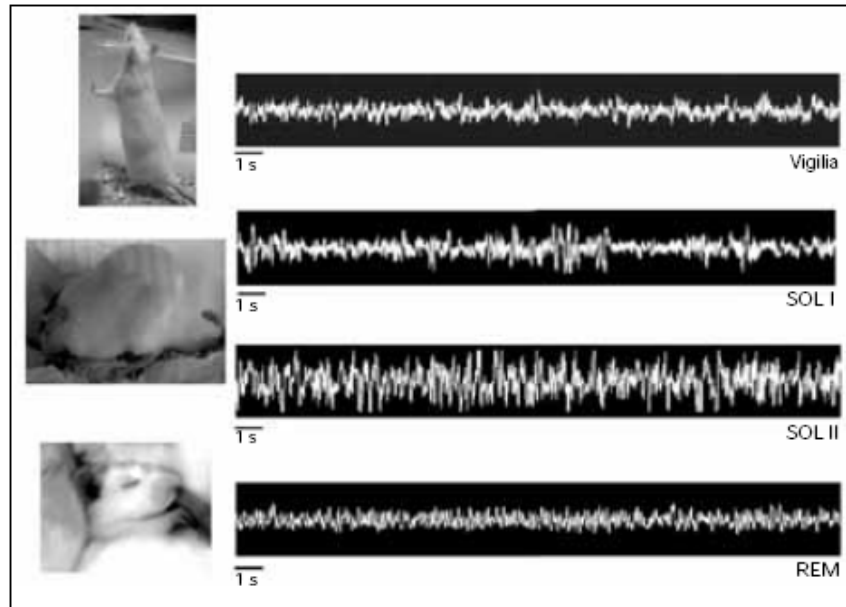


Figura 1. 4. Registro de la actividad eléctrica cerebral de la rata y una fotografía representativa de la conducta a través de las fases de ciclo sueño-vigilia: Sueño de Ondas Lentas uno (SOL I) Sueño de Ondas Lentas dos (SOL II), sueño de movimientos oculares rápidos (REM) (tomado de Guzmán K. y Montes-Rodríguez C. J. 2004)

1. 1. 3 Neuroanatomía del sueño

1. 1. 4 Vigilia

A partir del trabajo de Moruzzi y Magoun, se mostró que en el alertamiento cortical y en la vigilia, participan un conjunto de rutas ascendentes que se originan en la parte superior del tallo cerebral, cerca de la unión del puente y del mesencéfalo. Este conjunto de rutas ha sido definido clásicamente como Sistema Reticular de Activación Ascendente (ARAS, por sus siglas en inglés) (citado por Saper C. B. *et al.* 2005).

Éste sistema consiste en poblaciones de neuronas en la FR que corren a través de la FR mesencefálica y la FR pontina. Las investigaciones posteriores revelaron los núcleos específicos y los tipos celulares que producen dicho alertamiento (Saper C. B. *et al.* 2005).

A lo largo del tallo cerebral pontino y mesencefálico hay un prominente tracto fibroso, el *brachium conjunctivum* (ver figura 1.5) que lleva señales del cerebelo al tálamo. Como se puede observar en la figura 1.5, alrededor de este tracto al nivel de la unión pontino-mesencefálica hay dos núcleos, el núcleo Pedúnculo Pontino Tegmental (PPT) y el núcleo Latero Dorsal Tegmental (LDT), a estos dos núcleos colinérgicos se les ha nombrado núcleos parabraquiales (PB) (Siegel J. 2004). Los núcleos PPT y LDT envían sus proyecciones colinérgicas excitadoras al núcleo tálamo cortical y al núcleo reticular. Otra población de neuronas colinérgicas, se entremezcla con células que en su mayoría producen el neurotransmisor llamado ácido gamma-

aminobutírico (GABA, por sus siglas en inglés), es decir, son GABAérgicas, en el CBA (incluyendo al núcleo *basalis* y al núcleo preóptico magnocelular en la *substancia innominata*). Así como el núcleo septal medial y el núcleo de la banda diagonal de Broca, que proyectan a la corteza y en una extensión menor al tálamo (Fuller P. M. *et al.* 2006).

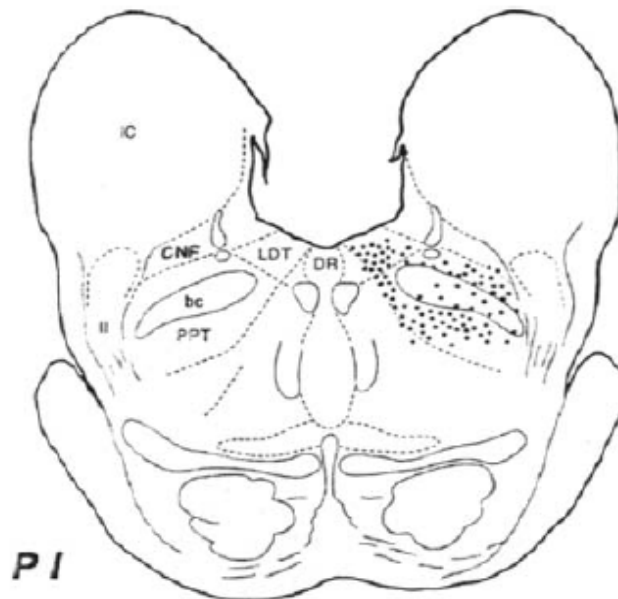


Figura 1. 5. Dibujo de una sección coronal del tallo cerebral de gato, mostrando la localización de los núcleos parabraquiales, el núcleo Pedúnculo Pontino Tegmental (PPT) y el núcleo Latero Dorsal Tegmental (LDT). Abreviaciones: (bc) *brachium conjunctivum*, (CNF) núcleo cuneiforme, (DR) núcleo Rafe dorsal, (IC) colículo inferior (Tomado de Siegel J. 2004).

A partir de la activación de los núcleos PB, el alertamiento cortical está mediado por dos rutas: una vía dorsal y una ventral, ambas se ilustran en la figura 1.6.

La vía dorsal es muy directa, las células PB proyectan a los núcleos intralaminares del tálamo. Estos núcleos proyectan a áreas extensas de la

corteza cerebral y son frecuentemente referidas como proyecciones no específicas o difusas del tálamo. Cuando las terminales de estas fibras se activan liberan glutamato y producen la activación de toda la corteza cerebral (Jones B. E. 2005).

La vía ventral posee una ruta más compleja hacia la corteza. Los componentes del tracto procedentes de la FR divergen de la vía dorsal y cursan a través de la región ventral del cerebro anterior para posteriormente inervar al tálamo, el cual proyecta hacia la corteza cerebral y la activa. Esta ruta se origina de las células monoaminérgicas de la porción superior del tallo cerebral y del hipotálamo posterior. Los sistemas monoaminérgicos que se incluyen son: el núcleo noradrenérgico LC, las neuronas dopaminérgicas de la sustancia gris periacueductal (VIPAG, por sus siglas en inglés) (Lu J. *et al.* 2006a), los núcleos serotoninérgicos del Rafe dorsal (RD) y Rafe medial; además de las neuronas histaminérgicas del núcleo tuberomamilar (NTM) (ver figura 1.6) (Saper C. B. *et al.* 2005). En general, las neuronas de los grupos celulares antes mencionados disparan más durante la vigilia que durante el SOL, y en el sueño MOR prácticamente no muestran actividad eléctrica. Éstos proyectan al tálamo, al hipotálamo lateral (HL), al CBA y a la corteza cerebral (Saper C. B. *et al.* 2005). Además, el HL contiene al menos dos poblaciones celulares con neurotransmisores peptídicos que contribuyen a la regulación de la vigilia. Las neuronas del HL que contienen orexinas, están activas en la vigilia e incrementan las tasas de disparo de las neuronas del NTM, LC y el RD (Ericsson K. S. *et al.* 2001).

Las neuronas del HL que contienen la hormona concentradora de melanina (MCH, por sus siglas en inglés), tienen proyecciones similares a las proyecciones de las neuronas orexinérgicas, pero se encuentran más activas durante el sueño MOR, tiempo durante el cual estas neuronas inhiben a los sistemas ascendentes monoaminérgicos (Saper C. B. *et al.* 2005).

El HL contiene al menos dos poblaciones celulares con neurotransmisores péptidicos que contribuyen a la regulación de la vigilia. Las neuronas del HL que contienen orexinas, están activas en la vigilia e incrementan las tasas de disparo de las neuronas del NTM, LC y el RD (Ericsson K. S. *et al.* 2001).

Las neuronas del HL que contienen la hormona concentradora de melanina (MCH, por sus siglas en inglés), tienen proyecciones similares a las proyecciones de las neuronas orexinérgicas, pero se encuentran más activas durante el sueño MOR, tiempo durante el cual estas neuronas inhiben a los sistemas ascendentes monoaminérgicos (Saper C. B. *et al.* 2005).

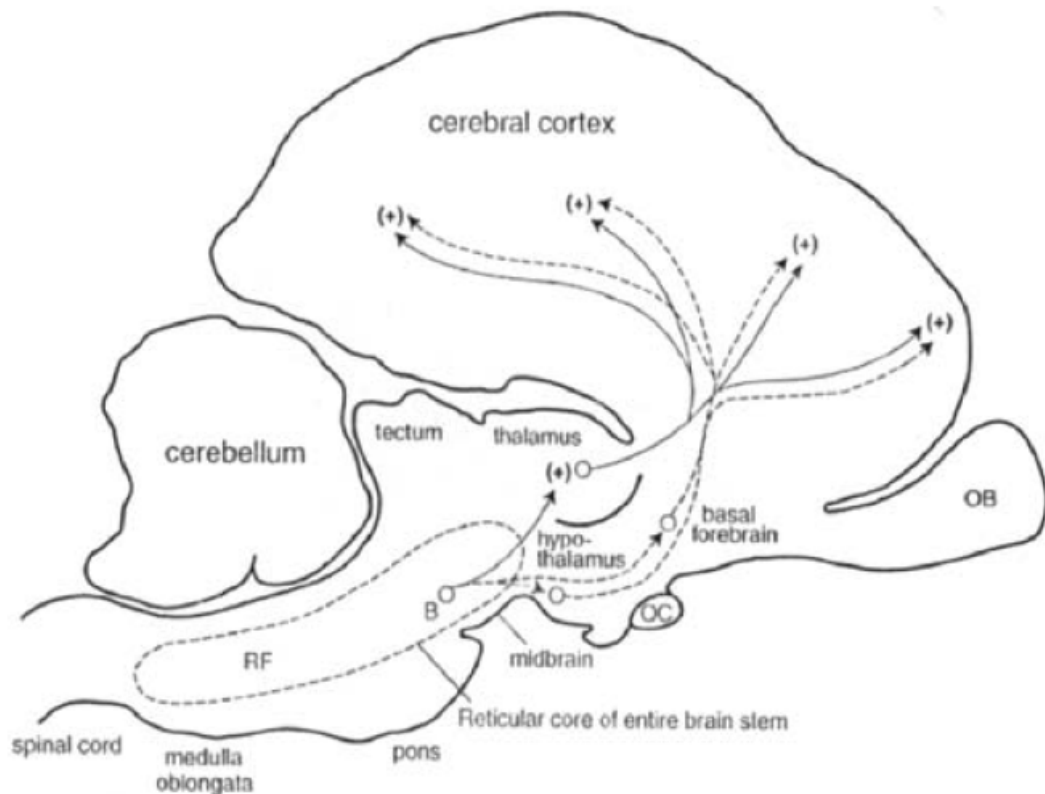


Figura 1. 6. Núcleos y rutas de los componentes dorsal y ventral del sistema de activación ascendente que se origina en las células colinérgicas de la Formación Reticular. La ruta dorsal representada en líneas sólidas activa a la corteza a través del tálamo. La ruta ventral en líneas discontinuas muestra la participación del hipotálamo y del cerebro basal anterior en la activación cortical. Formación Reticular (RF). (AC) Comisura anterior, (BFB) Cerebro Basal Anterior, (OB) Bulbo Olfatorio, (OC) Quiasma Óptico. (+) Representa activación Tomado de Siegel J. 2004.

Como se mostró anteriormente las proyecciones de las neuronas colinérgicas, de los grupos celulares monoaminérgicos y de las neuronas orexinérgicas del hipotálamo posterior se inervan mutuamente y actúan en conjunto para producir el alertamiento de la corteza cerebral, pero ¿qué estructuras apagan este sistema de alertamiento para producir el sueño? Esta duda se intentará aclarar en el siguiente apartado.

1. 1. 5 El Sueño de Ondas Lentas (SOL)

Recientemente, una serie de estudios ha postulado al núcleo preóptico ventrolateral (VLPO, por sus siglas en inglés) del hipotálamo como un participante clave en la inhibición de los circuitos de alertamiento durante el sueño (Sherin J. E. *et al.* 1996). Las neuronas del núcleo VLPO están activas en el sueño y contienen a los neurotransmisores inhibidores GABA y galanina. Como se mencionó anteriormente, las lesiones del hipotálamo anterior, como en los pacientes de Von Economo o las lesiones hechas por Ranson en monos y en ratas por Nauta inducen insomnio. Asimismo, las lesiones excitotóxicas y específicas en el VLPO, producen insomnio y la fragmentación en la duración del sueño (Lu J. *et al.* 2000). Este núcleo contiene dos poblaciones de neuronas, el primer grupo de neuronas está localizado en el centro del núcleo formando una agrupación, por lo que se le conoce como VLPO conglomerado. Esta área proyecta con mayor densidad a las neuronas histaminérgicas del NTM (ver figura 1.7), que están relacionadas con las transiciones entre la vigilia y el SOL; mientras que la segunda población posee una localización menos definida, por lo que es denominada como VLPO extendido y proyecta más densamente al LC y al RD como se puede observar en la figura 1.7 (Saper C. B. *et al.* 2001).

El núcleo VLPO también recibe aferencias de cada uno de los sistemas monoaminérgicos más importantes (ver figura 1.8). Tanto los grupos noradrenérgicos como los serotoninérgicos inhiben a las neuronas del núcleo

VLPO. Éste no posee receptores para histamina, pero el NTM también contiene neuronas GABAérgicas que son capaces de inhibirlo, así como otros inhibidores peptídicos potenciales como son la galanina y las endomorfina. Por lo tanto, al núcleo VLPO lo pueden inhibir varios sistemas de alertamiento y éstos a su vez permanecer inhibidos en el sueño (Saper C. B. *et al.* 2005).

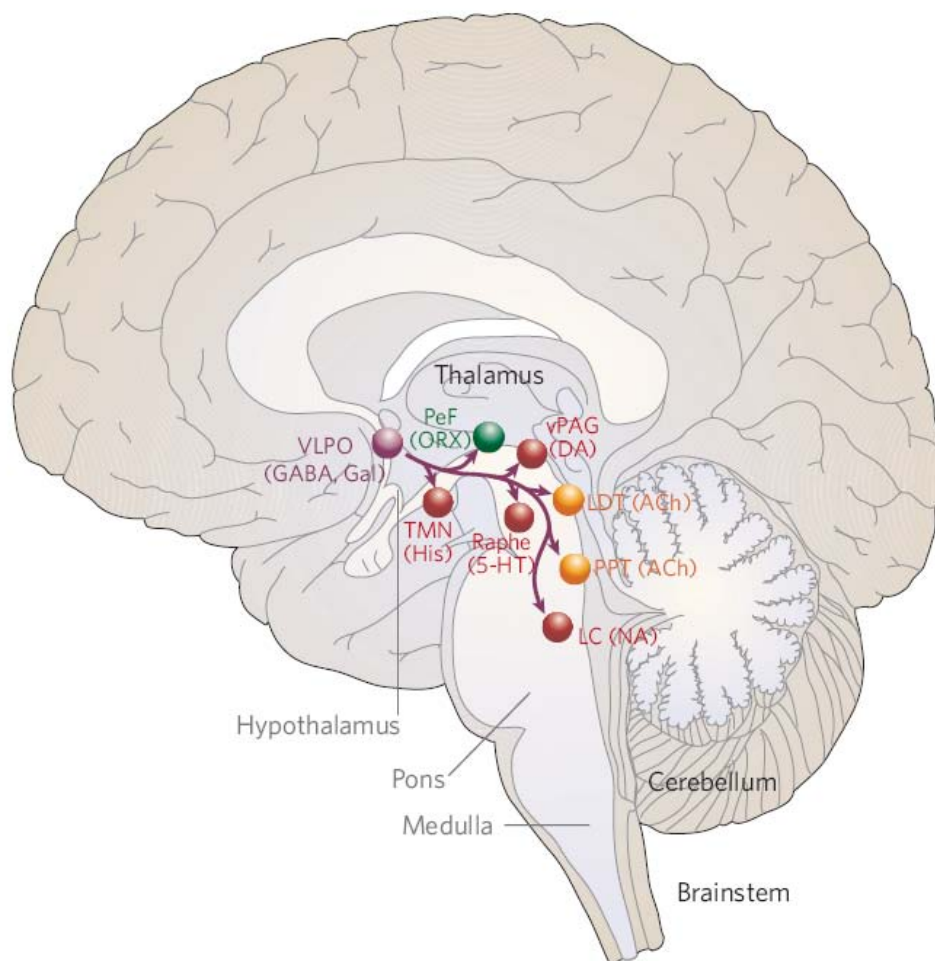


Figura 1. 7. Esquema que muestra las proyecciones claves del núcleo preóptico ventrolateral, VLPO, a los principales componentes del Sistema de Activación Ascendente. Los grupos monoaminérgicos y el núcleo tubero mamilar (TMN) se muestran en rojo, el hipotálamo lateral incluyendo el área perifornical (PeF) se ejemplifican en verde y las interneuronas de los grupos celulares colinérgicos en amarillo. Las neuronas productoras de GABA y galanina del VLPO, se exponen en morado. Tomado de Saper C. B. *et al.* 2005.

Adicionalmente, se ha mostrado que la interacción entre el núcleo VLPO y los componentes de los sistemas de alertamiento es inhibirse mutuamente y se propone que su interacción es análoga a la de un circuito, que los ingenieros eléctricos llaman un “circuito con un interruptor de encendido y apagado”, mismo que ellos diseñan con la finalidad de producir estados discretos con transiciones marcadas (Saper C. B. *et al.* 2001).

Estos circuitos tienden a eliminar estados intermedios, porque cuando uno de los lados empieza a superar al otro, el interruptor cambia al estado alternativo. Este modelo de circuito con interruptor puede explicar porque las transiciones de vigilia a sueño, son relativamente abruptas (uno se queda dormido y despierta repentinamente). Además, tanto los humanos como otros animales pasan una mínima parte del día (1-2%) en estados transitorios (Saper C. B. *et al.* 2001).

Una de las características de este circuito con interruptor es que cada parte de él, inhibe activamente al otro lado, creando así un circuito de retroalimentación que se estabiliza en ambas direcciones. Además, poseen una naturaleza autoreforzadora, es decir, este circuito se fortalece asimismo. Por ejemplo, cuando una de las partes está disparando, este interruptor reduce su propia retroalimentación inhibitoria (ver figura 1.8.). Sin embargo, este interruptor a veces posee la propiedad indeseable de que ocurran transiciones abruptas a estados conductuales no deseados, como la fragmentación del

sueño por la interrupción de despertares y las siestas diurnas. La frecuencia de aparición de estados indeseados puede aumentar cuando un lado del interruptor está debilitado es decir, el lado debilitado se vuelve menos hábil para inhibir al otro lado (Saper C. B. *et al.* 2001).

Sumado al VLPO, a los sistemas monoaminérgicos y al NTM, las neuronas orexinérgicas del HL, que están activas principalmente durante la vigilia, también interaccionan en este circuito. Este núcleo tiene proyecciones ascendentes hacia la corteza cerebral, así como proyecciones descendentes hacia los núcleos monoaminérgicos y colinérgicos de los grupos celulares del sistema de alertamiento (Peyron C. *et al.* 1998). Conjuntamente, hay proyecciones recíprocas entre el VLPO y el HL. Sin embargo, éste último no expresa receptores a orexinas. Por lo tanto, las neuronas orexinérgicas fortalecen a los sistemas de alertamiento, pero es muy probable que no a través de la inhibición directa al VLPO (Saper C. B. *et al.* 2001).

La posición externa del HL al interruptor, le permite estabilizar el estado conductual, reduciendo así las transiciones, tanto en la vigilia como en el sueño (Fuller P. M. *et al.* 2006).

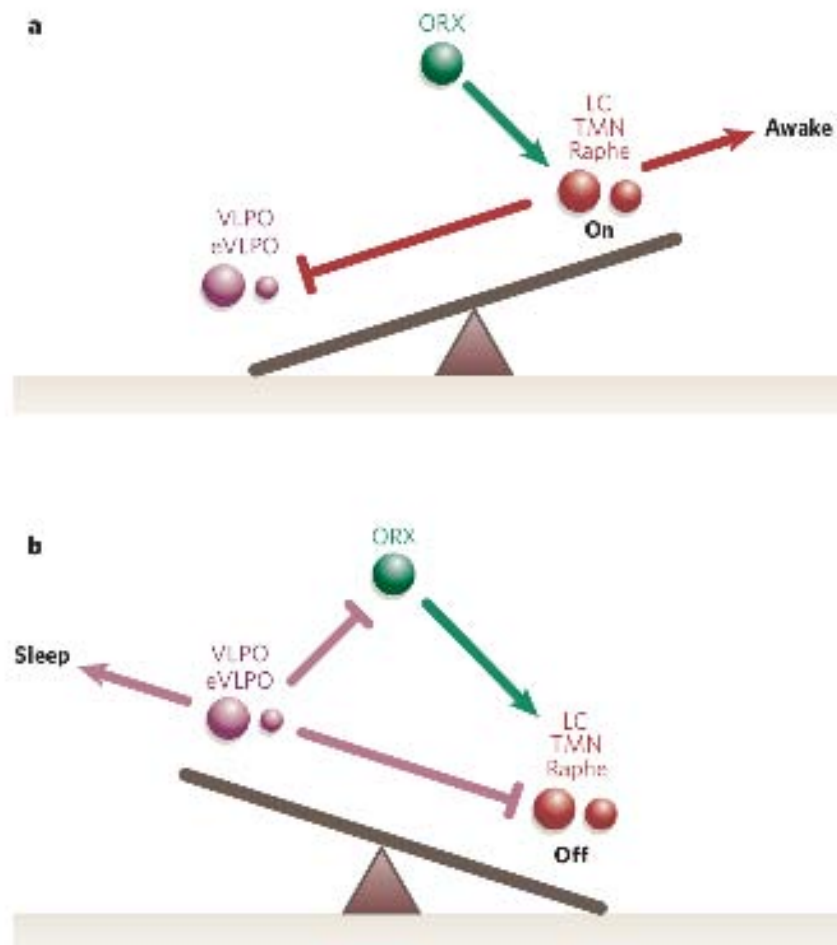


Figura 1. 8. Modelo de Interacción entre el VLPO y el sistema de alerta cortical. En la vigilia **(a)**, los núcleos monoaminérgicos (en rojo) inhiben al núcleo preóptico ventrolateral (VLPO) (en morado), por lo tanto liberan de la inhibición a las células monoaminérgicas, a las neuronas orexinérgicas (ORX) en verde, y a los núcleos colinérgicos pedúnculo pontino tegmental (PPT) y latero dorsal tegmental (LDT) (PPT y LDT no se muestran). Debido a que las neuronas del VLPO no tienen receptores a orexinas, las neuronas orexinérgicas sirven principalmente para reforzar el tono monoaminérgico, más que para inhibir directamente al VLPO.

En el sueño **(b)** el disparo de las neuronas del VLPO inhibe a los grupos monoaminérgicos, por lo tanto, se libera de su propia inhibición. Esto permite también inhibir a las neuronas orexinérgicas. Además, evita la activación monoaminérgica que puede interrumpir el sueño. Tomado de Saper C. B. *et al.* 2005

1. 1. 6 El Sueño de Movimientos Oculares Rápidos (sMOR)

Estudios originales realizados en el laboratorio del estadounidense Clifford B. Saper y sus colaboradores en el año 2006, han revelado la presencia de áreas que son activadoras e inactivadoras del sueño MOR. Dichas áreas no son las estructuras colinérgicas y monoaminérgicas propuestas en los trabajos y teorías anteriores. Estas áreas activadoras e inactivadoras del sMOR, se inhiben recíprocamente. Ambas áreas se encuentran en el *Tegmentum* Mesopontino y forman parte de las bases neuroanatómicas de un nuevo modelo de “circuito con un interruptor de encendido y apagado” para el sueño MOR (Lu J. *et al.* 2006a), el cual se ilustra en la figura 1.9.

En este arreglo con un interruptor, el grupo de Saper propone a los núcleos colinérgicos y monoaminérgicos del tallo cerebral como moduladores del sueño MOR y no como generadores del mismo. Con sus hallazgos propone a tres grupos celulares activadores del sMOR que tienen proyecciones y neurotransmisores distintos. El núcleo sublaterodorsal del LC (SLD) en su región ventral contiene neuronas glutamatérgicas que proyectan a la médula oblongada y a la médula espinal, y las neuronas GABAérgicas del SLD proyectan a las neuronas inactivadoras del sMOR en el vIPAG y del núcleo Latero Pontino Tegmental (LPT), a las cuales el VLPO extendido es capaz de inhibir (Fuller P. M. *et al.* 2007).

El área preCoeruleus (PC) perteneciente al área MOR activadora y los núcleos PB también poseen neuronas glutamatérgicas, pero estas neuronas

proyectan al CBA y al septum medial, regulando en conjunto las oscilaciones θ del epifenómeno EEG, en la corteza cerebral y en el hipocampo durante el sueño MOR. Por lo tanto, las lesiones en SLD, en el área ventral del SLD y en el área PC provocan la pérdida de componentes específicos del sueño MOR: la lesión del SLD provoca la pérdida en la duración del sMOR, la lesión del SLD ventral, la pérdida de la atonia que caracteriza al sueño MOR y la lesión del área PC, la pérdida del ritmo θ en el EEG (Lu J. *et al.* 2006b).

El área activadora del sueño MOR también es capaz de inactivar al área inhibidora del sueño MOR y viceversa. La inhibición recíproca entre estas regiones produce un interruptor de encendido-apagado (Fuller P.M. *et al.* 2007). Por lo tanto, su modelo de regulación del sueño MOR sugiere un arreglo análogo al modelo del interruptor de encendido y apagado como el descrito para el SOL. Sin embargo, los núcleos que intervienen son distintos, las neuronas inactivadoras del sMOR son las correspondientes a las áreas VIPAG y LPT que inhiben a los tres grupos activadores del sMOR y las neuronas GABAérgicas del SLD retroalimentan a las neuronas inactivadoras del sMOR.

Este interruptor del sueño MOR está modulado por neuronas colinérgicas (PPT y LDT promotoras del sueño MOR) y por neuronas tanto noradrenérgicas (LC) como serotoninérgicas (RD que inhiben el sueño MOR) (Lu J. *et al.* 2006b).

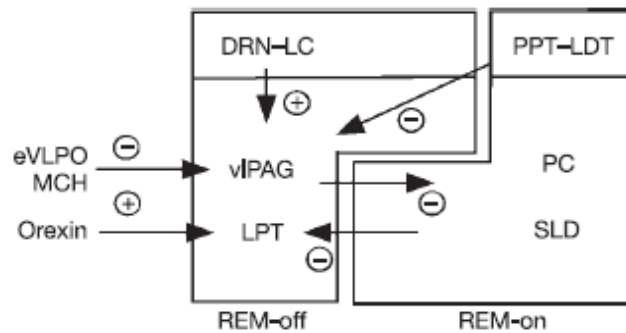


Figura 1. 9. Modelo que expone la interrelación de las dos partes del interruptor del sueño MOR. La región inactivadora del sMOR recibe proyecciones provenientes de las neuronas orexinérgicas y de neuronas MCHérgicas del área preóptica ventrolateral en su parte extendida (VLPO). Estas neuronas se encuentran en la sustancia gris periacueductual (vIPAG) y en el núcleo latero pontino tegmental (LPT) y tienen una interacción recíprocamente inhibitoria con las neuronas GABAérgicas del área ventral de la región sublaterodorsal del LC (vSLD) y con las neuronas del área precoeruleus (PC). Las neuronas colinérgicas de los núcleos pedúnculo pontino tegmental y laterodorsal tegmental (PPT-LDT) son activadoras del sMOR y pueden inhibir al LPT, pero a estas no las inhibe el circuito, por lo tanto no forma parte la interacción recíprocamente inhibitoria del interruptor del sMOR. De manera equivalente, las neuronas del núcleo Rafe Dorsal (DRN) y del *Locus Coeruleus* (LC) activan al área inactivadora del sMOR. Sin embargo, no se inhiben directamente por SLD y no forman parte del interruptor del sMOR.
Tomado de Lu J. *et al.* 2006.

Hasta aquí se propone que la modulación de ambas fases del sueño se puede explicar mediante los modelos del circuito con interruptor, no olvidando que los núcleos implicados son análogos, por tanto diferentes, pero la interacción entre los grupos celulares que participan en cada fase es en esencia la misma.

Control de la atonia muscular durante el sueño MOR

En la búsqueda del funcionamiento de la atonia muscular durante el sueño MOR, se plantearon varios modelos, pero el modelo más aceptado fue el que proponía que los circuitos que intervienen en la inhibición del tono muscular, residen en la protuberancia y en el bulbo; debido a que las neuronas

motoras están inhibidas por estos dos núcleos, este modelo se ilustra en la figura 1.10 (Kandel E. 2000). Sin embargo, en estudios posteriores se encontró que gatos con lesiones en la región subcoeruleus del tallo cerebral exhibían una potencial representación de sus sueños (por ejemplo, elevación de cabeza, locomoción, intentos de atrapar un ratón) durante el transcurso del sueño MOR, al conjunto de estas conductas extraordinarias se les nombró “conductas oníricas” (citado por Fuller P. M. *et al.* 2007).

Como se mencionó previamente en el año 2006 Jun Lu reportó que las lesiones de las neuronas del núcleo SLD en ratas, que es equivalente al área subcoeruleus en gatos y en humanos, generan periodos de sueño MOR sin atonia. Debido a que SLD tiene proyecciones glutamatérgicas directas a las interneuronas glicinérgicas, esto sugiere que el mecanismo de control tónico primario para producir la atonia observada durante el sMOR, es a través de proyecciones espinales glutamatérgicas directas a las interneuronas glicinérgicas o GABAérgicas del cuerno ventral de la médula espinal, por lo que no se requiere de un relevo medular (Lu J. *et al.* 2006).

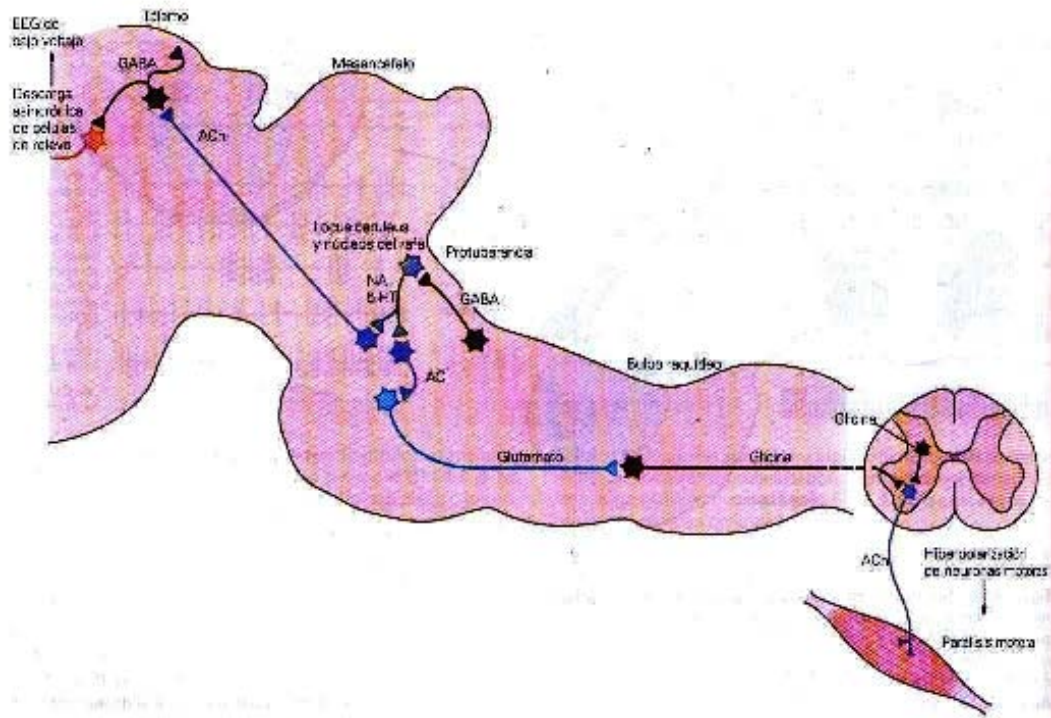


Figura 1. 10. Modelo precursor del control del tono muscular durante el sueño MOR.

Los grupos neuronales se muestran en un corte sagital del tronco encefálico de gato. La activación de las neuronas GABAérgicas en la protuberancia provoca la inhibición de las neuronas noradrenérgicas y serotoninérgicas y la activación de neuronas colinérgicas de la protuberancia. El tono muscular se inhibe por un sistema descendente. Las neuronas colinérgicas de la protuberancia excitan a las neuronas glutamatérgicas, estas proyectan al bulbo raquídeo, donde terminan en interneuronas que liberan glicina sobre las neuronas motoras, hiperpolarizándolas y por lo tanto inhibiéndolas. Tomado de Kandel E. 2004

1. 1. 7 Moléculas promotoras del Sueño: Antecedentes

La hipótesis que propone que al sueño lo regulan mecanismos humorales, está fundamentada en la evidencia empírica antigua. La idea de que al sueño lo inducen “vapores”, ha prevalecido desde tiempos antiguos y estos conceptos persistieron en varias formas por milenios. La conexión entre estas ideas arcaicas sobre la regulación humoral del sueño y la investigación moderna que continua hasta nuestros días, se estableció de dos investigaciones hechas independientemente que utilizaron aproximaciones semejantes por los grupos de Ishimori en 1909 y Pieron en 1913 (Opp M.2004).

Pieron privó de sueño a perros que previamente había implantado con una cánula en la cisterna magna. Extrajo el líquido cefalorraquídeo (LCR) de estos perros a los que había mantenido despiertos durante varios días y se lo administró a la cisterna magna de perros que habían dormido *ad libitum* y éstos se durmieron. Fue así que sugirió que el sueño era el efecto de una hipnotoxina producida en el encéfalo, la cual se acumula en el LCR durante la vigilia. Con base en este estudio, sugirió que existen sustancias que se acumulan durante la vigilia y que cuando llegan a cierto nivel detectable por el cerebro, provocan la necesidad de dormir, para metabolizarlas durante el sueño.

Sin embargo, las teorías neurales propuestas por Von Economo y otros ensombrecieron los estudios de Ishimori y Pieron y no fue hasta los años sesenta que se volvieron a considerar los mecanismos humorales en la regulación del sueño (citado por Opp M. 2004). A partir de esta década, los

neurotransmisores estudiados que se han involucrado en la regulación del ciclo sueño-vigilia han sido numerosos. El interés de encontrar cómo los sistemas de neurotransmisión regulan el ciclo sueño-vigilia ha aumentado notablemente, últimamente con fines terapéuticos (Krueger J. M. *et al.* 1999).

Continuando con la búsqueda de sustancias que inducen sueño, distintos grupos de investigación buscaron y determinaron las características moleculares y funcionales de varias sustancias, a las que se les describió propiedades hipnogénicas. Por ejemplo, la teoría monoaminérgica postulada por Jouvet propuso que la serotonina producida por el sistema Rafe regula el SOL, mientras que el SP resulta de la acción de la noradrenalina producida por el LC. Jouvet conjuntó estas premisas y concluyó que el estado de sueño depende principalmente de la actividad de las monoaminas (citado por Prospéro-García O. y Drucker-Colín R. 1996).

El neurofisiólogo mexicano Raúl Hernández Peón, demostró que la estimulación mediante acetilcolina y carbamilcolina en el POA de gatos producía sueño. También, demostró que la administración de atropina (droga anticolinérgica) en dicha área reduce el tiempo total de sueño. Basándose en éstas y en otras observaciones que involucraron la estimulación química con sustancias colinérgicas en el tronco cerebral y en la médula espinal, formuló su teoría colinérgica, la cual afirma que la estimulación colinérgica es esencial en la producción de sueño (Hernández Peón R. 1965).

En esta misma década Marcel Monnier realizó una serie de experimentos en conejos a los que les hizo un arreglo de circulación cruzada, un donador y otro receptor y observó que la estimulación eléctrica de baja frecuencia en los núcleos intralaminares del tálamo que producía sincronización del EEG en el donador, también moderaba la actividad eléctrica cerebral del receptor, es decir, en ambos conejos.

El registro simultáneo de la actividad eléctrica cerebral del donador y el receptor muestra un incremento significativo de las ondas δ en ambos, fenómeno al que denominó “sueño delta ortodoxo”. Esto sugirió que la sangre del donador “adormecido” contenía una sustancia capaz de modificar la actividad cerebral del receptor. A esta sustancia la nombraron factor hipnogénico (Monnier, M. y Hösli L. 1965).

En 1976, el médico estadounidense John Richard Pappenheimer obtuvo una sustancia a partir de un extracto del LCR de cabras privadas de sueño durante 48 horas, mediante choques eléctricos (2.5-mA, 60 Hz). Lo administró en el cerebro intraventricularmente a ratas que durmieron *ad libitum*, e indujo en ellas un incremento del 25% de SOL en las primeras 6 horas, fue así que propuso que existía un factor promotor del sueño al que nombró sustancia P (Pappenheimer J. R. *et al.* 1975).

Entre otras sustancias identificadas con propiedades hipnógenas figuran varios péptidos como los muramil (un producto químico de las paredes de las

bacterias), la interleucina-1 (una citocina mediadora de las respuestas inmunitarias), el interferón α -2 (Krueger J. M. *et al.* 1999), la colecistocinina 8 (CCK-8, por sus siglas en inglés) (Kápas L. *et al.* 1988), la somatostatina (Danguir J. 1986) y la cortistatina (De Lecea *et al.* 1996). Asimismo, la hormona prolactina (Krueger J. M. *et al.* 1999), el péptido vasoactivo intestinal (VIP, por sus siglas en inglés) (Riou F. *et al.* 1981), el factor liberador de la hormona del crecimiento (GH-RH, por sus siglas en inglés) y la misma hormona del crecimiento (GH, por sus siglas en inglés) (Mendelson W.B *et al.* 1983). Además, se ha propuesto que la modulación del SOL está a cargo de la prostaglandina D₂ (Ueno R. *et al.* 1983), del GABA, porque cuando éste activa al receptor (GABA_A), incrementa la somnolencia en perros (Brisbare-Roch C. *et al.* 2007) y la Adenosina, un nucleótido de purina cuando se acumula extracelularmente en el CBA durante la vigilia inhibe a las neuronas que están activas en la vigilia y así promueve el SOL en ratas (McCarley R. W. 2007).

Además, como se ha tratado en este capítulo, existen varias sustancias que facilitan la vigilia como son el glutamato, la histamina y la orexina (Jones B. E. 2005) Adicionales a éstas, se encuentran la adrenalina, el factor liberador de tirotrópina, el factor liberador de corticotropina, la corticotropina misma y los glucocorticoides (Steiger A. 2007).

Como se puede notar, la naturaleza de las moléculas promotoras del sueño es muy amplia. Así tenemos péptidos, hormonas, nucleótidos, aminoácidos y lípidos. Ahondando más en estos últimos, se sabe que las

prostaglandinas PGE₂ y la PGD₂, derivados del ácido araquidónico, participan en la respuesta inflamatoria y modulan el dolor. En cuanto a su participación en la regulación del sueño, la administración intracerebro ventricular y en el POA de PGD₂ aumenta el SOL. Adicionalmente, interacciona con GABA y con la adenosina, probablemente a través del aumento del SOL. Por otra parte, la PGE₂ está más involucrada con el mantenimiento de la vigilia. Además otros metabolitos modulan el ciclo sueño-vigilia, el primero derivado del ácido araquidónico llamado Anandamida y un derivado del ácido oleico, llamado Oleamida (Cravatt B. F. *et al.* 1995).

Adicionalmente estudios realizados en nuestro laboratorio han mostrado que la Anandamida y la Oleamida, integrantes del sistema canabinérgico, participan en la regulación del ciclo sueño-vigilia; en el siguiente capítulo se tratará de explicar qué es el sistema canabinérgico y su participación en la regulación de dicho ciclo.

1. 2. Sistema Canabinérgico

Con el descubrimiento de moléculas a las que se les ha denominado endocannabinoides y el hallazgo de los receptores donde ejercen su acción, nombrados receptores a cannabinoides y con la descripción subsiguiente de una ruta bioquímica compleja, para la síntesis, liberación, transporte y degradación de los endocannabinoides se completó la cadena de un nuevo sistema de señalización, llamado sistema canabinérgico (Pacher P. *et. al* 2006).

1.2.1 Canabinoides

Los Canabinoides se extrajeron por primera vez de la *Cannabis sativa*, mejor conocida como Marihuana (ver figura 2.1) que es una planta dioica anual, típica de las zonas templadas, la cual puede medir desde 1.5 hasta 6 metros (Lorenzo P. 2003).

La *Cannabis sativa* o marihuana es la droga ilícita con el mayor y más antiguo consumo en las sociedades occidentales. Ha sido utilizada con fines terapéuticos, religiosos y recreativos; la popularidad de la Marihuana como droga recreativa se debe a la capacidad que ésta posee para alterar la sensopercepción (Pachér P. *et al.* 2006), además es relajante, aumenta el apetito y facilita el deseo sexual (ver Prospéro-García *et al.* 2004).

La descripción de las propiedades curativas de la *Cannabis sativa* se remonta al año 2737 a. C. cuando el emperador chino Shen Nung hace referencia de ésta por sus propiedades medicinales en el tratamiento de la

gota, la malaria, algunos dolores y la falta de concentración. En la India, formaba parte de algunos rituales religiosos y fue utilizada también por sus propiedades curativas, esta práctica se ha conservado hasta nuestros días. Al principio de la era cristiana, Plinio el viejo, Discorides y Galeno describieron sus posibles aplicaciones médicas. Durante el siglo XIX, la presencia colonial inglesa en la India y la expedición de Napoleón a Egipto sirvieron para la difusión por Europa y posteriormente por los Estados Unidos de América, de las aplicaciones médicas de la *Cannabis sativa* (Lorenzo P. 2003). Algunos de sus efectos terapéuticos son como antihemético, estimulante del apetito, analgésico, (Di Marzo V. y De Petrocellis L. 2006) anticonvulsivante y antiinflamatorio, además de disminuir la ansiedad y de sus efectos en la actividad locomotora. (Prospéro-García O. *et al.* 2004).



Figura 2.1. *Cannabis sativa*

En 1964, los químicos israelíes Yehiel Gaoni y Rafael Mechoulam identificaron que el principal componente psicoactivo de la marihuana es el Δ^9 tetrahydrocannabinol (THC) (Mechoulam R. *et al.* 1967). Este componente es tan sólo uno de los aproximadamente 60 cannabinoides presentes en la planta (Pachér P. *et al.* 2006). Posteriormente se caracterizó el receptor donde el THC, ejerce su efecto (Devane W. A. *et al.* 1988) y en 1990 se clonó por primera vez dicho receptor, que se nombró receptor a cannabinoides 1 (CB₁) (Matsuda L. A. *et al.* 1990).

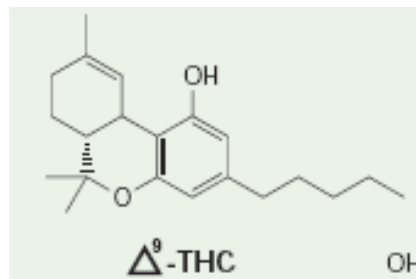


Figura 2. 2. Estructura química del THC

1.2.2 Canabinoides Endógenos

El descubrimiento del receptor de cannabinoides y la disponibilidad de cannabinomiméticos (moléculas que se unen al receptor) altamente selectivos y potentes, permitió la identificación rauda de una familia de transmisores lípidos que funcionan como ligandos naturales del receptor a cannabinoides CB₁. Estos cannabinoides son sintetizados de manera endógena por los mamíferos y por consiguiente son llamados endocannabinoides (Di Marzo V. y Fontana A. 1995).

La mayoría de los endocannabinoides son derivados del ácido araquidónico, un lípido que es constituyente de la membrana celular, combinado con una molécula de etanolamina o de glicerol. Dentro del grupo de los endocannabinoides se encuentran moléculas como la Anandamida (ANA)

(Devane W. A. *et al.* 1992), el 2- Araquidonilglicerol (2-AG) (Mechoulam R. *et al.* 1995), la Oleamida (OLE) (Cravatt B. F. *et al.* 1995), la Virodamina (Porter A. C. *et al.* 2002) y el Noladin-eter (Hanus *et al.* 2001), su estructura química se ilustra en la figura 2.3. Todos estos cannabinoides endógenos se han encontrado en el cerebro, plasma y en tejidos periféricos. Además, sus propiedades farmacológicas son muy similares a las de los cannabinomiméticos sintéticos (Bisogno T. *et al.* 2005).

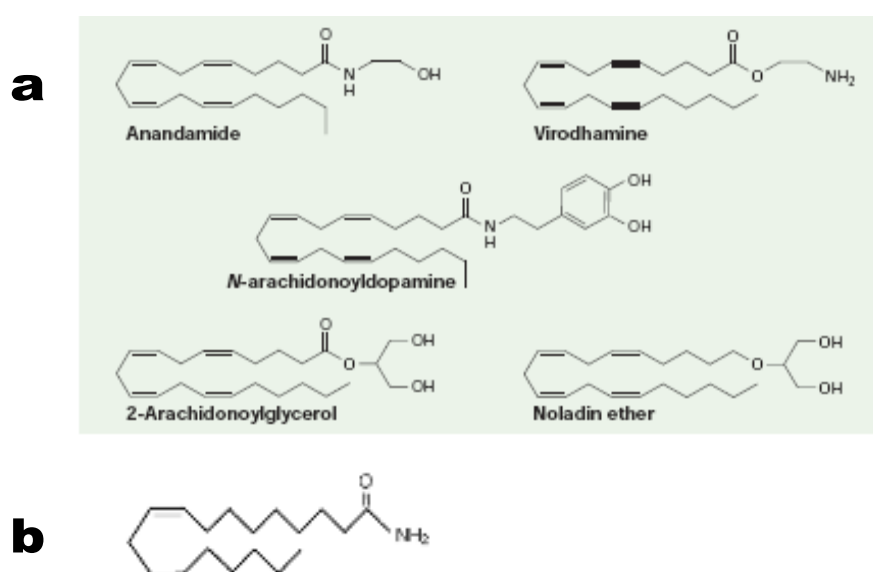


Figura 2. 3. Estructuras químicas de los principales endocannabinoides.
a) Anandamida, virodamina, N-araquidonildopamina, 2-araquidonilglicerol y Noladin eter. **b)** Oleamida. Tomado de Piomelli D. 2003

1.2.2.1 Anandamida

A principios de los años noventa un grupo israelí aisló del cerebro de cerdo, un lípido, el araquidonil- etanolamida, que actuaba de manera muy similar a los cannabinoides. Se le nombró Anandamida, que en sánscrito significa “bendición interna” (Devane W. A. *et al.* 1992) y se ha encontrado que

en el cerebro la concentración de ANA es 200 veces menor que la concentración de 2-AG (Sugiura T. *et al.* 1995).

ANA es un agonista parcial o total del receptor CB₁, dicha característica depende del tejido y de la respuesta biológica que se mida. Aunque también se une al receptor CB₂, lo hace con poca eficiencia y puede actuar como un antagonista (Gonsiorek W. *et al.* 2000).

Vía de síntesis y liberación:

ANA está formada por el precursor de un fosfolípido de membrana, el N-araquidonil-fosfatiletanolamina (NAPE, por sus siglas en inglés). Éste es sintetizado por la enzima N-aciltransferasa (NAT), la cual cataliza la transferencia del ácido araquidónico de la fosfatilcolina al grupo cabeza de la fosfatidiletanolamina, como se puede apreciar en la figura 2.4. Esta enzima requiere la presencia de calcio y está regulada por monofosfato de adenosina cíclica (AMPC, por sus siglas en inglés), aumenta la actividad de NAT por fosforilación mediada a través de la actividad AMPC dependiente de la proteína Kinasa A (Piomelli D. 2003). La liberación de ANA por NAPE es catalizada por la fosfolipasa D (PLD, por sus siglas en inglés) (ver figura 2.4). Esta enzima está clasificada como miembro de la familia zinc metalohidrolasa. La actividad de PLD puede regularse por la despolarización o por la activación de los receptores glutamatérgicos N-Metil-D-Aspartato (NMDA), por los receptores $\alpha 7$ nicotínicos (Piomelli D. 2003) o por la estimulación de receptores metabotrópicos inducida por neurotransmisores como la dopamina, el glutamato y la acetilcolina (Varma N. *et al.* 2001).

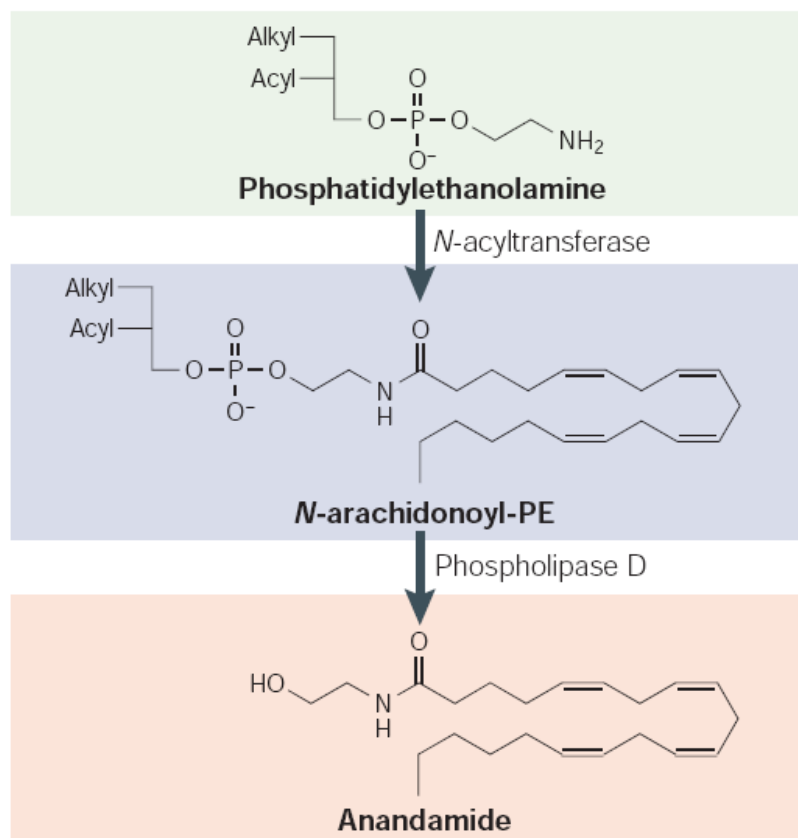


Figura 2. 4. Vía de la síntesis de Anandamida. La primera reacción: síntesis del precursor *N*-araquidonil fosfatidil etanolamina (*N*-arachidonoyl-PE), catalizada por la enzima *N*-aciltransferasa (*N*-acyltransferasa) segunda reacción: la escisión de anandamida catalizada por la fosfolipasa D (Phospholipase D). Tomado de Piomelli D. 2003

1.2.3.2. Oleamida

La Oleamida (cis-9,10-octadecenoamida) es una amida del ácido oleico que ha sido menos estudiada que ANA y por lo tanto se conoce menos de su funcionamiento. Sin embargo, se sabe que se une al receptor CB_1 (Leggett J. D. *et al.* 2004) y que es degradada por la hidrolasa de los ácidos grasos amidados (Cravatt B. F. y Lichtman A. H. 2002). Además, tiene varios efectos *in vitro* como la inhibición de la comunicación de célula a célula mediante las uniones gap, también tiene efectos sobre receptores serotoninérgicos (5-HT_1 , $5\text{HT}_{2A,C}$ y 5HT_7) y puede modular a los receptores ionotrópicos inhibidores como GABA_A (Mendelson W. B. *et al.* 2001).

La Oleamida (OLE) se acumula en el LCR de gatos y ratas privados de sueño, su principal efecto es el inducir el SOL (Cravatt B. F. *et al.* 1995) y este efecto se puede bloquear con el antagonista selectivo al receptor CB₁, el SR141716A, lo que sugiere que OLE aumenta el SOL a través de la activación del receptor CB₁ (Pachér P. *et al.* 2006).

Los endocannabinoides no son almacenados en vesículas, como otros neurotransmisores (GABA, ACh) sino que se producen a demanda en respuesta a la despolarización inducida por el aumento de calcio intracelular o la activación de varios receptores metabotrópicos. Es decir, se producen al instante en el que el sistema lo requiere (Varma N. *et al.* 2001, Kim J. *et al.* 2002). Además, son considerados mensajeros retrógrados, es decir, se sintetizan en la postsinapsis y ejercen su acción en la presinapsis (Maejima T. *et al.* 2001), aunque ahora también se sabe que tiene efectos en la postsinapsis. Dependiendo del circuito neuronal, los endocannabinoides pueden activar o inhibir la neurotransmisión (Wilson R. I. y Nicoll R. A. 2002).

1. 2. 3 Difusión e inactivación de los endocannabinoides.

Los endocannabinoides, como otros mediadores endógenos de las respuestas fisiológicas, necesitan mecanismos para desplazarlos rápidamente de sus blancos moleculares y para degradarlos posteriormente. Debido a que son compuestos lipofílicos, los endocannabinoides pueden difundir a través de la membrana. A fin de que su difusión a través de la membrana plasmática sea rápida, selectiva y sujeta de regulación, necesita que se facilite por un

acarreador o se dirija por un mecanismo que sea capaz de reducir rápidamente su concentración intracelular (Bisogno T. *et al.* 2005). Al parecer, a ANA la capturan varios tipos celulares, al menos en parte, a través de un mecanismo de transporte facilitado, conocido como el transportador de membrana de ANA (AMT, por sus siglas en inglés). En sí, la captura celular de ANA es saturable, termodependiente y sensible a inhibidores sintéticos como se esperaría de un proceso que está regulado por una proteína (Di Marzo V. *et al.* 1994). La AMT aún no ha sido aislada, ni clonada, sin embargo, la evidencia indirecta sugiere la posibilidad que también puede mediar la captura de 2-AG, noladin-eter y virodamina (Wilson R. I. y Nicoll R.A 2002). Algunos autores han reportado evidencia en contra de la existencia de AMT, sugiriendo que la hidrolasa de los ácidos grasos amidados (FAAH), que es la enzima responsable en mayor parte de la hidrólisis de ANA, es la única responsable de la captura celular de ANA, esto debido a la reducción de la concentración intracelular de ANA y probablemente a la asociación transitoria a la membrana plasmática (Bisogno T. *et al.* 2005). Sin embargo, aunque no se ha clonado la AMT, aun no es posible descartar su existencia.

1. 2. 4 Hidrólisis

La degradación de los endocannabinoides se realiza por dos sistemas enzimáticos específicos: la hidrolasa de los ácidos grasos amidados (FAAH) y la monoacilglicerol lipasa (MAGL, por sus siglas en inglés), los cuales se ilustran en la figura 2.5. Específicamente la enzima FAAH se ha identificado como la responsable de la hidrólisis de ANA, OLE y en algunos casos de 2-AG,

ácido araquidónico y glicerol (Cravatt B. F. *et al.* 1996). La FAAH es una proteína integral de membrana de 597 aminoácidos que pertenece a la familia serina-hidrolasa, la FAAH está ampliamente distribuida en el cuerpo con altas concentraciones en el cerebro y en el hígado; se ha clonado de un amplio número de especies con un alto grado de conservación entre el ratón y el humano (Patricelli P. M. y Cravatt B. F. 2000). Además, se ha estudiado ampliamente a la región promotora del gen de la FAAH y se sabe que la FAAH es blanco de acción de la progesterona y la leptina (péptido hipotalámico), los cuales la regulan a la alza y por estrógenos y glucocorticoides, los cuales la regulan a la baja (Bisogno T. *et al.* 2005).

A pesar de que la FAAH es capaz de catalizar la hidrólisis de 2-AG, los niveles de éste no aumentan en ratones knockout para la FAAH. La principal enzima responsable de su degradación es la MAGL, ésta es una enzima que también pertenece a la familia serina-hidrolasa (Dinh T. P. *et al.* 2002). Se encuentra presente en las fracciones membranales y citosólicas celulares. En el cerebro de rata, la MAGL está presente en niveles altos en regiones donde se expresa el receptor CB₁ (hipocampo, corteza anterior, tálamo y cerebelo). Estudios recientes hechos con inmunohistoquímica sugieren que en el hipocampo la enzima se localiza en la presinápsis, apoyando así el papel de la MAGL en la degradación de 2-AG como un mensajero retrógrado (Piomelli D. 2003).

Estudios realizados en los últimos tres años, confirman la localización complementaria de MAGL y FAAH en el cerebro, presináptica y postsináptica respectivamente, sugiriendo que poseen papeles distintos para los dos endocannabinoides en el sistema nervioso central (Bisogno T. *et al.* 2005).

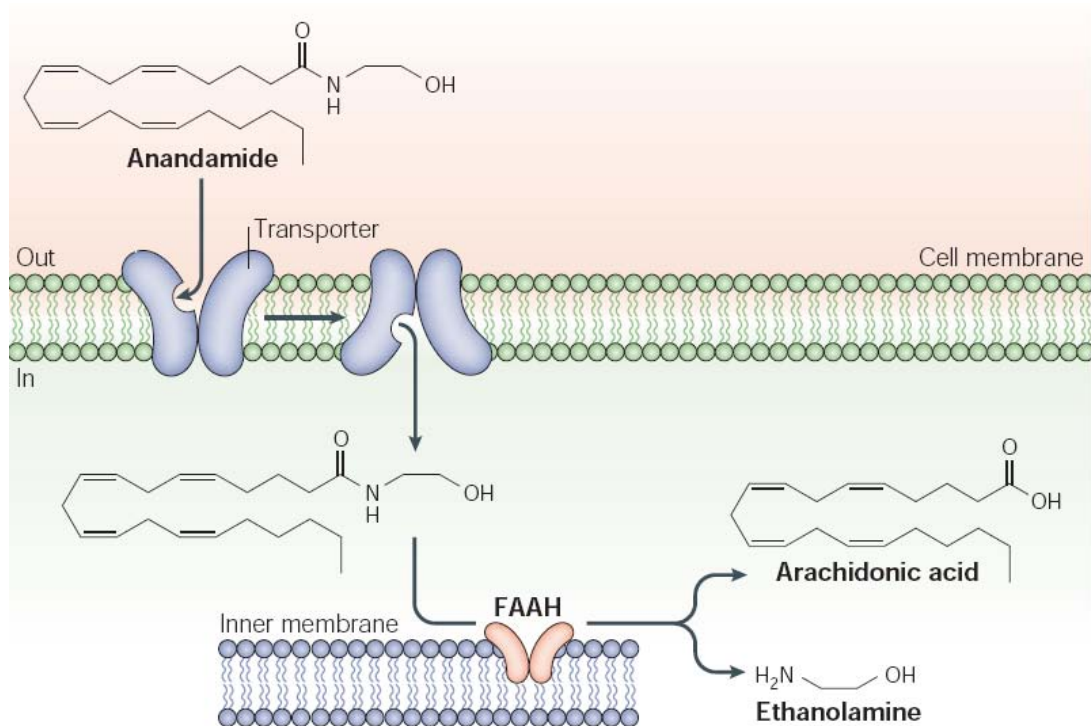


Figura 2. 5. Mecanismo de desactivación de los endocannabinoides. Tanto ANA como 2-AG pueden ser introducidos a la neurona por el transportador (AMT). Una vez dentro de las células, pueden ser hidrolizados por distintas hidrolasas de serina o por la enzima FAAH. Tomado de Piomelli 2003.

1. 2. 5 Inhibidores

El conocimiento de los mecanismos subyacentes de la biosíntesis y la inactivación de los endocannabinoides, contribuye a entender mejor los efectos mediados por los receptores a cannabinoides cuando estos se activan por sus ligandos endógenos. Este hecho abre el camino a la hipótesis de que los compuestos que regulan el metabolismo endocannabinérgico pueden

convertirse en agentes terapéuticos potenciales para el tratamiento de enfermedades en donde este sistema este involucrado (Bisogno T. *et al.* 2005).

A partir de la identificación de las enzimas que sintetizan 2-AG y ANA se desarrollaron inhibidores no selectivos para estas proteínas. Sin embargo, se han encontrado inhibidores no específicos, que impiden la formación de ANA y 2-AG en células intactas. Referente al AMT, el AM404 (ver figura 2.6) fue el primer compuesto sintético desarrollado para contrarrestar la acumulación de ANA en las células. Recientemente se identificó otro compuesto sintético más selectivo para AMT, el UCM-707 (ver figura 2.6). Este compuesto es selectivo para la recaptura de ANA. El VDM11 y el VDM13 inhiben a AMT con la misma potencia que el AM404 y no activan a los receptores vaniloides. Finalmente, el OMDM-1 y OMDM-2, fueron los primeros inhibidores selectivos de la recaptura de ANA desarrollados a partir de ácidos grasos distintos del ácido araquidónico. Mientras la existencia de AMT sigue siendo controversial, existe una gran evidencia del uso de inhibidores de la recaptura de ANA como posibles drogas que aminoran los síntomas de enfermedades utilizando modelos animales. Pues se ha mostrado que con el uso de los inhibidores de la recaptura de ANA, es posible reducir la parálisis muscular en la esclerosis múltiple, disminuir el movimiento involuntario en el modelo de la enfermedad de Parkinson, e inhibir la hiperactividad intestinal y la diarrea inducida por la toxina del cólera (Bisogno T. *et al.* 2005).

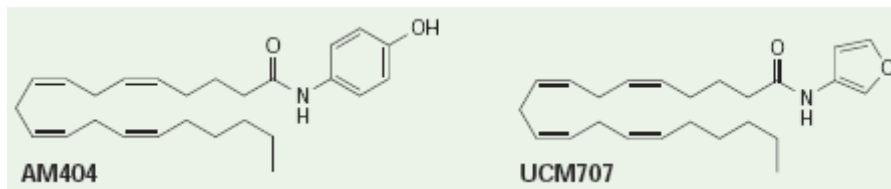


Figura 2.6. Estructura química de dos inhibidores de la recaptura de los endocannabinoides el AM404 y el UCM707.

1. 2. 6 Receptores a Canabinoides CB₁ y CB₂

Los receptores a cannabinoides son proteínas de siete dominios transmembranales y pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, es decir, son receptores metabotrópicos. Ambos receptores se han clonado y comparten el 44% de identidad proteica y el 68% de identidad en sus dominios transmembranales (Bisogno T. *et al.* 2005). El primer receptor que se describió fue nombrado CB₁, es el más abundante en el cerebro de los mamíferos, se localiza principalmente en las terminales de las neuronas del cerebro, pero también está presente en concentraciones menores en tejidos periféricos. Por ejemplo, en los sistemas reproductores femenino y masculino, algunos sistemas glandulares y en la microcirculación sanguínea (Devane W. *et al.* 1988; Howlett A. C. *et al.* 1990). El receptor a cannabinoides CB₂ se encontró inicialmente en múltiples órganos linfoides, con la expresión más alta en los linfocitos B, una expresión moderada en los monocitos y en los neutrófilos polimorfonucleares y la expresión más baja en los linfocitos T. Sin embargo, estudios posteriores lo identificaron también en células microgliales (Piomelli D. 2003). Sin embargo, en el último lustro se encontró presente en células no parenquimáticas del hígado cirrótico, en el páncreas endocrino, en el hueso (Pachér P. *et al.* 2006), y en el cerebro, en estructuras como el cerebelo y el tallo cerebral (Van Sickle M. D. *et al.* 2005).

Experimentos recientes realizados en ratas, ratones y hurones, se encontró que las neuronas del tallo cerebral, la corteza y el cerebelo expresan niveles detectables de Ácido Ribonucleico mensajero (ARNm) y receptores CB₂ funcionales; en los hurones, la activación de los receptores CB₂ del tallo cerebral previene la emesis (Van Sickle M. D. *et al.* 2005).

Estudios farmacológicos revelaron la existencia de otros blancos de acción de los endocannabinoides que incluyen a los receptores de vaniloides, los cuales están presentes en las fibras C que están especializadas en conducir el dolor, y por lo menos tres receptores distintos a CB₁ y a CB₂. El primero en astrocitos de ratón, el segundo en las células piramidales del hipocampo y el último en el endotelio vascular (Bisogno T. *et al.* 2005).

Los receptores de cannabinoides, especialmente el receptor CB₁, poseen propiedades únicas. La propiedad más relevante es su preservación a través de la evolución: los receptores CB₁ en la rata, el humano y el ratón, tienen un 97% de identidad en su secuencia de aminoácidos. La preservación de este sistema antiguo de señalización en los vertebrados y en varias filas de invertebrados refleja las funciones importantes en las que los endocannabinoides están involucrados, tanto en la fisiología celular como en la sistémica. La segunda característica notable de los receptores CB₁ es su alta expresión en el cerebro. Estos receptores son los receptores acoplados a proteína G más abundantes, con densidades de 10 a 50 veces más altas que las de los receptores de neurotransmisores clásicos como los dopaminérgicos u opioidérgicos (Howlett A. C. *et al.* 1990; Herkenham M. *et al.* 1991).

Tanto el receptor CB₁ como el CB₂ están acoplados a sistemas de transducción similares, entre ellos a la vía de AMPc. La activación del receptor a cannabinoides inicialmente se reportó que inhibe la formación de AMPc, a través del acoplamiento con proteínas G_i (proteínas G inhibitoras (Devane W. A. *et al.* 1988; Howlett A. C. *et al.* 1990). Como resultado la actividad de proteína cinasa A disminuye, ya que es dependiente del proceso de fosforilación mediado por el AMPc (Selley D. E. *et al.* 1996). Estudios adicionales confirmaron que los receptores de cannabinoides también regulan a los canales iónicos a través de las proteínas G y promueven el bloqueo de la entrada de calcio a través del cierre de los canales iónicos tipo N (Mackie K. y Hille B. 1992), P/Q (Twitchell W. *et al.* 1997) y L (Gebremedhin D. *et al.* 1999). En contraste, promueven la activación de los canales rectificadores de potasio. Estas acciones son relevantes en el papel de los endocannabinoides como reguladores de la liberación del neurotransmisor y de la plasticidad sináptica de corto plazo. Investigaciones posteriores también describieron el acoplamiento de los receptores CB₁ y CB₂ a la cascada de señalización de las MAPquinas, es decir, a las proteínas cinasas activadas por mitógenos, a la fosfatidilinositol 3 cinasa, a la cinasa de adhesión focal, a la señalización de ceramida y a la producción de óxido nítrico. Finalmente, estudios en la década anterior revelaron que bajo ciertas condiciones los receptores CB₁ pueden estimular la producción de AMPc por acoplamiento a las proteínas G_s (proteínas G estimuladoras) (Felder C. C. *et al.* 1998).

Los endocannabinoides presentan propiedades de unión distintas para cada receptor, CB₁ y CB₂. ANA actúa como un agonista parcial de ambos receptores, pero tiene una afinidad más alta por el receptor CB₁. La actividad intrínseca de ANA con el receptor CB₁ es de 4 a 30 veces más alta que en el receptor CB₂ (ver Rodríguez de Fonseca F. *et al.* 2005).

1. 2. 6. 1 Distribución de los receptores a Canabinoides

El receptor CB₁ se expresa en prácticamente todo el cerebro. Sin embargo, las concentraciones más altas se encuentran en el cerebelo, el hipocampo, el núcleo estriado, el globo pálido y la sustancia negra (Martínez-Vargas *et al.* 2003). En la figura 2.7 se observa una fotografía de un corte sagital de cerebro de rata en la que se observan las células inmunoreactivas al CB₁ con la técnica de inmunohistoquímica. Esta fotografía se interpreta como sigue: las áreas que se tiñeron con el anticuerpo para el CB₁ acoplado a un cromatóforo y por lo tanto se aprecian oscuras indican presencia del receptor CB₁ en las células, las zonas más oscuras indican una mayor cantidad del receptor en los grupos celulares tomados (Martínez-Vargas *et al.* 2003).



Figura 2. 7. Distribución de los receptores CB₁ en el cerebro de rata (Martínez-Vargas M. *et al.* 2001)

Otros blancos moleculares para los endocannabinoides.

Aunque se ha logrado un enorme progreso en el entendimiento de los mecanismos moleculares y bioquímicos que subyacen a los endocannabinoides, varios descubrimientos sugieren que estos compuestos pueden actuar también en receptores no cannabinoides. Ante todo, existen datos que sugieren la presencia de receptores distintos al CB₁ y al CB₂ que se activan *in vitro* por concentraciones de ANA que son relevantes fisiológicamente. El primer ejemplo se reportó en cultivos de astrocitos provenientes del estriado de embriones de ratones, ANA y el agonista a los receptores a cannabinoides, WIN55212-2 (ver Tabla 2.1) inhiben la formación de AMPc a través de los receptores acoplados a proteínas G distintos a los receptores CB₁ y CB₂ (Bisogno T. *et al.* 2005).

Se ha propuesto que un nuevo receptor canabinoide distinto al CB₁, induce el efecto inhibitor de WIN 55212-2 sobre la liberación de glutamato en las células piramidales del hipocampo, a este receptor putativo se le pueden unir también algunos ligandos de los receptores vaniloides. Por último, como se mencionó anteriormente el endotelio vascular contiene un nuevo receptor a canabinoides. De hecho, la vaso-relajación que depende del endotelio es inducida por ANA y se revierte por la acción del antagonista a los receptores a canabinoides SR141716A (Tabla 2.1). Sin embargo, este efecto permanece en arterias procedentes de ratones knockout para los receptores CB₁ o CB₁/CB₂. Y las concentraciones de SR141716A son muy altas para bloquear el efecto de ANA. Así que se ha postulado la existencia del nuevo receptor para endocannabinoides, llamado GPR55 (Tabla 2.1) (Jarai Z. *et al.* 1999).

1. 2. 7 Los cannabinoides: Inductores de sueño. Una aproximación práctica, la función del sistema canabinérgico en el sueño

El insomnio es la disfunción más común del sueño. Está definido como una dificultad de la iniciación, mantenimiento, duración y calidad del sueño y que resulta en una deficiencia del funcionamiento del sujeto durante el día (Pachér P. *et al.* 2006).

Se ha documentado a través de estudios previos que la marihuana y el THC afectan los patrones del sueño tanto en humanos como en animales de experimentación (Pachér P. *et al.* 2006). Recientemente, se demostró que dos de los endocannabinoides mencionados anteriormente, OLE y ANA, participan en el control del sueño. OLE administrada de manera sistémica en ratas, incrementa la somnolencia y el tiempo total de sueño (Cravatt B. F. *et al.* 2002) este efecto se puede bloquear con SR141716 (Mendelson W. B. y Basile A. S. 1999). Inicialmente, se sugirió que la inhibición de la degradación de ANA por la FAAH, más que la activación del CB₁, es responsable del efecto inductor de sueño de OLE, pero esto aún es materia de discusión.

Por otra parte, se encontró que ANA incrementa el SOL II y el sMOR en ratas, a través de la activación del receptor CB₁ y de la estimulación del proceso de señalización intracelular de la Fosfolipasa C (PLC) (Murillo-Rodríguez E. *et al.* 2001). Además, la expresión del receptor CB₁ en el puente de las ratas está modulado por el ciclo luz-oscuridad y por el sueño (Martínez-Vargas M. *et al.* 2003), los endocannabinoides y los receptores CB₁ también se

involucraron en el rebote de sMOR (Navarro L. *et al.* 2003). Además, un estudio reciente demostró que la ANA no sólo induce sueño, sino también aumenta los niveles de Adenosina, una sustancia inductora de sueño, en el CBA. Estos dos efectos son bloqueados por SR141716A (Murillo-Rodríguez E. *et al.* 2003).

A pesar de saber poco acerca de la función del sistema canabinérgico en la fisiopatología de las disfunciones del sueño, varios estudios clínicos han reportado de manera uniforme que existe una mejoría significativa en la calidad del sueño en pacientes que utilizan cannabinoides para el tratamiento sintomático de esclerosis múltiple, cáncer, dolor crónico o prurito intratable (Pachér P. *et al.* 2006). Además, como se mostró en el apartado anterior, el sueño es modulado por varios neurotransmisores, así como algunos derivados araquidónicos están involucrados en su regulación (Hayaishi O. y Matsumara H. 1995).

Sistema Canabinérgico

Ligandos de los receptores a canabinoides	THC 2-AG ANA OLE
Enzimas del sistema canabinérgico	NAPE NAT FAAH MAGL
Inhibidores de la Recaptura de ANA	AM404 UCM-707 VDM-11 VDM-13 OMDM-1 OMDM-2
Receptores a canabinoides	CB ₁ CB ₂
Posible Receptor Nuevo a canabinoides	GPR55
Agonista Sintético del CB₁	WIN55212-2
Antagonista del CB₁	SR141716A

Tabla 2.1 Los componentes del sistema canabinérgico. Como los ligandos, las enzimas, los inhibidores de la recaptura de ANA, un probable receptor nuevo para los canabinoides, un agonista sintético y un antagonista del CB₁.

1. 3. Las hembras, su ciclo estral y sus variaciones hormonales.

Como hemos observado a lo largo de nuestra vida y por experiencia propia, sabemos que existen diferencias notables en la expresión de conductas entre los machos y las hembras. Por ejemplo, en la conducta sexual, la habilidad de navegación y en la expresión verbal (Kimura D. 1996). Además, la estructura del ciclo sueño-vigilia se modifica por influencia del ciclo menstrual, más específicamente en la fase lútea, fase en la que las mujeres tienen menos sueño MOR que en cualquier otra fase del ciclo menstrual (Dzaja A. *et al.* 2005), entonces emerge la pregunta ¿qué es lo que hace la diferencia entre machos y hembras? ¿Qué determina el ciclo menstrual?

Apegándonos a nuestro modelo de estudio, a continuación se explicará el ciclo estral de las ratas, que es el equivalente al ciclo menstrual en las mujeres.

1. 3. 1 Las ratas hembras poseen un ciclo estral.

Así, la diferencia que más sobresale y la más obvia, es que las hembras poseen variaciones de hormonas sexuales que se manifiestan en un ciclo estral. La duración de este ciclo en roedores es de cuatro a cinco días y se han identificado cuatro fases: proestro, estro, metaestro y diestro, las cuales difieren tanto en las características celulares que presenta la pared vaginal, como en la variación de los niveles hormonales (Antunes I. B. 2006) dichas variaciones hormonales se muestran en la figura 3.1.

Los niveles de estradiol en sangre son basales (14 a 20 pg/ml) a través del estro y metaestro, mientras que en el diestro se presenta un incremento (25 a 40 pg/ml) que continúa hasta el proestro para alcanzar su valor máximo (45 a 90 pg/ml) al medio día de esta etapa (Schwartz N. B. 2000).

El aumento de los estrógenos desencadena un estímulo neural que activa la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH, por sus siglas en inglés) en el hipotálamo. La GnRH a su vez desencadena la secreción de la hormona luteinizante (LH, por sus siglas en inglés) por la pituitaria. En el proestro, los niveles de LH presentan un rápido incremento, alcanzándose los niveles más altos entre las 5:00 y las 7:00 p.m. este incremento de LH induce la ruptura folicular y la ovulación lo cual ocurre en las primeras horas de la mañana siguiente, es decir en el estro (Schwartz N. B. 2000).

El pico en la concentración de LH es seguido por un incremento en la secreción de progesterona que es un componente clave en la regulación del crecimiento, desarrollo y función de los tejidos del aparato reproductor femenino y en el ovario tiene un papel central en la regulación de la ovulación y la luteinización (Gava N. *et al.* 2004). Unas horas después, se presenta un comportamiento, llamado de estro, característico de la receptividad sexual femenina. En los roedores la receptividad puede durar hasta 13 horas y declina de manera gradual (Schwartz N. B. 2000).

Además, el proestro se caracteriza por un aumento en la concentración de la hormona folículo estimulante (FSH, por sus siglas en inglés). Y bajo el microscopio, es visible el predominio de células nucleadas. En el estro la concentración de la hormona estradiol está más elevada que las demás hormonas sexuales y se pueden observar células cornificadas, las cuales se encuentran prácticamente de manera única en la pared vaginal. En el metaestro hay un pequeño aumento de la FSH sobre las demás hormonas que no alcanza la magnitud del proestro y en la pared vaginal se puede observar células cornificadas y leucocitos. Finalmente, en el diestro hay células nucleadas y leucocitos que son característicos de esta fase (Fang J. y Fishbein W. 1996).

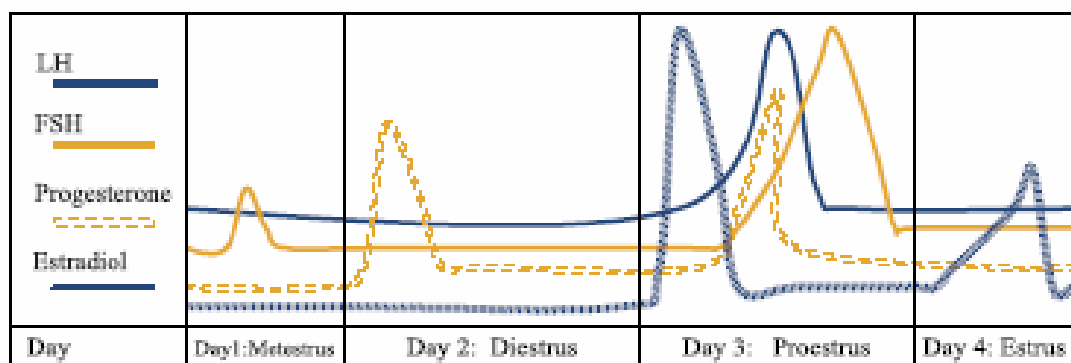


Figura 3. 1. Variaciones hormonales a lo largo del ciclo estral. En la figura se muestran los niveles hormonales en las cuatro fases del ciclo estral, comenzando por metaestro a continuación diestro donde se observa un pico de la hormona progesterona, en la siguiente fase, proestro, se observa un pico de la hormona Luteinizante (LH), la hormona estradiol, la hormona folículo estimulante (FSH) y de la hormona progesterona y finalmente la fase estral estro.

1. 3. 2 El estrógeno ejerce sus efectos a través del Receptor a estrógenos.

Ahora se sabe que los estrógenos ejercen su acción a través de los receptores a estrógenos (ER, por sus siglas en inglés). Actualmente se han descrito dos receptores intracelulares, el ER- α y el ER- β , los cuales residen en el núcleo celular de algunas células nerviosas (Shughrue P. J. *et al.* 1997).

En las primeras investigaciones sobre los efectos de los estrógenos, sólo se estudiaron el hipotálamo y la glándula pituitaria porque evidentemente era lo más relacionado con las acciones de los estrógenos en la reproducción (McEwen B. S. 2001). Sin embargo, inesperadamente se reconoció que las células nerviosas contienen receptores a estrógenos en algunas regiones cerebrales a parte de las previamente descritas en el cuerpo (McEwen B. S. 2001). Las mediciones hechas con ácido ribonucleico mensajero (ARNm) para los receptores ER- α y ER- β , mostraron que su distribución en el cuerpo difiere acentuadamente la una de la otra, con una expresión de moderada a mayor del receptor ER- α en la glándula pituitaria, en el riñón, el epidídimo, y en las glándulas adrenales. Mientras que el receptor ER- β tiene una expresión de moderada a alta en la próstata, en el pulmón, en la vejiga y en el cerebro. Las dos distribuciones coincidiendo con una expresión alta en el ovario, los testículos y el útero (Kuiper G. G. J. M. *et al.* 1997).

Respecto al SNC, el receptor ER- α se distribuye en la amígdala en sus regiones medial y cortical, en la vIPAG, en los núcleos PB, en el LC, en el núcleo del tracto solitario y en el núcleo Rafe (Shughrue P. J. *et al.* 1997).

Por su parte el receptor ER- β se distribuye en los núcleos olfatorios anteriores, en la corteza cerebral y piriforme, en los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo, en el área ventral tegmental, en la *substancia nigra*, en los núcleos pontinos, en el cerebelo, en el cuerno anterior de la médula espinal y en la glándula pineal, regiones en las que el receptor ER- α se distribuía pobremente o estaba ausente. Por el contrario, el ARNm del receptor ER- α pero no el del receptor ER- β , se detectó en el núcleo hipotalámico ventromedial, en el órgano subfornical, en el núcleo talámico ventrolateral, en las regiones lateral y basolateral de la amígdala y en el núcleo endopiriforme dorsal. A pesar de existir varias diferencias en la distribución de los receptores ER- α y ER- β , existe una superposición en la localización de sus ARNm en el área preóptica, en el núcleo cama de la *stria terminalis*, por toda la región baja del tallo cerebral y en el cuerno dorsal de la espina dorsal. Aunque ambos receptores se expresan en el núcleo arqueado y en el hipocampo, el ARNm del receptor ER- α es más abundante en el núcleo arqueado y el ARNm del receptor ER- β es más abundante en el hipocampo (Shughrue P. J. *et al.* 1997).

De esta manera, las variaciones de las hormonas sexuales durante el ciclo estral afectan el estado del cerebro específicamente los núcleos involucrados en la regulación del ciclo sueño-vigilia y otras conductas.

Comencemos por los cambios que generan dichas variaciones sobre el ER. Se ha mostrado con mediciones realizadas en el área preóptica, en el núcleo arqueado y en el núcleo ventromedial del hipotálamo mediante hibridación *in situ*, que en la región medial del área preóptica la señal de hibridación es mayor en el estro y en el metaestro, que se atenuó en el diestro y la señal más baja se registró en el proestro, este periodo se caracteriza por poseer los niveles más altos de estrógeno (Shughrue P. J. *et al.* 1992). Por el contrario, el nivel de expresión de los núcleos arqueado y ventromedial del hipotálamo fue bajo en el estro y se incrementó gradualmente a largo del ciclo hasta alcanzar un pico en el proestro (Shughrue P. J. *et al.* 1992).

Estudios previos han sugerido que un aumento en los niveles de estrógeno circulante puede reducir los niveles de ARNm para el ER en ciertas regiones del hipotálamo de las hembras (ver Shughrue P. J. *et al.* 1992). Por lo tanto, la región medial del área preóptica muestra que los cambios en el ARNm son consistentes con la hipótesis de que la expresión del receptor ER puede estar determinada ambientalmente por los niveles de estrógeno en esta región cerebral. Sin embargo, no ocurrió lo mismo para los núcleos arqueado y ventromedial del hipotálamo, lo que sugiere que existen otros factores responsables de la especificidad regional de la expresión genética (Shughrue P. J. *et al.* 1992).

En ratas ovariectomizadas el nivel de la señal de hibridación del ARNm para el ER en el área preóptica y el hipotálamo basal fue elevado en

comparación con ratas intactas. Además, se ha mostrado que la progesterona atenúa la síntesis del ER en el cerebro de roedor (ver Shughrue P. J. *et al.* 1992), lo que apunta que la ovariectomía destituye los factores ováricos adicionales que modulan la biosíntesis del ER (Shughrue P. J. *et al.* 1992).

1. 3. 3 Interacciones entre los sistemas de neurotransmisión y las variaciones hormonales.

Referente a la modulación de los sistemas de neurotransmisión por las variaciones en la concentración de las hormonas sexuales, se ha mostrado que existe una variación dependiente del ciclo estral en la concentración de dopamina estriatal, en la liberación de dopamina estriatal inducida por la estimulación de anfetaminas y en conductas reguladas por dopamina en roedores. El estrógeno actúa rápido y directamente en el núcleo estriado y en el núcleo Accumbens, a través de los receptores membranales acoplados a una proteína G, para reforzar la liberación de dopamina y las conductas reguladas por dopamina. En machos los estrógenos no tienen efectos en la liberación estriatal de dopamina y el retiro quirúrgico de los testículos permanece sin efecto (Becker J. B. 1999).

Conjuntamente a las diferencias mencionadas anteriormente, una sola neurona del núcleo ventromedial hipotalámico que está asociado al reflejo de la lordosis (conducta de receptividad femenina en roedores) recibe alrededor de 7,000 sinapsis en el diestro y 10, 000 en el proestro (Sá S. I. y Madeira M. D.

2005). Esta variación relacionada al ciclo estral se cuenta por el incremento en el número de todo tipo de sinapsis. Esto muestra que la plasticidad sináptica inducida por los estrógenos en el núcleo ventromedial hipotalámico se caracteriza por cambios en el número, mas no en el tamaño de las sinapsis (Sá S. I. y Madeira M. D. 2005).

Hasta aquí podemos observar que las variaciones en las hormonas sexuales afectan de manera distinta a varias estructuras cerebrales.

Además, el gen de expresión temprana c-fos (que se utiliza como marcador de actividad neuronal), y se ha observado que existen variaciones en la expresión de c-fos en el VLPO, APO y en el HL, en ratas hembra que se encuentran en las fases de estro y diestro (Peterfi Z. *et al.* 2004). Adicionalmente la ovariectomía (retiro quirúrgico de los ovarios) produce una reducción marcada en la expresión de c-fos en el VLPO, el APO y el HL y la administración posterior de estrógenos a las ratas ovariectomizadas estimuló la expresión de c-fos en el VLPO, en el APO y en el HL. Por lo tanto, la expresión de c-fos en el VLPO, el APO y el HL es altamente dependiente del estrógeno (Peterfi Z. *et al.* 2004).

2. 3. 4 El sueño está afectado por el sistema canabinérgico y su interacción con las hormonas.

Respecto a las interacciones entre estas variaciones hormonales y los sistemas de neurotransmisión que resultan en diferencias conductuales, se ha

mostrado que la densidad y afinidad por el receptor CB₁ tienen variaciones a lo largo del ciclo estral en ratas hembras, particularmente en el hipotálamo y en la parte anterior de la pituitaria, por el contrario, en el estriado no hubo variaciones en las densidades de CB₁, la afinidad fue más alta en diestro que en el estro (Rodríguez de Fonseca R. *et al.* 1993). Esto paralelo al hallazgo de que los canabinoides exógenos modulan la receptividad en hembras (González B. *et al.* 2000) sugiere que las hormonas gonadales esteroideas son las responsables por las diferencias dependientes ciclo estral en la eficiencia de función del CB₁ en las ratas adultas.

Además, la administración aguda de estrógeno a ratas ovariectomizadas produce una desensibilización significativa en la función del receptor CB₁ en el APO del hipotálamo. Por el contrario, la exposición prolongada (14 días) al estrógeno no altera la estimulación del pegado del agonista [35 S] GTPγS en el receptor CB₁. Por lo tanto, la administración aguda de estrógeno altera la cascada de transducción de señales, al nivel de proteína G y las conductas biológicas asociadas a estos receptores se afectan de manera similar (Mize A. L. y Alper R. H. 2000). Y como se había mencionado anteriormente, los receptores a estrógenos se regulan a la baja con la exposición crónica a una dosis constante de su agonista. Por lo tanto, la falta de efectos a la exposición crónica a estrógenos se deba a que se requieran niveles más altos de estrógeno en sangre para producir la misma respuesta en el SNC en ratas tratadas crónicamente que en ratas con una administración aguda (Mize A. L. y Alper R. H. 2000).

Al observar toda esta gama de interacciones se puede concluir que las conductas que estén afectadas por estos sistemas de neurotransmisión, como lo observado para el sistema canabinérgico, serán distintas a lo largo del ciclo estral. Una de estas conductas es el sueño, pues se ha mostrado de forma natural que la cantidad de sueño MOR en las hembras varía con el ciclo estral, en el proestro el sueño MOR es prácticamente inexistente y la actividad de ondas lentas disminuye (Schwierin B. et al 1998). No obstante, se ha registrado que en el estro hay un “rebote” de sueño MOR. Es probable que durante el proestro la disminución tan notable del sueño MOR se deba a las hormonas ováricas, pues en las ratas ovariectomizadas (sin progesterona), el sueño MOR se fortalece (Fang J. y Fishbein W. 1996).

Finalmente, mientras que el estrógeno puede ser un factor dominante en las variaciones de sueño a lo largo del ciclo estral, es posible que también la progesterona pueda ser un esteroide activador importante al regular la expresión del ER (Fang J. y Fishbein W. 1996).

Por otra parte, se encontró que las concentraciones de las orexina A y B en el hipotálamo de ratas jóvenes y con un ciclo estral normal, fueron más altas en el proestro que en el diestro, lo que sugiere que las orexinas pueden formar parte de la cascada hormonal que precede a la ovulación. Además, el elevado nivel de orexina A puede tener efecto en las funciones endocrinas, contribuyendo como se reportó previamente al aumento en la interrupción del sueño en la fase del proestro (Porkka-Heiskanen T. et al. 2004).

¿Cómo es que las diferencias en los niveles hormonales contribuyen a las variaciones a nivel celular en la actividad canabinérgica durante el ciclo sueño-vigilia?

Hasta ahora sabemos que el endocanabinoide ANA aumenta el SOL II y el sMOR, a su vez OLE aumenta el SOL en ratas macho. Es posible que con la administración de estos dos endocanabinoides podamos revertir los efectos que inducen las variaciones en los niveles de hormonas sexuales en el ciclo sueño-vigilia.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2. 1 Planteamiento del problema

Debido a que la arquitectura del ciclo sueño vigilia está modulada por el sistema canabinérgico que a su vez es afectado por las variaciones en los niveles de hormonas sexuales a lo largo del ciclo estral, en el presente trabajo se pretende evaluar si la administración central de los endocannabinoides Anandamida y Oleamida modifican la arquitectura del ciclo sueño-vigilia en las ratas hembra a lo largo del ciclo estral.

2. 2 Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

Los endocannabinoides son los mediadores de los cambios que ocurren en la arquitectura del ciclo sueño-vigilia en las ratas hembra asociados al ciclo estral.

Objetivo General

El objetivo general de este trabajo es evaluar cuánto se modifica la arquitectura del ciclo sueño-vigilia según la fase del ciclo estral en las ratas hembra.

3. MÉTODO

3.1 Sujetos

Se utilizaron cuarenta y ocho ratas hembra de la cepa Wistar con un peso de 250-280 g al inicio del experimento; todas se alojaron individualmente en cajas con agua y comida (Ratchow, Purina) *ad libitum*.

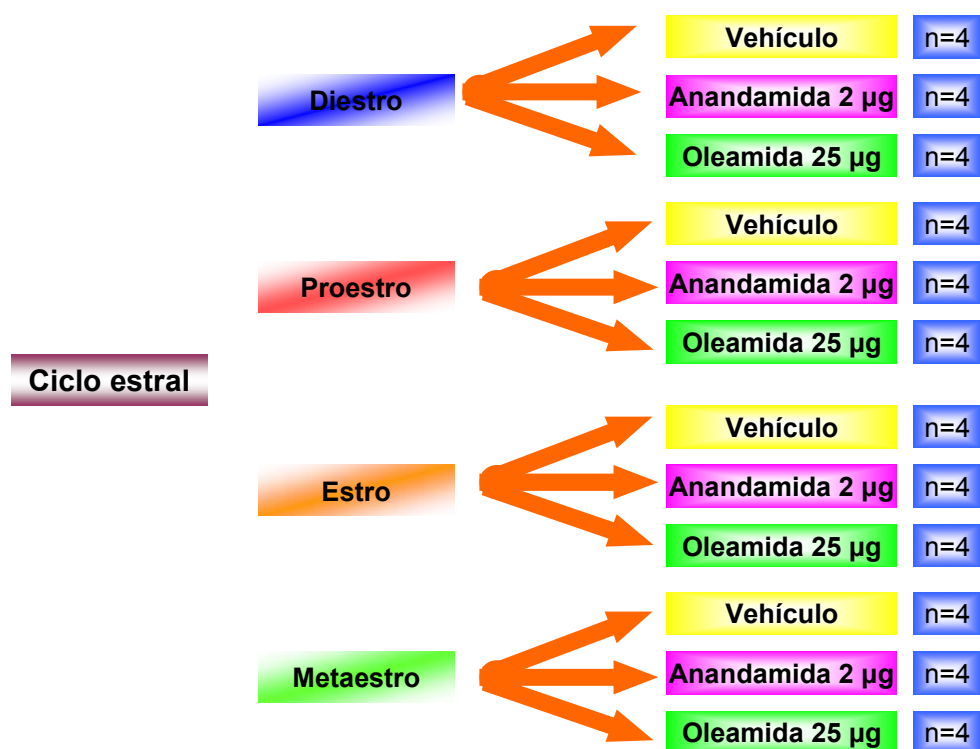
Después de la cirugía estereotáxica se les dio un período de recuperación de diez días y posteriormente fueron habituadas en la cámara de registro durante 24 horas antes de comenzar el experimento.

Se realizaron los registros del EEG y del EMG durante 24 horas, los cuales fueron calificados con el programa ICELUS.

Antes de iniciar el registro se les tomó una muestra del epitelio vaginal por medio de un frotis, con la finalidad de conocer la fase del ciclo estral en la que se encontraban las ratas al momento de iniciar el registro, al finalizar el registro nuevamente se tomó una muestra del epitelio vaginal para verificar la permanencia en la misma fase estral.

3.2 Cirugía

Cuarenta y ocho ratas hembra de la cepa Wistar fueron anestesiadas con 1 ml de una mezcla de: solución salina 60%, Ketamina 25%, Maleato de Acepromacina 10%, Hidrocloruro de Xilazina 5% administrada intraperitonealmente. Una vez anestesiadas, las ratas fueron sometidas a una cirugía esterotáxica donde se les implantó una cánula guía (23 gauge, 10 mm de longitud) de acero inoxidable dirigida al ventrículo lateral izquierdo (P:-0.8, L: 1.5, V:-3.8) (Paxinos G. y Watson C. 1986). Adicionalmente se les implantó un electrodo bipolar dirigido al hipocampo derecho (P - 4.0, L - 2.5, V -2.5) (Paxinos G. y Watson C. 1986) para el registro del electroencefalograma (EEG), se implantaron dos electrodos en los músculos del cuello para el registro electromiográfico (EMG) y un electrodo en el hueso frontal del cráneo utilizado como "tierra". Se les permitió recuperarse por diez días posteriores a la cirugía. Después de la recuperación las ratas se dividieron aleatoriamente en doce grupos de la siguiente manera:



3. 3 Fármacos

Las soluciones administradas en un volumen de 5 µl son las siguientes:

Vehículo
5% etanol, 95% solución salina

Anandamida
2µg de arachidoniletanolamida
en vehículo
5.7nmoles

Oleamida
25µg cis-9,10-octadecenoamida
en vehículo
88nmoles

Se emplearon estas dosis porque se ha observado con trabajos realizados por nuestro laboratorio, a través de curvas dosis respuesta, que 2 µg de ANA incrementan el SOL y el sMOR, mientras que 25 µg de OLE inducen aumento del SOL en machos (Datos no publicados).

Los dos endocannabinoides fueron fabricados por la casa comercial Sigma Aldrich, St. Louis MO. USA

3. 4 Registros Electroencefalográficos

Para observar cambios en la actividad cerebral inducida por la administración de los fármacos antes mencionados se hicieron registros electroencefalográficos en las ratas.

Los registros se realizaron en una habitación sonoamortiguada, con cámaras de registro individuales. La señal se registró a través de un polígrafo digital (Nihon Kohden, Neurotop MMe 3116k) que lleva la señal a una computadora y que la almacena con el software Icelus Gsystems). Los filtros usados para el EEG fueron para baja frecuencia (LF, por sus siglas en inglés) 1Hz y para alta frecuencia (HF, por sus siglas en inglés) 35 Hz y los filtros utilizados para el EMG fueron LF 30 Hz y HF 100 Hz. Los registros de EEG se calificaron visualmente en épocas de 12 segundos. Para calificar los registros hechos, se tomaron en cuenta tres estados de actividad que fueron vigilia, SOL y sueño MOR, de la misma forma se tomaron en cuenta las latencias al SOL y al sueño MOR, la frecuencia, distribución y duración promedios de cada una de los estados mencionados.

Se hicieron dos registros de EEG de 12 horas cada uno. Sin embargo, sólo se presentan los resultados de las primeras doce horas, debido a que fue donde se encontraron diferencias significativas. Las ratas se habituaron al sistema de registro 24 horas continuas antes de cada registro.

1. 5 Toma de muestra para determinar la fase del ciclo estral.

Se realizó un frotis vaginal raspando suavemente el epitelio vaginal con una asa con un ovillo, a la cual previamente se le colocó una gota de salina para facilitar la recolección del tejido epitelial. Dicha colecta celular se analizó bajo el microscopio evaluando la incidencia de diferentes tipos celulares. En este frotis se observaron las células que se desprendieron del epitelio, en el proestro se observan células epiteliales nucleadas, el estro se caracteriza por presentar exclusivamente células cornificadas anucleadas, en el metaestro se observa la misma proporción entre células cornificadas y linfocitos, en el diestro sólo se encuentran linfocitos (Schwierin B. *et al.* 1998).

3. 6 Procedimiento

Administración de Fármacos

Las ratas fueron divididas en cuatro grupos dependiendo de la fase del ciclo estral en el que se encontraran (diestro, proestro, estro y metaestro) y se administraron con el tratamiento correspondiente de manera intracerebro-

ventricular (i.c.v.) a través de la cánula guía con una bomba de infusión (KDscientific) a una velocidad de 1 μ l/minuto, esto posterior a la determinación de la fase del ciclo estral en el que se encontraba. Dicho procedimiento fue realizado al inicio de la fase de luz.

A continuación, fueron colocadas en la cámara sonoamortiguada y se dio inicio al registro el cual constó de dos recolecciones de doce horas cada una. Una nos permitió evaluar la actividad eléctrica de la rata en la fase de luz y la otra en la fase de oscuridad.

Al finalizar el registro, se realizó nuevamente la determinación de la fase del ciclo estral para corroborar la permanencia en ese estado.

Sólo fueron consideradas para este estudio las ratas que se les verificó la posición correcta de la cánula guía en el ventrículo lateral, a través de la administración de tinta china para teñir los ventrículos, y que hayan permanecido en la misma fase del ciclo estral.



Figura 4.2. Prueba de posición correcta de la cánula. Fotografía donde se observan los ventrículos y algunos núcleos adyacentes teñidos de tinta china.

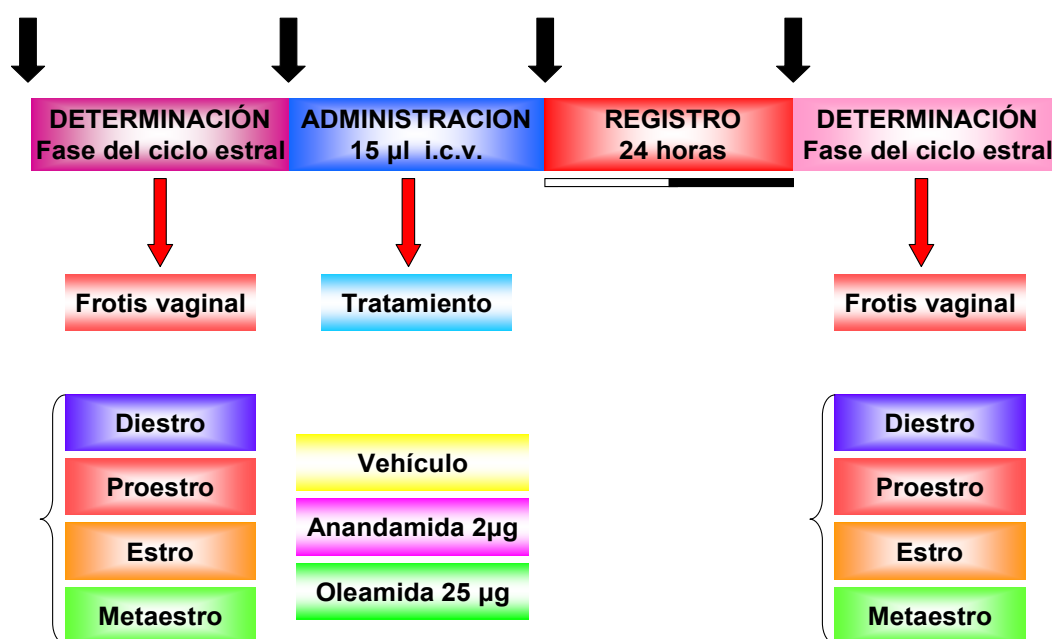


Figura 3. 1. Metodología experimental. Primero se determina la fase del ciclo estral por medio de un frotis vaginal, a continuación se administra el fármaco asignado aleatoriamente en un volumen de 5 µl y al finalizar la administración, se comienza el registro electroencefalográfico por 24h. Al terminar el registro se toma nuevamente una muestra del epitelio vaginal para verificar la permanencia en la misma fase estral y se realiza la verificación de la posición correcta de la cánula guía.

3. 7 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se empleó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, y un análisis post-hoc de Fisher para determinar la existencia de diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$).

Las comparaciones entre los grupos se realizaron de la siguiente manera:

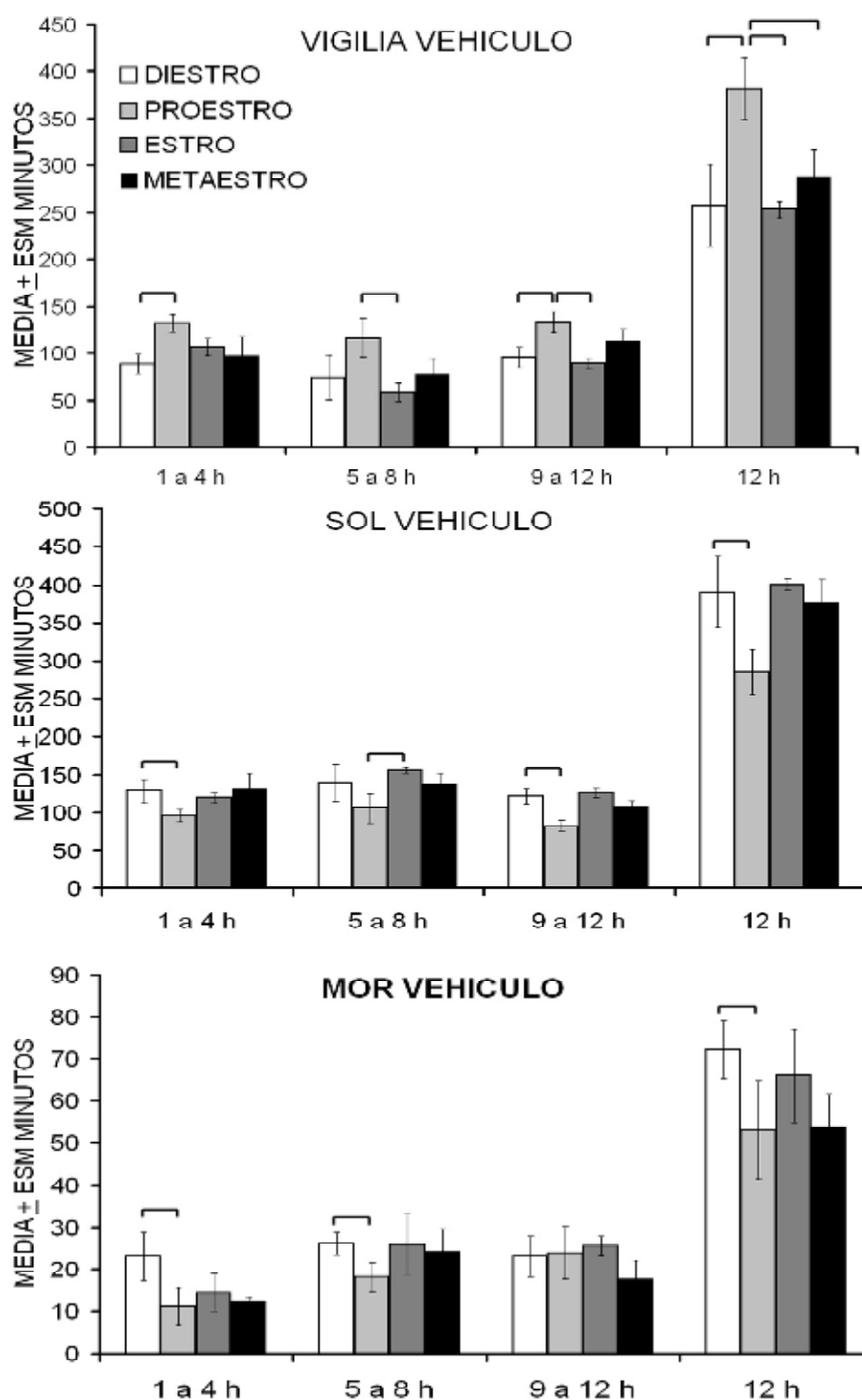
En el grupo control administrado con vehículo, se compararon las cuatro fases del ciclo estral entre ellas.

En los tratamientos con Anandamida y Oleamida cada fase del ciclo estral fue comparada con la fase del ciclo correspondiente administrada con vehículo.

4. RESULTADOS

Los resultados correspondientes al tiempo total en que los sujetos permanecieron en vigilia, SOL y sMOR durante las primeras doce horas después de la administración del tratamiento farmacológico, se muestran graficados en la gráfica 4.1 (media \pm error estándar). Los datos están organizados con la finalidad de apreciar la arquitectura natural del ciclo sueño-vigilia, influida únicamente por el ciclo estral. Los corchetes denotan contra que grupo es la diferencia significativa.

En la gráfica 4.1 se aprecia que durante el proestro, de manera natural existe un aumento de la vigilia comparado con el diestro en las primeras cuatro horas del registro; en el segundo bloque de cuatro horas, la vigilia aumenta comparada con la fase del estro y en el último bloque de cuatro horas, la vigilia aumenta en el proestro comparado con las fases del diestro y el estro; de esta manera, al final de las doce horas de registro, existe un incremento significativo de la vigilia en el proestro comparado contra todas las demás fases del ciclo estral ($p < 0.05$). Por otra parte, el SOL disminuye en el proestro en las primeras cuatro horas del registro comparado con el diestro, en el segundo bloque de cuatro horas, el SOL disminuye comparado con el estro, sin tener cambios en las últimas cuatro horas y en el total de las doce horas el SOL disminuye en comparación al diestro ($p < 0.05$). Además, el sMOR disminuye en el proestro comparado con el diestro en las primeras ocho horas de registro y esta diferencia permanece significativa en el total de las doce horas de registro ($p < 0.05$).



Gráfica 4. 1. Cambios en la arquitectura del ciclo sueño-vigilia en las ratas hembra a lo largo del ciclo estral de la rata. Tiempo total que los sujetos transitan en vigilia, SOL y sMOR. Los datos se presentan en minutos (media \pm error estándar) en tres bloques de cuatro horas y la suma total para las doce horas posteriores a la administración del vehículo. Existe un aumento del tiempo en vigilia del grupo proestro ($n=4$) comparado con el grupo diestro ($n=4$) efecto que se repite en el tercer bloque y permanece al término de las doce horas. En el proestro disminuye la cantidad de SOL y de sMOR ($p < 0.05$).

4.1. RESULTADOS: VIGILIA

Los efectos ejercidos por la administración de 2µg de ANA y 25µg de OLE sobre el ciclo sueño-vigilia se presentan en la gráfica 4.2, donde se observa el tiempo total en minutos que los sujetos transitan en vigilia. Los datos se presentan en minutos (media \pm error estándar) y los asteriscos indican que la diferencia significativa del grupo farmacológico es contra el grupo control de la misma fase estral. Los corchetes denotan que la diferencia significativa de un grupo farmacológico es contra el otro grupo farmacológico y los datos se aprecian en tres bloques de cuatro horas y la suma total para las primeras doce horas posteriores a la administración del tratamiento correspondiente, en el período de luz.

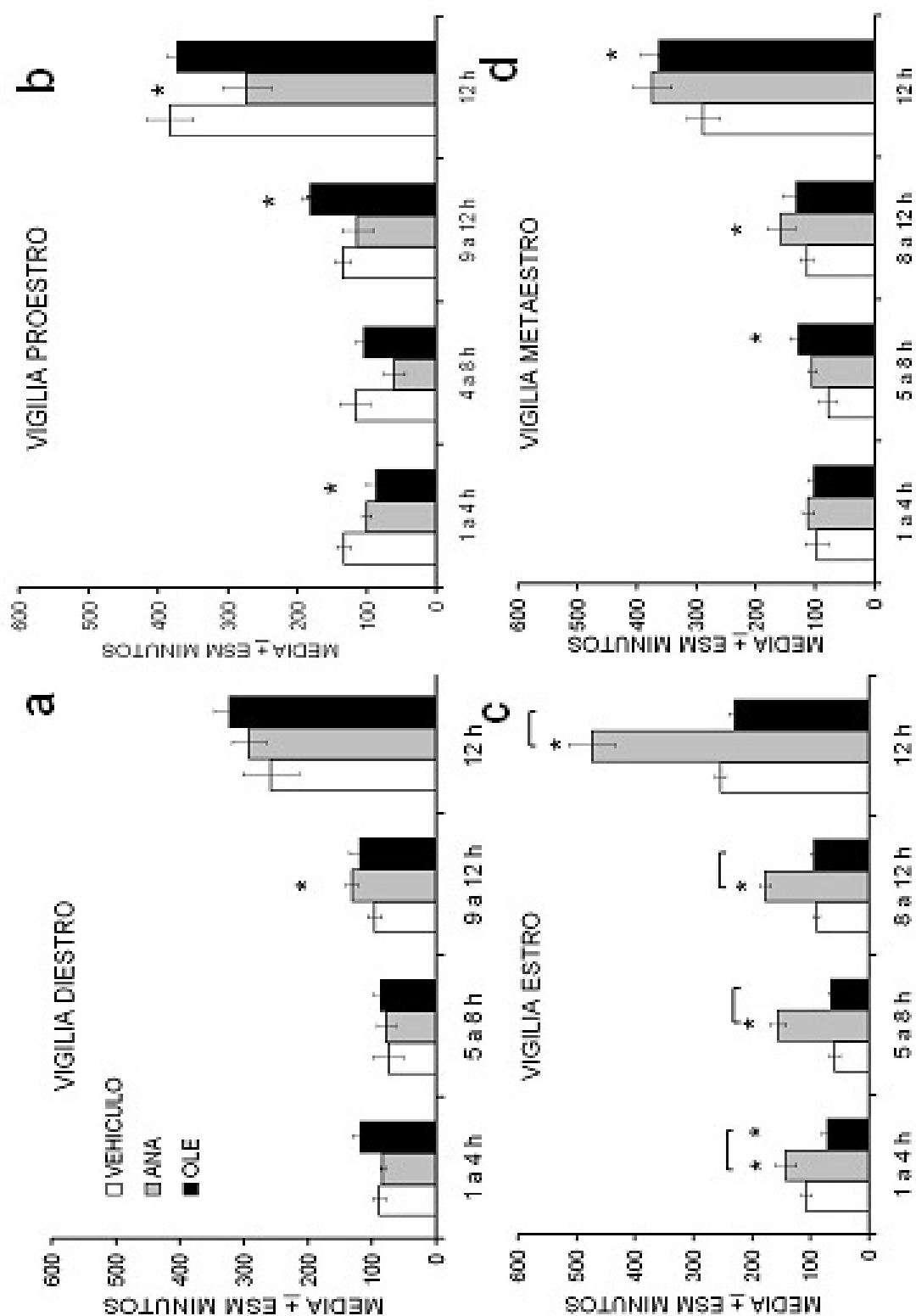
En el recuadro a) se observa el diestro, en donde la administración de 2µg de ANA aumenta significativamente la vigilia en comparación al vehículo en las últimas cuatro horas de la fase de luz ($p < 0.05$).

Además, el análisis también reveló que hay una disminución significativa del tiempo que los sujetos se mantienen en vigilia en la fase de proestro con la administración de 25µg de OLE respecto del grupo control que fue administrado con vehículo en las primeras cuatro horas del registro ($n=4$) ($p < 0.05$). Sin embargo, en las últimas cuatro horas del registro hay un incremento significativo del tiempo que los sujetos pasan en vigilia, sin que alcance una diferencia significativa en el total de las doce horas del registro en la fase de luz ($p < 0.05$). Mientras, que con la administración de 2µg de ANA se observó una disminución significativa del tiempo que los sujetos transitan por la

vigilia en el total de las doce horas del registro en la fase de luz, ($p < 0.05$) (ver recuadro b).

Por otra parte, en el recuadro c) se observa que la administración de ANA en el estro, aumenta significativamente la vigilia a lo largo de las doce horas posteriores a su administración, manteniéndose significativo en el total de doce horas ($n=4$) ($p < 0.05$). Asimismo, en el recuadro c) también se puede apreciar que la vigilia disminuye significativamente en el estro con la administración de OLE en las primeras cuatro horas del registro ($p < 0.05$) ($n=4$).

Adicionalmente, en el recuadro d) se puede observar que la administración de OLE incrementa la vigilia de la quinta a la octava hora del registro, alcanzando una diferencia significativa respecto al grupo control, administrado con vehículo, en el total de las doce horas del registro. Además, la administración de ANA aumenta la vigilia en las últimas cuatro horas del registro.



Gráfica 4.2. Efectos de ANA 2 µg y OLE 25 µg sobre el tiempo que los sujetos transitan en vigilia en cada fase del ciclo estral. Los datos se presentan en minutos (media ± error estándar) en tres bloques de cuatro horas y la suma total para las doce horas posteriores a la administración del tratamiento correspondiente. En el recuadro a) se puede apreciar los efectos de los tratamientos en diestro. En el panel d) se observan los efectos de ANA y OLE en el proestro. Los efectos en la fase de estro se aprecian en el recuadro c) y finalmente los efectos sobre la fase de metaestro se observan en el recuadro d).

4. 2. RESULTADOS: SUEÑO DE ONDAS LENTAS

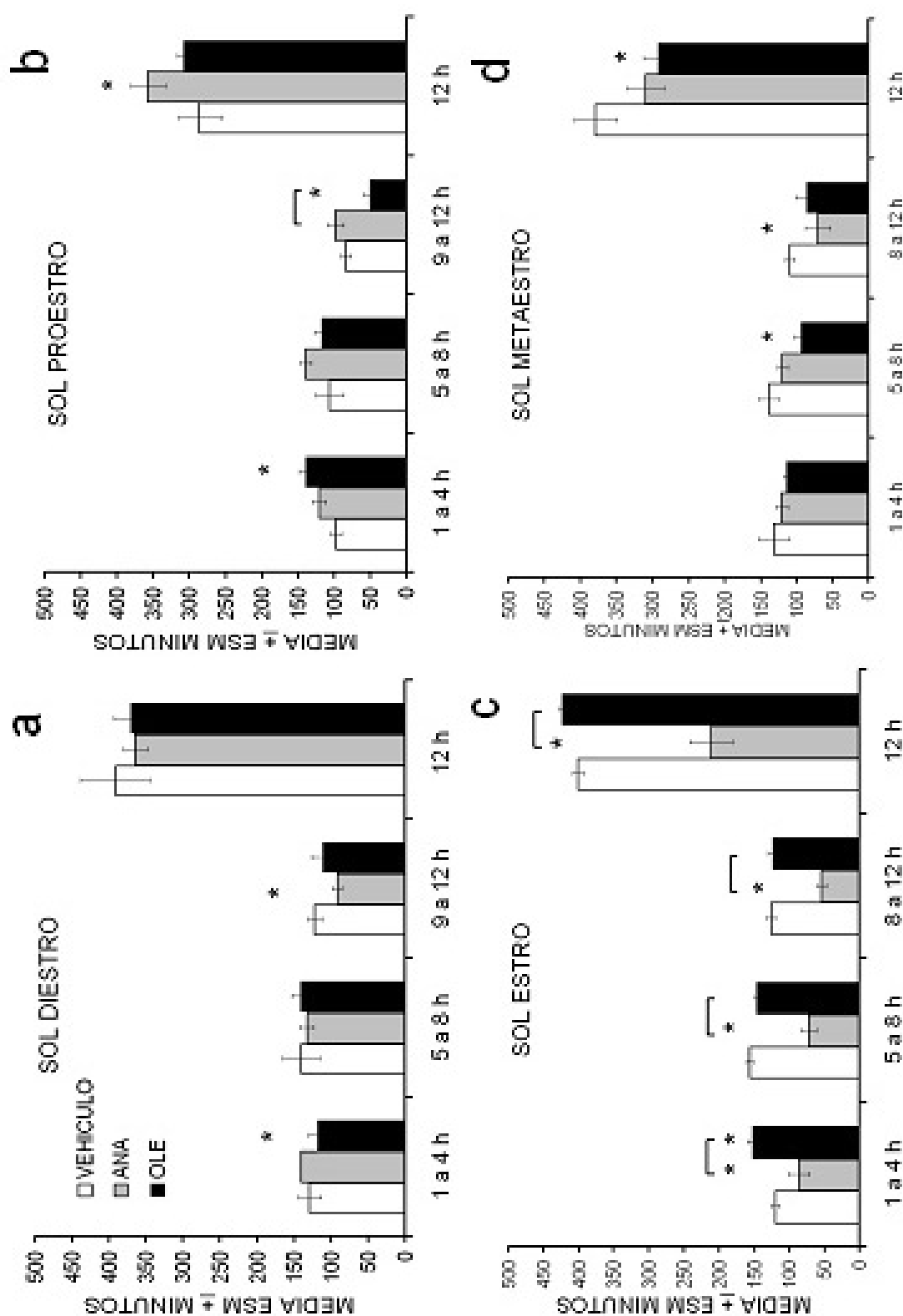
Los resultados obtenidos en la medición del tiempo total en el que los sujetos transitan por el SOL se muestran en la gráfica 4. 3. Los datos se presentan en minutos (media \pm error estándar) y se organizaron en tres bloques de cuatro horas y la suma total para las primeras doce horas de registro, posteriores a la administración del tratamiento correspondiente en la fase de luz. Los asteriscos indican que la diferencia significativa del grupo farmacológico es contra el grupo control de la misma fase estral. Los corchetes denotan que la diferencia significativa de un grupo farmacológico es contra el otro grupo farmacológico.

En el recuadro a) se observa el efecto de los tratamientos con los endocannabinoides en el diestro. En esta fase estral se observa una disminución del SOL con la administración de 25 μ g de OLE en las primeras cuatro horas del registro y con la administración de 2 μ g de ANA se observa una disminución del tiempo que los sujetos pasan en SOL en las últimas cuatro horas del registro en la fase de luz (n=4) ($p<0.05$).

En el recuadro b) se aprecia la fase estral del proestro. En las primeras cuatro horas de la fase de luz se observa un incremento del SOL con la administración de 25 μ g de OLE ($p<0.05$). Sin embargo, en el último bloque la administración de OLE induce una disminución del SOL ($p<0.05$). Por otra parte, la administración de 2 μ g de ANA induce un aumento del SOL en la suma de las doce horas que componen la fase de luz ($p<0.05$).

En el recuadro c) se puede apreciar los efectos que ejercieron los endocannabinoides sobre el estro. En el primer bloque se observa que la administración de 2µg de ANA disminuye el SOL y que por el contrario la administración de 25µg de OLE incrementa el SOL ($p<0.05$). El efecto ejercido por la administración de 2µg de ANA permanece en el segundo y tercer bloque. De esta manera, el efecto que induce ANA perdura en la suma total de las doce horas de la fase de luz ($p<0.05$).

La fase estral del metaestro se muestra en el recuadro d) en donde los efectos ejercidos por los endocannabinoides se pueden observar a partir del segundo bloque de cuatro horas, en el que la administración de 25µg de OLE disminuye el tiempo que los sujetos transitan en SOL ($p<0.05$); por otra parte, en el tercer bloque se muestra que la administración de 2µg de ANA disminuye el SOL. En la suma de las doce horas de la fase de luz, la disminución del SOL inducido por la administración de 25µg de OLE es significativa.



Gráfica 4.4. El efecto de la administración de los endocannabinoides Anandamida y Oleamida sobre el tiempo total que los sujetos transitan en sueño de ondas lentas. Los datos se presentan en minutos (media \pm error estándar) en tres bloques de cuatro horas y la suma total para las doce horas posteriores a la administración del tratamiento correspondiente. En el recuadro a) se observan los efectos de ANA y OLE en el diestro ($n=4$), en el recuadro b) se aprecian los efectos de los endocannabinoides sobre el proestro. En el recuadro c) se aprecian los efectos de ANA y OLE en el estro y en el recuadro d) el efecto de los endocannabinoides en el metaestro.

4.3. RESULTADOS: SUEÑO DE MOVIMIENTOS OCULARES RÁPIDOS (sMOR)

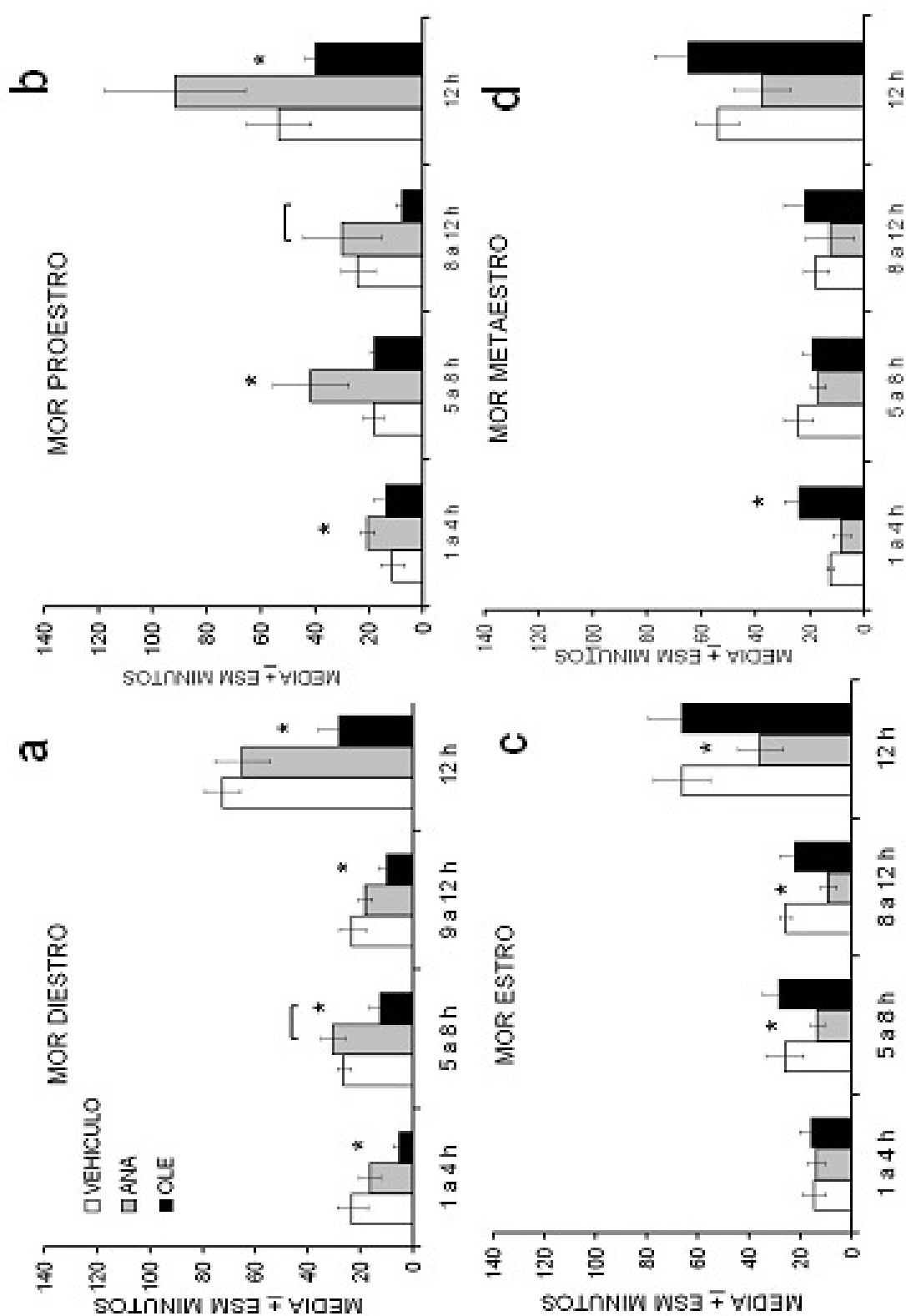
Los resultados obtenidos a través del tiempo total que los sujetos transitan por el sueño MOR se exhiben en la gráfica 4.4. Los datos se exponen en minutos (media \pm error estándar) en tres bloques de cuatro horas y la suma total para las primeras doce horas de registro posteriores a la administración del tratamiento correspondiente, en el período de luz.

En el recuadro a) se puede apreciar que con la administración 25 μ g de OLE el sMOR disminuye, dicho efecto permanece en los siguientes bloques de cuatro horas y en la suma total de las doce horas de la fase de luz. ($p < 0.05$).

En el recuadro b) se observan los resultados obtenidos en la fase de proestro, en el que se incrementó la cantidad de sMOR con la administración de 2 μ g de Anandamida dicho efecto se mantiene en las primeras ocho horas. Por otra parte, la administración de 25 μ g de OLE disminuye significativamente el sMOR en esta misma fase estral en el total de las doce horas de la fase de luz.

En el recuadro c) la administración de 2 μ g de Anandamida induce una disminución del sMOR en el segundo bloque y en las últimas cuatro horas ($p < 0.05$), por lo que tal efecto se sostiene en el total de las doce horas de la fase de luz ($p < 0.05$).

Finalmente, el efecto ejercido durante el metaestro se puede apreciar en el recuadro d), en el que la administración de 25µg de OLE aumenta el sMOR en las primeras cuatro horas de la fase de luz.



Gráfica 4.4. El efecto de la administración de los endocannabinoides Anandamida y Oleamida sobre el tiempo total de sueño MOR en cada una de las fases del ciclo estral. Los datos se presentan en minutos (media ± error estándar) en tres bloques de cuatro horas y la suma total para las doce horas posteriores a la administración del tratamiento correspondiente. En el recuadro a) se observa el efecto de los endocannabinoides sobre la fase del diestro, en el recuadro b) se aprecia el efecto ejercido por ANA y OLE en el proestro. En el recuadro c) y d) se aprecia el efecto ejercido por los endocannabinoides en el estro y metaestro respectivamente.

5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

5. 1. Discusión

Los resultados indican que la arquitectura del ciclo sueño-vigilia es diferente a lo largo del ciclo estral en la rata. Por tanto, dichas diferencias podrían estar relacionadas con las hormonas sexuales, en especial con el estrógeno, que parece tener una influencia inhibitoria sobre el SOL y el sMOR.

De manera natural, es decir, sin administración de fármacos, se observó que sólo en la fase estral de proestro, la vigilia aumenta y el sMOR se reducen, tales efectos fueron observados por Fang y colaboradores (Fang J. y Fishbein W. 1996). Sin embargo, ningún trabajo previo había reportado la disminución del SOL durante el proestro. Durante esta fase, la concentración de estrógeno aumenta y presenta un pico de concentración varias horas antes de que comience el periodo de oscuridad. Los niveles de estrógeno durante el proestro son más altos que en cualquiera de las otras fases del ciclo estral (Schwartz N. B. (2000). Por lo tanto, es probable que las fluctuaciones de estrógeno modulen los cambios en el SOL y el sMOR a lo largo del ciclo estral.

Aún no es claro como el estrógeno disminuye el SOL y el sMOR durante el proestro, una posible explicación es la variación del ER a lo largo del ciclo estral. Por ejemplo, en 1992 Shughrue y colaboradores mediante un estudio de hibridación *in situ* exploraron las áreas cerebrales que expresaban tanto el ER- α como el ER- β y demostró que se encuentran ampliamente distribuidos en el hipotálamo, en el APO, en el tallo cerebral y en el tálamo (Shughrue P. J. *et al.* 1992). Además, en el área preóptica la cantidad de ARNm del ER varía con el

ciclo estral, por lo que el estrógeno puede afectar áreas involucradas en la regulación del ciclo sueño-vigilia.

Además, se detectó que el ARNm del ER es mayor en el estro y en el metaestro, y se observó atenuado en el diestro y la señal más baja se registró en el proestro (Shughrue P. J. *et al.* 1992). Estos antecedentes sugieren que el aumento en los niveles de estrógeno circulante reduce los niveles de ARNm para el ER en ciertas regiones cerebrales de las hembras. Por lo tanto, el APO muestra que los cambios en el ARNm y por consiguiente en la expresión del receptor ER pueden estar determinados por los niveles de estrógeno en esta región cerebral (ver Shughrue P. J. *et al.* 1992).

Recordemos que el APO en su región ventrolateral, es decir el VLPO, promueve el SOL y como la expresión de ER disminuye con el aumento en los niveles de estrógeno circulante, la actividad neuronal de este núcleo disminuye en el proestro. Consistentemente, se ha mostrado que utilizando el c-fos, como un marcador de actividad neuronal, el VLPO disminuye su actividad durante el proestro (Peterfi Z. *et al.* 2004).

Por lo tanto, las variaciones en el ER debidas a la concentración de sus ligando produce una regulación a la baja del mismo, dando como resultado diferencias en la función de las áreas que se encuentran sujetas a las variaciones del ER y por consiguiente diferencias en las conductas o estados en los que dichas áreas están involucradas, como el hipotálamo, en su región lateral promotor de la vigilia y el VLPO promotor del SOL.

Por otra parte, la dopamina es un neurotransmisor que también está involucrado en la promoción de la vigilia, como parte del ARAS. A pesar de que los estudios citados a continuación no fueron realizados en la vIPAG, existe una variación dependiente del ciclo estral en la concentración y en la liberación de dopamina en el estriado y en el núcleo Accumbens de roedores. El estrógeno actúa en ambos núcleos, a través de los receptores membranales acoplados a una proteína G, para reforzar la liberación de dopamina (Becker J. B. 1999).

Esto nos permite inferir que existe una variación en la concentración de dopamina en el ciclo estral, es decir, que existe un incremento en la liberación de dopamina cuando aumenta el nivel de concentración de estrógeno, lo que probablemente este promoviendo la vigilia en el proestro.

Adicionalmente, en un estudio realizado en el 2004 por Porkka-Heiskanen y colaboradores, se encontró que las concentraciones de las orexinas A y B en el hipotálamo de ratas jóvenes y con un ciclo estral normal, fueron más altas en el proestro que en el diestro. Por lo que se ha sugerido que el nivel elevado de orexina A puede contribuir al aumento en la interrupción del sueño en la fase del proestro, promoviendo la vigilia (Porkka-Heiskanen T. *et al.* 2004).

Nuestros resultados indican que la administración de ANA, disminuye la vigilia, aumentando el SOL y el sMOR en el proestro.

Una posible explicación a este efecto es que la afinidad por el receptor CB₁ es baja durante el proestro y la ANA circulante no es suficiente para inhibir la actividad del hipotálamo y por lo tanto disminuir la promoción de la vigilia. Con el aumento exógeno de ANA se incrementa la cantidad de ANA circulante y así las probabilidades de que la cascada de señalización intracelular se active para inhibir el hipotálamo y por lo tanto disminuir la cantidad de vigilia.

Además como se mencionó anteriormente, durante el proestro, el VLPO disminuye su actividad (Peterfi Z. *et al.* 2004) y es probable que el sistema canabinérgico mediante el silenciamiento de los núcleos promotores de la vigilia, induzca la activación del VLPO.

La tendencia del incremento del SOL inducido por la administración de ANA, ocurre desde las primeras horas del registro. Sin embargo, alcanza a ser significativo hasta el total de las doce horas, lo que indica que la cantidad de ANA es suficiente para bloquear los efectos del estrógeno, el cual tiene un pico de concentración durante esta fase.

El aumento de sMOR inducido por la administración de ANA, se mantiene por las primeras ocho horas de la fase de luz. El mecanismo de regulación del sMOR es distinto al del SOL. Sin embargo, es probable que al activarse el receptor CB₁ por la ANA circulante en el hipotálamo, se disminuya la promoción de la vigilia y de esta forma se facilite la instalación del SOL y como consecuencia del mismo se promueva el sMOR, recordar que para transitar por el sMOR, es necesario haber transitado previamente por el SOL. Sin embargo,

aún se desconoce si el receptor CB₁ se distribuye en la VIPAG o en el LPT, ambas regiones inactivadoras del sMOR, las cuales al disminuir su actividad a través de la activación del receptor CB₁, podrían incrementar el sMOR. Lo que si podemos afirmar es que la administración central de ANA durante el proestro incrementa el sMOR.

Además, en esta misma fase estral, OLE disminuye la vigilia en las primeras cuatro horas del registro. Por el contrario, induce un aumento de la vigilia en las últimas cuatro horas, por lo que no mantiene una disminución constante de la vigilia y por tanto su efecto es distinto al de ANA. Dicho efecto, resulta en un incremento del SOL únicamente en las primeras cuatro horas de la fase de luz y complementariamente al efecto inducido durante la vigilia, en una disminución en las últimas cuatro horas del registro. Mientras que el aumento de la vigilia en las últimas cuatro horas del registro, resulta en una disminución del sMOR en las últimas cuatro horas de la fase de luz. Es probable que las diferencias en los efectos de estos dos endocannabinoides se deba a que la OLE, no sólo se une al receptor CB₁ sino a otros receptores, como a los serotoninérgicos en específico 5HT_{2A,C} y 5HT₇ y puede modular la actividad de los receptores a GABA (Mendelson W. B. *et al.* 2001) ejerciendo un efecto diferente al de ANA.

Durante el diestro, fase en la que se presenta un pequeño incremento del estrógeno, respecto al estro y metaestro; la administración de ANA aumenta la vigilia en las últimas cuatro horas de la fase de luz, lo que se ve reflejado en una disminución del SOL, sin afectar el MOR. Por otra parte, OLE disminuye el

sMOR a lo largo de toda la fase de la luz, debido al ligero aumento de la vigilia; sin embargo, este aumento no alcanza una diferencia significativa. Es probable que estos efectos sean distintos a los inducidos por ANA debido a que OLE no se une a otros receptores como a los 5HT_{2A,C} y 5HT₇ receptores serotoninérgicos y además puede modular la actividad de los receptores a GABA (Mendelson W. B. *et al.* 2001).

De manera natural en el estro, fase en la que los niveles de estrógeno son basales y ocurre la ovulación (Schwartz N. B.), existe un “rebote” de SOL a causa de la privación natural que ocurre durante el proestro (Fang J. y Fishbein W. 1996). Contrariamente a este aumento, la administración de ANA disminuye el SOL durante las doce horas de la fase de luz y disminuye el sMOR durante las últimas 8 horas del registro, este efecto es significativo por las doce horas de registro. Mientras que OLE aumenta el SOL las primeras cuatro horas, sin tener efectos sobre el sMOR.

Probablemente los efectos contrarios que ejerce ANA en el proestro y el estro se deban a que en el estro aumenta la concentración de LH y posteriormente aumentan los niveles de progesterona (Schwartz N. B. 2000) y hasta este momento se sabe que la afinidad por el receptor CB₁ disminuye en el estro. Sin embargo, se desconoce la cantidad de receptor CB₁ y la afinidad de OLE o de ANA por el mismo en las regiones involucradas en la regulación del ciclo sueño-vigilia a lo largo del ciclo estral. Por lo tanto una de las propuestas de este trabajo es evaluar la cantidad de receptor CB₁ y la afinidad de OLE y de ANA por el CB₁ durante las fases del ciclo estral.

Finalmente, en el metaestro, la administración tanto de ANA como de OLE disminuyen el SOL, la primera en las últimas cuatro horas y la segunda de la quinta a la octava hora de registro. Asimismo, la administración de OLE aumenta el sMOR en las primeras cuatro horas de la fase de luz. Sugiriendo que OLE puede estar actuando a través de otro receptor además del receptor CB₁ y que los efectos tanto de OLE como de ANA dependen de la estructura que estén afectando, es decir, como en el ocurre con el neurotransmisor clásico, Acetilcolina, depende la estructura que afecte, la resultante será una inhibición o excitación del sistema.

Con base a los resultados y a las necesidades de profundizar en el conocimiento del fenómeno descrito, proponemos en breve administrar el antagonista al receptor CB₁, el SR141716A para conocer si es a través de este receptor que ANA y OLE ejercen su acción.

De ser cierto, estaremos entonces proponiendo al sistema endocannabinérgico, como un sistema modulador de las diferencias en la arquitectura del ciclo sueño-vigilia en las ratas hembra asociados al ciclo estral.

Aunque estos hallazgos apuntan a que la administración de los endocannabinoides ANA y OLE pueden eliminar los efectos de las hormonas sexuales sobre el ciclo sueño-vigilia, aún quedan varios experimentos por realizar, los cuales nos permitirían observar de una manera más directa como interacciona el sistema cannabinérgico con las variaciones de las hormonas sexuales.

4.2. CONCLUSION

Los resultados del presente trabajo junto a los estudios realizados previamente, indican claramente que las hormonas sexuales están involucradas en la regulación del ciclo sueño-vigilia.

El ciclo sueño-vigilia puede estar modulado por la interacción entre el sistema canabinérgico y las hormonas sexuales.

Los endocannabinoides ANA y OLE, son mediadores de los cambios en la arquitectura del ciclo sueño-vigilia a lo largo del ciclo estral. Debido a que la administración central de ANA durante el proestro incrementa el SOL y el sMOR y en el estro disminuye el SOL y el sMOR, modificando la arquitectura del ciclo sueño-vigilia a lo largo del ciclo estral en ratas hembra.

6. 1. LECTURAS CITADAS

1. Brisbare-Roch C., Dingemase J., Koberstein R., Hoeber P., Aissaoui H., Flores S., Mueller C., Weller T., Fischli W., Cloze M., Jenk F. (2007) Promotion of sleep by targeting the orexin system in rats, dogs and humans. Nature Medicine: 13: 150-155.
2. Danguir J. (1986) Intracerebroventricular infusion of somatostatin selectively increases paradoxical sleep in rats. Brain Research 367:26-30.
3. De Lecea L., Criado J. R., Prospéro-García O., Gautvik K. M, Schweitzer P., Danielson P. E., Dunlop C. L., Siggins G. R., Henriksen S. J., Sutcliffe J. G. (1996) A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. Nature 381:242-245.
4. Drucker-Colín R. y Prospéro-García O. Neurophysiology of sleep en Handbook of Sleep Disorders. Editado por Michael Thorpy 1990. Editorial Marcel Dekker. Estados Unidos de América.
5. Eriksson K. S., Sergeeva O., Brown R. E. y Haas H. L. (2001) Orexin/Hypocretin excites the histaminergic neurons in the tuberomammillary nucleus. Journal of Neuroscience 21:9273-9279.
6. Fuller P. M., Gooley J. J. y Saper C. B. (2006) Neurobiology of the Sleep-Wake Cycle: Sleep Architecture, Circadian Regulation, and Regulatory feedback. Journal of Biological Rhythms, 21:482.
7. Fuller P. M., Saper C. B. y Lu J. (2007) The pontine REM switch: past and present. Journal of Physiology 584.3: 735-741.
8. Hernandez Peón R. (1965) Central Neuro-Humoral Transmission in Sleep and Wakefulness. Sleep Mechanisms Progress in Brain Research Volumen 18 Editores Akert, Bally y Schadé. Páginas 96-117.

9. Hobson J. A. (2005) Sleep is of the brain, by the brain and for the brain. Nature 437: 1254-1256.
10. Jones B. E. (2005) from waking to sleeping: neuronal and chemical substrates. Trends in pharmacological Sciences. 26:578-586.
11. Kandel E. R., Schwartz, J. H. y Jessell T. M. (2000) Principios de Neurociencias. McGraw-Hill Interamericana Capítulo 47 Páginas 936-947
12. Kápas L., Obál F. Jr., Alföldi P., Rubisek G., Penke B. y Obál F. (1988) Effects of nocturnal intraperitoneal administration of cholecystinin in rats: simultaneous increase in sleep, increase in EEG slow wave activity, reduction of motor activity, suppression of eating, and decrease in brain temperature. Brain Research 438:155-164.
13. Kocsis B. y Kaminsky M. 2006. Dynamyc changes in the direction of the theta rhythmic drive between supramamillary nucleus and the septohippocampal system. Hippocampus 16: 531-540.
14. Krueger J. M., Obál F. Jr, Fang J. (1999) Humoral regulation of physiological sleep: Cytokines and GHRH. Journal of Sleep Research Suplemento 8. 1:53-59.
15. Lu J., Greco M. A., Shiromani P. (2000) Effects of lesions of the ventrolateral preoptic nucleus on NREM and REM sleep. Journal of Neuroscience. 20: 3830-3842.
16. Lu J., Sherman D., Saper C. B. (2006a) A putative flip-flop switch for control of REM sleep. Nature 441:589-594.
17. Lu J., Jhou T. C. y Saper C. B. (2006b) Identification of wake-active dopaminergic neurons in the ventral periaqueductal gray matter. Journal of neuroscience. 26 193-202.

18. McCarley R. W. (2007) Neurobiology of REM and NREM sleep. Sleep Medicine 8:302-330.
19. Mendelson W. B., Jacobs L. S. y Gillin J. C. () Negative feedback suppression of sleep-related growth hormone secretion. The Journal of clinical endocrinology and Metabolism 56:486-488.
20. Miller D.B. & O'Callaghan P. (2006). The Pharmacology of Wakefulness. Metabolism Clinical and Experimental 55 (Suplemento 2)
21. Monnier M. y Hösli L. (1965) Humoral Regulation of Sleep and Wakefulness by Hypnogenic and Activating Dialysable Factors. En Sleep Mechanisms Progress in Brain Research Volumen 18 Editores Akert, Bally y Schadé. Elsevier publishing Company. Amsterdam, Londres, Nueva York.
22. Montes-Rodríguez J. C., Rueda-Orozco P. E., Arteaga-Urías E., Aguilar-Roblero R., Prospéro-García O. (2006) De la restauración neuronal a la reorganización de los circuitos neuronales: Una aproximación a las funciones del sueño. Revista de Neurología 43 (7):409-415.
23. Opp M. R. (2004) Cytokines and sleep: The first hundred years. Brain, Behavior and Immunity 18:295-297.
24. Pappenheimer J. R., Koski G., Fencel V., Karnovsky M. L. & Krueger J. (1975) Extraction of sleep-promoting factor S from cerebrospinal fluid and from brains of sleep-deprived animals. Journal of Neurophysiology 38: 6 1299.
25. Pedley T. A. and Traub R. D. (1990) Physiological Basis of the EEG Capítulo 5 del Libro: Current Practice of Clinical Electroencephalography, Segunda Edición. Raven Press, Ltd. Nueva York.

-
26. Peyron C., Tigre D. K., Van den Pol A. N., De Lecea L., Heller, J. G. Sutcliffe y Kilduff T. S. (1998) Neurons containing hypocretin (orexin) Project to multiple neuronal systems. Journal of Neuroscience 18: 9996-10015.
27. Prospéro-García O., Soria E., Rueda P. E., Huerta-Saquero A. (2004) Del placer y el placer a la Marihuana. Velásquez-Moctezuma J. *Temas selectos de Neurociencias III*. UAM. 305-319.
28. Rechtschaffen A, Gilliard M. A. Bergman B. M. y Winter J. B. (1983) Physiological correlates of prolonged sleep deprivation in rats. Science 221:182-184.
29. Riou F., Cespuglio R. y Jouvet M. (1981) Hypnogenic properties of the vasoactive intestinal polypeptide in rats. Comptes rendus des séances de l'Académie des sciences. Séries III 293:679-82.
30. Saper C. B., Chou T.C. y Scamell T.E. (2001) The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness. Trends in Neuroscience 24:12.
31. Saper C. B., Scamell T.E. y Lu J. (2005) Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. Nature 437:1257-1263.
32. Sherin J. E. Shiromani P. J. McCarley R. W. y Saper C. B. (1996) Activation of ventrolateral neurons during sleep. Science 271: 216-219.
33. Siegel J. (2004) Brain mechanisms that control sleep and waking Naturwissenschaften 91: 355-365
34. Siegel J. M. (2005) Clues to the functions of mammalian sleep. Nature 437: 1264-1271.

-
35. Steiger A. (2007) Neurochemical Regulation of sleep. Journal of Psychiatric Research 41:537-552.
36. Steriade M. y Timofeev I. (2003) Neuronal Plasticity in Thalamocortical networks during sleep and waking oscillations. Neuron 37:563-576.
37. Ueno R., Honda K., Inoué S. y Hayaishi O. (1983) Prostaglandin D2, a cerebral sleep-inducing substance in rats. National Academy of Sciences of the United States of America. 80:1735-1737.
38. Bisogno T., Ligresti A., Di Marzo V. (2005) The endocannabinoid signalling system: Biochemical aspects. Pharmacology, Biochemistry and Behavior 81: 224-238.
39. Cravatt B. F., Giant D. K., Mayfield S. P., Boger D. L., Lerner R. A. y Gilula N. B. (1996) Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. Nature 384:83-87.
40. Cravatt B. F. y Lichtman A. H. (2002) The enzymatic inactivation of the fatty acid amide class of signaling lipids. Chemistry and Physics of lipids 121:135-148.
41. Cravatt B. F., Prospéro-García O., Siuzdak G., Gilula N. B., Henriksen S. J., Boger D. L., Lerner R. A., (1995) Chemical characterization of a family of brain lipids that induce sleep. Science 268:1506-1509.
42. Devane W. A., Dysarz F. A.^{3rd} Johnson M., Melvin L. S., Howlett A. C. (1988) Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. Molecular Pharmacology 34:605-613.
43. Devane W. A., Hanus L., Breuer A. (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. Science 258: 1946-1949.

44. Di Marzo V., De Petrocellis L. (2006) Plant, synthetic and endogenous cannabinoids in Medicine. The Annual Review of Medicine 57: 553-574.
45. Di Marzo V., Fontana A., Cadas H., Schinelli S., Cimino G., Swartz J. C. (1994) Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. Nature 372:686-691.
46. Di Marzo V., Fontana A. (1995) Anandamide, an endogenous cannabinomimetic eicosanoid: 'killing two birds with one stone'. Prostaglandins, Leukocytes and Essential Fatty Acids. 53 (1):1-11.
47. Dinh T. P., Carpenter D., Leslie F. M., Freund T. F., Katona I., Sensi S. L., Kathuria S. y Piomelli D. (2002) Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 99:10819-10824.
48. Felder C. C., Joyce K. E., Briley E. M. (1998) LY320135 a novel cannabinoid CB₁ receptor antagonist, unmasks coupling of the CB₁ receptor to stimulation of cAMP accumulation. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 284:291-297.
49. Gebremedhin D., Lange A. R., Campbell W. B., Hilliard C. J. y Harder D. R. (1999) Cannabinoid CB₁ receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca²⁺ channel current. American Journal of Physiology 276:H2085-2093.
50. Gonsiorek W., Lunn C., Fan X., Narula S., Lundell D., Hipkin R. W. (2000) Endocannabinoid 2-arachidonyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: Antagonism by Anandamide. Molecular Pharmacology 57:1045-1050.

51. Hanus L., Abu-Lafi S., Fride E., Breuer A., Vogel Z., Shalev D.E., Kustanovich I., Mechoulam R. (2001) 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of cannabinoid CB1 receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98:3662-3665.
52. Hayaishi O. y Matsumara H. (1995) Prostaglandines and sleep. Advances Neuroimmunology 5:211-216.
53. Herkenham M., Lynn A. B., Johnson M. R., Melvin L. S., de Costa B. R. y Rice K. C. (1991) Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative *in vitro* autoradiographic study. Journal of Neuroscience 11:563-583.
54. Howlett A. C., Bidaut-Russell M., Devane W. A., Melvin L. S., Johnson M. R. y Herkenham M. (1990) The cannabinoid receptor: Biochemical anatomical and behavioral characterization. Trends in Neurosciences 13:420-423.
55. Jarai Z., Wagner J. A., Varga K., Lake K. D., Compton D. R., Martin B. R., (1999) Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB₁ y CB₂ receptors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96:14136-14141.
56. Kim J., Isokawa M., Ledent C. y Alger B. E. (2002) Activation of muscarinic acetylcholine receptors enhances the release of endogenous cannabinoids in the hippocampus. Journal of Neuroscience 22:10182-10191.

57. Leggett J. D., Aspley S., Becket S. R., D'Antona A. M., Kendall D. A. (2004) Oleamide is a selective endogenous agonist of rat and human CB1 cannabinoid receptors. British Journal of Pharmacology. 141:253-262.
58. Lorenzo P., Ladero J. M., Leza J. C., Lizasoain I. 2003. Drogodependencias: Farmacología, Patología, Psicología, Legislación. Cannabis (1) Farmacología Sección V capítulo 19. 2da. Edición Editorial Médica Panamericana Madrid. Páginas 263-283.
59. Mackie K. y Stella N. (2006) Cannabinoid receptors and endocannabinoids: Evidence for new players. The AAPS Journal 8:298-306.
60. Mackie K. y Hille B. (1992) Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89:3825-3829.
61. Maejima T., Ohno-Shosaku T. y Kano M. (2001) Endogenous cannabinoid as a retrograde messenger from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. Neuroscience Research 40:205-210.
62. Martínez-Vargas M., Murillo-Rodríguez E., González-Rivera R., Landa A., Méndez-Díaz M., Prospéro-García O. y Navarro L. (2003) Sleep modulates cannabinoid receptor 1 expression in the pons of rats. Neuroscience 117:197-201.
63. Matsuda L.A., Lolait S. J., Brownstein M. J., Young A. C., Bonner T.I. (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of cloned cDNA. Nature 346:561-564.

- 64.** Mechoulam R. y Gaoni Y. (1967) The absolute configuration of Δ -1 tetrahydrocannabinol, the major constituent of hashish. *Tetrahedron Letters* 12:1109-1111.
- 65.** Mechoulam R., Ben-Shabat S., Hanus L., Liguorsky M., Kaminski N. E., Schatz A. R., Gopher A., Almong S., Martin B. R., Compton B. R., Vogel Z. (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology* 50:83-90.
- 66.** Mendelson W. B. y Basile A. S. (2001) The hypnotic actions of the fatty acid amide, oleamide. *Neuropsychopharmacology* 25: s36-s39.
- 67.** Murillo-Rodríguez E., Cabeza R., Mendez-Díaz M., Navarro L., Prospéro-García O. (2001) Anandamide-induced sleep is blocked by SR 141716A, a CB1 receptor antagonist and by U73122, a phospholipase C inhibitor. *Neuroreport* 12: 2131-2136.
- 68.** Murillo-Rodríguez E., Blanco-Centurión C., Sánchez C., Piomelli D., Shiromani P. J. (2003) Anandamide enhances extracellular levels of adenosine and induces sleep: microdialysis study. *Sleep*.26: 943-947.
- 69.** Navarro L., Martínez-Vargas M., Murillo-Rodríguez E., Landa A., Méndez-Díaz M., Prospéro-García O. (2003) Potencial role of the cannabinoid receptor CB1 in rapid eye movement sleep rebound. *Neuroscience* 120:855-859.
- 70.** Pachér P., Batkai S., Kunos G. (2006) The endocannabinoid System as an Emerging Target of Pharmacotherapy. *Pharmacological Reviews* 58: 389-462.

71. Patricelli M. P. y Cravatt B. F. (2000) Clarifying the catalytic roles of conserved residues in the amidase signature family. Journal of Biological Chemistry 275:19177-19184.
72. Piomelli D. (2003) The molecular logic of endocannabinoid signaling. Nature Reviews 4:873-884.
73. Porter A. C., Sauer J. M., Knierman M. D., (2002) Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB₁ receptor. Journal of pharmacology and experimental therapeutics 301: 1020-1024.
74. Prospéro-García O., Soria E., Rueda P. E., Huerta-Saquero A. (2004) Del placer y el placer a la Marihuana. Velásquez-Moctezuma J. *Temas selectos de Neurociencias III*. UAM. 305-319.
75. Prospéro-García O., Murillo-Rodríguez E., Martínez-González D., Méndez-Díaz M., Velásquez-Moctezuma J., Navarro L (2001) Vegetal marijuana, animal marijuana. Salud Mental 24:58-64.
76. Rodríguez de Fonseca F., Del Arco I., Bermúdez-Silva F. J., Bilbao A., Cippitelli A., Navarro M. (2005) The endocannabinoid System: Physiology and pharmacology. Alcohol and alcoholism 40: 2- 14.
77. Selley D. E., Stark S., Sim L. J., Childers S.R. (1996) Cannabinoid receptor stimulation of guanosine-5'-O-(3-[S]Thio) triphosphate binding in rat brain membranes. Life Sciences 59: 659-668.
78. Sugiura T., Kondo S., Sukagawa A., Nekane S., Shinoda A., Itoh K., Yamashita A. y Waku K. (1995) 2-Arachidonoyl-glycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. Biochemistry Biophysics Research Communications 215:89-97.

79. Twitchell W., Brown S. y Mackie K. (1997) Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. Journal of Neurophysiology 78:43-50.
80. Van Sickle M. D., Duncan M., Kingsley P. J., Mouihate A., Urbani P., Mackie K., Stella N., Makriyannis A., Piomelli D., Davison J. S., Marnett L. J., Di Marzo V., Pittman Q. J., Patel K. D., Sharkey K.A. (2005) Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. Science 310: 329-332.
81. Varma N., Carlson G. C., Ledent C. y Alger B. E. (2001) Metabotropic glutamate receptors drive the endocannabinoid system in hippocampus. Journal of Neuroscience 21:1-5.
82. Wilson R. I. y Nicolli R. A. (2002) Endocannabinoid signaling in the brain. Science 296:678-682.
83. Antunes I. B., Andersen M. L., Bacarat E. C., Tufik S. (2006) The effects of paradoxical sleep deprivation on estrous cycles of female rats. Hormones and behavior 49: 433-440.
84. Becker J. B. (1999) Gender Differences in dopaminergic function in striatum and nucleus Accumbens. Pharmacology Biochemistry and Behavior 64:803-812.
85. Dzaja H. S., Arber S., Hislop J., Kerkhofs M., Kopp C., Pollmacher T., Polo-Kantola P., Skene D. J., Stenuit P., Tobler I., Porkka-Heiskanen (2005) Women's sleep in health and disease. Journal of Psychiatric Research. 39:55-76.

86. Fang J., Fishbein W. (1996) Sex differences in paradoxical sleep: influences of estrus cycle and ovariectomy. Brain Research 734: 275-285.
87. Gava N., Clarke C. L., Byth K., Arnett-Mansfield R. L. y Defazio A. (2004) Expression of progesterone receptors A and B in the mouse ovary during the estrous cycle. Endocrinology 145:3487-3494.
88. Gonzalez B., Bisogno T., Wenger T., Manzanares J., Milone A., Berrendero F., Di Marzo V., Ramos J. A. y Fernandez-Ruiz J. (2000) Sex steroid influence of cannabinoid CB₁ receptor mRNA and endocannabinoid levels in the anterior pituitary gland. Biochemical and Biophysical Research Communications 270:260-266.
89. Kimura D. (1996) Sex, sexual orientation and sex hormones influence human cognitive function. Current Opinion in Neurobiology. 6:259-263.
90. Kuiper G. G. J. M., Carlsson B., Grandien K., Enmark E., Haggblab J., Nilsson S. y Gustafsson J. A. (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . Endocrinology 138: 863-870.
91. McEwen B. S. (2001) Genome and hormones: Gender differences in physiology. Invited Review: Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. Journal of Applied Physiology 91:2785-2801.
92. Mize A. L. y Alper R.H. (2000) Acute and long-terms effects of 17 β -estradiol on G_{i/o} coupled neurotransmitter receptor function in the female rat brain as assessed by agonist-stimulated [³⁵S] GTP γ S binding. Brain Research 859:326-333.

93. Peterfi Z., Churchill L., Hajdu I., Obal F Jr., Krueger J. M. y Parducz A. (2004) Fos-immunoreactivity in the hypothalamus: dependency on the diurnal rhythm, sleep, gender, and estrogen. Neuroscience 124: 695-707.
94. Porkka-Heiskanen T., Kalinchuck A., Alanko L. Huhtaniemi I. y Stenberg D. (2004) Orexin A and B levels in the hypothalamus of female rats: the effects of the estrous cycle and age. European Journal of Endocrinology 150:737:742.
95. Rodríguez de Fonseca F., Cebeira M., Ramos J. A., Martín M., Fernández-Ruiz J. J. (1994) Cannabinoid receptors in rat brain areas: sexual differences, fluctuations during estrous cycle and changes after gonadectomy and sex steroid replacement. Life Sciences 54:159-170.
96. Sá S. I. y Madeira M. D. (2005) Estrogen modulates the sexually dimorphic synaptic connectivity of the ventromedial nucleus. The Journal of Comparative Neurology 484:68-79.
97. Schwartz N. B. (2000) Neuroendocrine Regulation of reproductive Cyclicity. Capítulo 8. En: Neuroendocrinology in physiology and medicine. Conn P. M. y Freeman M. E. (Editores) Human Press Totowa Nueva Jersey. 135-145.
98. Schwierin B., Borbély A. A., Tobler I. (1998) Sleep homeostasis in the female rat during the estrous cycle. Brain Research 811: 96-104.
99. Shughrue P. J., Lane M. V. y Merchenthaler I. (1997) Comparative distribution of estrogen receptor α y β mRNA in the rat central nervous system. The Journal of Comparative Neurology 388:507-525.
100. Shughrue P. J., Bushnell C. D., Dorsa D. M. (1992) Estrogen Receptor Messenger Ribonucleic Acid in the female rat brain during the

estrous cycle: A comparison with ovariectomized females and intact males. Endocrinology 131:381-388.

- 101.** Paxinos G. y Watson C. (1986) The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press San Diego California.