



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN SUBCRÓNICA DE LOS ENDOCANABINOIDES ANANDAMIDA Y OLEAMIDA SOBRE EL SUEÑO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS
P R E S E N T A:
MÓNICA ANDREA HERRERA SOLÍS

Jurado:

Dr. José Bargas Díaz

Dr. Oscar Próspero García

Dra. María de la Luz Navarro Angulo

Dr. Reyes Haro Valencia

Dra. Milagros Méndez Ubach

Comité Tutorial:

Dr. Oscar Próspero García

Dra. Ana María López Colomé

Dr. Javier Velázquez Moctezuma



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México mi "*Alma Mater*", ha sido un gran privilegio y orgullo poder formarme en la mejor Universidad de América Latina.

A todo el Grupo de Neurociencias que dirige el Dr. Oscar Prospéro García y a la Facultad de Medicina por su apoyo para mi formación académica.

A mis cotutores presentes también en mi desarrollo académico: Dr. José María Calvo y Otálora[†], Dra. Ana María López Colomé y Dr. Javier Velázquez Moctezuma.

A los revisores de esta tesis por sus sugerencias y críticas: Dr. Oscar Prospéro García, Dr. José Bargas Díaz, Dra. María de la Luz Navarro Angulo, Dr. Reyes Haro Valencia y Dra. Milagros Méndez Ubach.

Al Doctorado en Ciencias Biomédicas, a todos sus profesores y destacados investigadores.

Los trabajos presentados en esta tesis se realizaron gracias al apoyo otorgado por el donativo 24768 del CONACyT a OPG y a la beca doctoral del CONACyT otorgada a Mónica Andrea Herrera Solís.

DEDICATORIAS

A mi abuela, Teófila Niño Lomelí[†], la mujer más maravillosa que he conocido en la vida. A la cual le dedico todos mis logros porque le debo y agradezco todo lo que soy. Siempre vivirás en mi.

A mi amado Sergio Broseta. Gracias por hacerme tan feliz, por todo tu amor y apoyo, pero sobre todo por compartir la vida conmigo y por el futuro que nos espera.

A Yadira, Ramón y Aurora por su apoyo y amor incondicional sin ustedes no lo habría logrado. No tengo palabras para agradecerles todo lo que han hecho por mí y todo lo que los quiero.

A Emi, Santi y Luis que son un orgullo y alegría, espero que logren todo lo que desean en la vida.

A toda mi familia, mi padre, mi hermana, sobrinos, en fin, a todos porque no los podría acabar de nombrar.

A Wendy Herrera, más que amigas hermanas. Gracias por el apoyo que siempre me has dado y por el cariño sincero, sabes que es bien correspondido.

A Manuel y Memo del Taller de la Facultad de Medicina, por su ingenio, trabajo y amistad.

A todos mis amigos y compañeros, de cada uno de ustedes he aprendido algo, los quiero y les agradezco.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	2
1. Sueño.....	2
1.1 Historia y características del sueño.....	2
1.2 Neuroanatomía y Neuroquímica.....	8
2. Canabinoides.....	24
2.1 La planta de la Marihuana.....	24
2.2 Historia y uso de la Marihuana.....	28
2.3 Sistema canabinérgico.....	31
3. Sueño y Canabinoides.....	45
Planteamiento del problema.....	50
Hipótesis.....	51
Método.....	52
Resultados.....	60
Discusión y Conclusión.....	77
Referencias.....	84
Artículo Anexo	

RESUMEN

Anandamida y oleamida son dos endocannabinoides que inducen sueño cuando son administrados de forma aguda. Sin embargo, aun no se ha probado cuáles son sus efectos bajo una administración subcrónica. Esto nos permite mostrar si se genera tolerancia y si la retirada repentina de la administración de estos endocannabinoides afecta negativamente el sueño. Con este fin, se evaluó el ciclo sueño-vigilia de ratas durante 24 horas, bajo los efectos de la administración aguda o subcrónica de estos endocannabinoides y durante la abstinencia súbita de ellos. También se utilizó AM251, un antagonista al receptor a cannabinoides 1, para bloquear los efectos de los endocannabinoides administrados. Nuestros resultados indican que tanto la administración aguda como la subcrónica aumentan el sueño de movimientos oculares rápidos. Y que durante la abstinencia de los endocannabinoides, las ratas no presentan síndrome de abstinencia. Además, el AM251, resultó eficaz para prevenir el aumento de sueño de movimientos oculares rápidos independientemente del tipo de administración, aguda o subcrónica, lo que sugiere que este efecto en el sueño está mediado por el receptor a cannabinoides 1. Nuestros datos apoyan la función de los endocannabinoides en la regulación del SMOR.

INTRODUCCIÓN

1. SUEÑO

1.1 Historia y características del sueño

Comencemos por tratar de definir que es el sueño. El sueño es un estado fisiológico reversible en el cual se reduce importantemente la respuesta a los estímulos sensoriales y el tono muscular. Este se divide principalmente en sueño de movimientos oculares rápidos (MOR), también conocido como sueño paradójico o activo, y en sueño no MOR (NMOR) o sueño de ondas lentas.

El sueño no es exclusivo de los humanos. En los mamíferos también podemos encontrar tanto sueño MOR como NMOR. Incluso en otras especies, en los reptiles por ejemplo, aunque la actividad eléctrica cerebral del sueño es diferente a la de los mamíferos, se ha podido registrar sueño caracterizado por ondas de alto voltaje. En otros animales como los invertebrados, el sueño ha sido difícil de determinar debido principalmente a que no se ha podido registrar su actividad eléctrica cerebral, pero sin duda estos animales también presentan episodios de actividad y de reposo durante el día.

Antes de la mitad del siglo XX, los filósofos y científicos asumían que el sueño era un estado pasivo de inconsciencia¹. Sin embargo, a partir del descubrimiento del electroencefalograma (EEG) esta idea cambió.

En 1924, por primera vez un psiquiatra alemán llamado Hans Berger, publica sus registros electroencefalográficos en humanos, demostrando que cuando un sujeto está relajado con los ojos cerrados y se va sintiendo somnoliento, genera una actividad eléctrica cerebral de alto voltaje y de baja frecuencia si se compara con la de vigilia, que es de bajo voltaje y de alta frecuencia².

Posteriormente, en 1937 otro investigador alemán llamado Klaue comenzó a hacer registros en animales. Utilizando el EEG en gatos, pudo ver que el sueño avanzaba en una secuencia característica, un periodo de sueño ligero durante el cual la corteza cerebral producía ondas lentas y otro periodo de sueño profundo donde la actividad cortical se hacía más rápida, acompañada de una relajación muscular y sacudidas de las extremidades. Sin embargo, en ese entonces la idea no fue bien aceptada².

En 1953, Eugene Aserinsky, quien fuera estudiante del profesor Nathaniel Kleitman, estaba estudiando las variaciones cíclicas del sueño en niños cuando observó que durante el sueño se presentaban periodos en los que sus ojos continuaban moviéndose a pesar de que la mayor parte del movimiento corporal había cesado³. Posterior a esto Aserinsky grabó el EEG, los movimientos oculares, el pulso, la respiración y la actividad muscular del mentón en hombres, incluyendo a su profesor Kleitman. Mostrando, que había también movimientos oculares rápidos en los adultos y que éstos aparecían en grupos de aproximadamente 50 minutos de duración, comenzando de los 90 a los 120 minutos después de empezar a dormir⁴, dando origen a lo que actualmente se conoce como sueño MOR.

Otro alumno de Kleitman, William Dement correlacionó por primera vez la duración del sueño MOR con la duración subjetiva de los sueños y de los movimientos oculares rápidos durante éste, estableciendo por primera vez la asociación entre sueño MOR y las ensoñaciones. También estableció una fuerte similitud entre la actividad electroencefalográfica de bajo voltaje observada durante la vigilia y el sueño MOR. Kleitman y Dement en 1957, por primera vez caracterizaron sistemáticamente 4 etapas de sueño NMOR basándose

en la actividad electroencefalográfica. Las etapas 1 y 2 de sueño ligero, y las etapas 3 y 4 a las que llamaron específicamente sueño de ondas lentas, que son etapas de sueño más profundas⁵.

Al igual que Klaue, Dement encuentra dos etapas de sueño en el gato. Una en la cual, el electroencefalograma muestra una actividad cortical de alto voltaje, lenta y con algunos husos; y otra de bajo voltaje y rápida con sacudidas de las extremidades, movimiento de las vibrisas y ráfagas de movimientos oculares rápidos, a la cual llamó sueño activo⁶. Lo cual corrobora lo visto por Klaue, dando la primera definición electroencefalográfica de sueño MOR.

Al mismo tiempo, en Francia, Michael Jouvet y Francois Michel estudiaban la actividad eléctrica subcortical durante el sueño en el gato. Implantaron electrodos en el hipocampo, la formación reticular mesencefálica y en el núcleo reticular pontino, además de colocar electrodos en los músculos de la nuca para registrar el electromiograma. Reportaron que en periodos de 6 min la actividad muscular desaparecía completamente y se observaban ondas puntiagudas en el puente, las cuales se correlacionaban con los movimientos oculares rápidos del gato mientras dormía (posteriormente llamadas ondas ponto genículo occipitales, PGO) y

que la actividad eléctrica registrada en el hipocampo y en la formación reticular mesencefálica era muy parecida a la de la vigilia⁷. Habiendo tanta similitud entre esta etapa de sueño y la vigilia Jouvett la llamó sueño paradójico. Así, el crédito por la identificación y descripción del sueño MOR se le ha dado a Aserinsky, Kleitman, Dement, Jouvett y Michael.

Para identificar las diferentes etapas de sueño en el humano, se utiliza la polisomnografía, la cual incluye el electroencefalograma (EEG), el electrooculograma (EOG) y el electromiograma (EMG). En los animales se utiliza al menos el EEG ya sea cortical o intracortical y el EMG; en algunas ocasiones se utiliza el EOG o incluso el registro del movimiento de las vibrisas.

Actualmente en el humano el sueño NMOR se divide en tres etapas. La etapa I es de relativamente bajo voltaje (3-7 Hz) y puntas agudas del vertex; la etapa II se caracteriza por ondas lentas de baja frecuencia (<1Hz) en menos del 30% de la época, la cual dura 30s y alterna con otros componentes como los complejos K (onda aguda con un componente negativo seguida inmediatamente de uno positivo) y husos de sueño (ondas de 12-14 Hz que duran entre 0.5 a 1.0 s); la etapa III, también llamada de ondas lentas y que actualmente abarca

también a la antigua etapa IV, se caracteriza por presentar ondas lentas (<1Hz) en el 30% o más de una época. Ahora bien, el sueño MOR se caracteriza por actividad eléctrica de bajo voltaje, ondas mu o dientes de sierra, atonía muscular (principalmente en los músculos anti gravitatorios), ráfagas de movimientos oculares rápidos y pequeñas sacudidas musculares⁸.

En los modelos animales más usados en los estudios del sueño, como el ratón, la rata y el gato, el sueño NMOR se divide en etapa I y II o sólo sueño NMOR. La etapa I correspondería a la somnolencia y la etapa II al sueño profundo o delta; en estas etapas de sueño se presentan ondas lentas de alta amplitud (0.1 a 4.0 Hz) en la corteza. En el sueño MOR se presentan dos signos fisiológicos que requieren de la implantación de electrodos de profundidad, uno es el ritmo theta hipocampal y el otro las ondas PGO que se pueden registrar en el puente, el núcleo geniculado lateral y la corteza occipital².

La organización del ciclo sueño-vigilia varía dependiendo de la especie. En los primates, incluyendo al humano, es monofásica, es decir, se da 1 vez durante las 24 horas y es nocturna, mientras que en el ratón, la rata y el gato es polifásica, es decir el sueño se distribuye a lo largo de 24 horas alternando con la vigilia. En particular, la rata y el

ratón son animales nocturnos, es decir presentan mayor actividad durante la noche y duermen principalmente durante el día a diferencia de los humanos.

En los mamíferos el sueño se presenta en un ciclo de 24h, es decir, es un ritmo circadiano. Estos ritmos dependen de relojes biológicos cerebrales, como el núcleo supraquiasmático (NSQ) del cual hablaremos en el capítulo siguiente.

1.2. Neuroanatomía y Neuroquímica

Regulación circádica del sueño

Hay una estructura cerebral que se encarga de marcar el ritmo circádico, es decir, los ritmos que se presentan cada 24h, éste es el núcleo supraquiasmático del hipotálamo⁹, el cual se encuentra ubicado justo por encima del quiasma óptico. El NSQ es activado por la entrada de la luz a la retina y por las secreciones de melatonina de la glándula pineal en la oscuridad^{10, 11}. Estas señales mantienen al NSQ sincronizado con el ciclo luz oscuridad. En la retina se encuentran las células ganglionares, que son las que se encargan de recibir la entrada de luz, produciendo melanopsina; posteriormente, esta señal se transmite al NSQ a través del tracto retinohipotalámico^{11,12}. Además

actualmente se sabe que el NSQ tiene varios genes reloj que codifican para formar distintas proteínas como BMAL, PERIOD y CLOCK, las cuales actúan como factores de transcripción y bucles de retroalimentación, generando así el ritmo circádico¹³.

Vigilia

Existen sistemas que llamamos promotores de la vigilia, los cuales evitan que durmamos y nos mantienen alerta. En los años 60s Moruzzi y Magoun hicieron varios experimentos seccionando y estimulando el tronco cerebral del gato, sugirieron que la vigilia es un estado que requiere un alto nivel de actividad cerebral, mantenido por impulsos que provienen de la formación reticular del tronco cerebral. En este tiempo, la zona excitable del sistema activador reticular ascendente (SARA) se localizó ampliamente en el puente y el mesencéfalo¹⁴.

Actualmente sabemos que el SARA promueve la vigilia a través de distintos grupos celulares. Participan el locus coeruleus (LC) que sintetiza norepinefrina (NE); los núcleos del rafe (NR) que sintetizan serotonina (5HT); el núcleo pedúnculo pontino tegmental (PPT) que sintetiza acetilcolina (Ach); el mesencéfalo con células glutamatérgicas

(Glut); y dentro de este mismo la sustancia negra compacta y el área ventral tegmental con dopamina (DA). Estos núcleos del puente y mesencéfalo envían sus proyecciones al sistema tálamo cortical, produciendo la activación cortical y así manteniendo la vigilia¹⁵.

A continuación se hará una breve descripción de cómo se ha demostrado que la estimulación eléctrica o la activación espontánea del SARA produce vigilia.

El LC proyecta a la corteza cerebral, al hipocampo, a la amígdala, al tálamo, al hipotálamo y al prosencéfalo. Existe evidencia de que su activación produce alertamiento y activación cortical. El registro unitario del LC muestra que sus neuronas noradrenérgicas disparan con mayor frecuencia durante la vigilia activa (cuando el animal está explorando y/o en movimiento), su disparo disminuye en la vigilia quieta o el sueño NMOR y cesan su disparo durante el sueño MOR^{16,17}. Además estas células aumentan su tasa de disparo en respuesta a estímulos externos que producen alertamiento¹⁸.

Las células del LC responden inmediatamente antes de que los animales muestren signos fisiológicos y conductuales de vigilia, lo que sugiere que la actividad del LC se anticipa a la vigilia¹⁹. Así, la

activación o la inactivación del LC produce un aumento o disminución de la vigilia.

Los núcleos del rafe producen 5HT, específicamente en el área dorsal y medial. Este tiene casi las mismas proyecciones que el LC. Hasta el momento no es muy claro si las células serotoninérgicas producen sueño o vigilia. Ya que se ha observado que las células del NR tienen su pico máximo de disparo en la vigilia, disminuyendo en el sueño NMOR y cesando el disparo durante el sueño MOR, lo que había sugerido que la activación de estas células promueve la vigilia^{20,21}. Sin embargo, al reexaminar estos patrones de actividad se encontró que estas células son incapaces de anticiparse a los cambios espontáneos del sueño a la vigilia, como lo hacen las noradrenérgicas, indicando que la actividad de las células serotoninérgicas no causa una activación cortical²². Además, se ha mostrado que la lesión del rafe aumenta la vigilia y suprime el sueño NMOR²³.

Mediante registro unitario se ha visto que las células serotoninérgicas aumentan su frecuencia de disparo durante el sueño NMOR²⁴. Sin embargo, existe evidencia farmacológica de que la activación de los receptores 5HT puede estar involucrada también en

la vigilia^{25,26}. Lo que sugiere que las células serotoninérgicas del rafe podrían estar involucradas tanto en la vigilia como en el sueño NMOR.

Los núcleos PPT sintetizan acetilcolina además de algunos péptidos y neuromoduladores. El óxido nítrico que contienen estas células actúa como una señal parácrina que regula la vigilia, controlando los niveles de actividad de las células de PPT, y las células que sintetizan acetilcolina promueven la vigilia activando la vía tálamo-cortical, hipotálamo-cortical, el núcleo supraquiasmático y la amígdala²². En ratas y gatos se ha mostrado que la estimulación eléctrica de PPT promueve la vigilia e induce locomoción^{27,28}.

Los estudios de actividad unitaria que se han llevado a cabo en PPT indican que existen diferentes tipos celulares y que cada uno tiene un distinto patrón de disparo dependiendo de la conducta, por lo cual se han clasificado básicamente en 3 grupos: 1) las células “Wake-REM-on” que se activan durante la vigilia y durante el sueño MOR; 2) las células “Wake-on” que únicamente se activan durante la vigilia y 3) las células “REM-on” que se activan sólo durante el sueño MOR²⁹.

Existe evidencia de que el PPT tiene que ver tanto con la vigilia como con el sueño MOR. En un estudio llevado a cabo por Datta en

ratas en libre movimiento se mostró, que el 60% de las células colinérgicas de este núcleo son de tipo “Wake-REM on” y que en el sueño MOR la actividad de estas células es de 65% y en sueño NMOR disminuye al 7.4%, en comparación con su actividad en vigilia. También se mostró que las células “Wake-REM on” aumentan su actividad unos segundos antes y después de la vigilia.³⁰.

Con respecto a la formación reticular mesencefálica, su estimulación eléctrica produce activación cortical en gatos anestesiados¹⁴. Mediante el registro unitario se ha observado que la mayoría de estas células están más activas durante la vigilia que en el sueño NMOR³¹. Además, aumenta la tasa de disparo de estas neuronas antes de la activación electroencefalográfica espontánea y por la administración de ácido kaínico, asociada a alertamiento en el gato³². Aunque aún no se ha identificado que tipo de neurotransmisor sintetizan estas células, se cree que son de tipo glutamatérgico. Lo que sí se sabe con certeza es que estas células mandan proyecciones a la vía tálamo-cortical y a la hipotálamo-cortical produciendo vigilia²⁹.

Las células dopaminérgicas de la sustancia negra y el VTA no cambian mucho sus patrones de disparo a través del ciclo sueño-vigilia. Algunos estudios han mostrado que estas células aumentan su

actividad asociada con el sueño MOR o con la vigilia en particular cuando ésta tiene que ver con la actividades que generen recompensa^{33,34}. Se ha mostrado que durante el periodo de obscuridad, cuando las ratas están más activas, aumentan los niveles extracelulares de DA en la corteza prefrontal y que la administración intracerebroventricular de agonistas al receptor de dopamina (D1) aumenta la vigilia, suprimiendo tanto al sueño MOR como al NMOR^{35, 36}.

Además del SARA, otras estructuras están involucradas en la vigilia, como el hipotálamo posterior que sintetiza o secreta histamina, el hipotálamo lateral con las orexinas, también llamadas hipocretinas, y el prosencéfalo con acetilcolina (Figura 1).

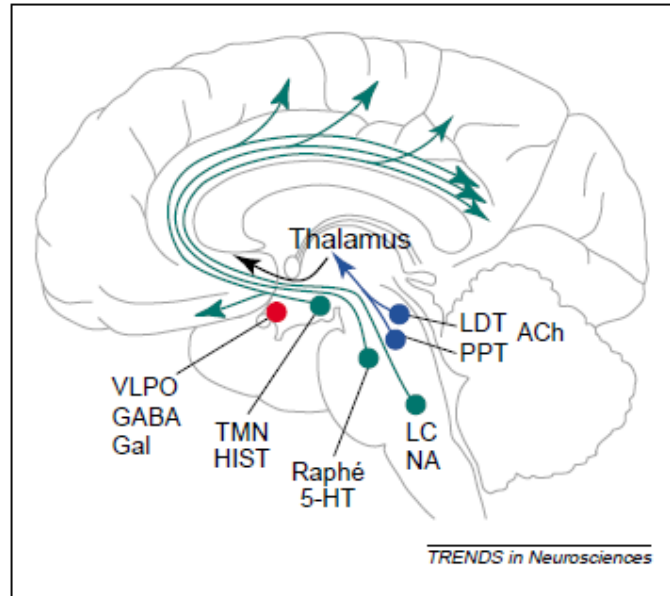


Figura 1. El SARA envía proyecciones del tronco cerebral y del hipotálamo posterior a través del procéncéfalo. Las neuronas de PPT y LDT envían ACh al procéncéfalo, incluyendo el tálamo, que regula la actividad cortical. El rafe (NR) y el locus coeruleus (LC) envían proyecciones directas a la corteza y al hipotálamo. El núcleo tuberomamilar (TMN), que contiene histamina, el NR y el LC promueven la vigilia, mientras que el área preóptica del hipotálamo (VLPO) que contiene GABA y galanina promueve el sueño³⁷.

En 1930, Von Economo fue el primero en relacionar el hipotálamo posterior con la vigilia. Postmortem, observó que los pacientes con encefalitis letárgica, que tenían dañado el hipotálamo posterior (HP) y la parte más rostral del mesencéfalo, habían cursado con prolongados periodos de somnolencia y habían mostrado dificultades para mantenerse despiertos. Posteriormente, esta observación se reprodujo en diversos modelos animales^{38,39}. Actualmente se sabe que en especial es el núcleo tuberomamilar

(NTM), el que contiene células histaminérgicas que proyectan a varias zonas del cerebro, incluyendo la corteza cerebral, para promover la vigilia y que la mayoría de las células del NTM están activas durante la vigilia e inactivas durante el sueño⁴⁰.

Las neuronas orexinérgicas del hipotálamo lateral (HL) proyectan a diversas estructuras como PPT y LDT (núcleo laterodorsal tegmental), al locus coeruleus, al rafe, a la sustancia negra, al VTA y al NTM del hipotálamo. Estas neuronas están más activas durante la vigilia⁴¹ y típicamente se han relacionado a ella, incluso los ratones knockout a orexinas exhiben un fenotipo muy parecido a la narcolepsia en el humano, es decir, son incapaces de mantenerse en un estado de vigilia normal por tener episodios abruptos de sueño MOR⁴².

Ahora bien, las neuronas colinérgicas del prosencéfalo están involucradas en varias conductas que promueven la vigilia, como la atención y el aprendizaje y juegan un papel importante en la activación del hipocampo y de la neocorteza⁴³. Se ha mostrado que los niveles de Ach en la neocorteza y el hipocampo son altos durante la vigilia en comparación con el sueño NMOR⁴⁴.

Sueño no MOR

El sueño NMOR o sueño de ondas lentas se presenta después de una reducción en la actividad neuronal de las regiones que producen o promueven la vigilia y la disminución de la entrada de los estímulos sensoriales a la corteza cerebral. Esta disminución de la entrada sensorial es controlada por el tálamo, se da cuando estas neuronas son hiperpolarizadas por las neuronas GABAérgicas del reticularis talámico⁴⁵. El mecanismo por el cual se genera el sueño NMOR es a través de la activación de las neuronas GABAérgicas del área preóptica del hipotálamo.

Desde 1946, Nauta comprobó en ratas que la lesión bilateral del área preóptica del hipotálamo producía insomnio. Posteriormente se hicieron lesiones electrolíticas en el gato⁴⁶ y también se utilizó el registro electroencefalográfico, comprobando que la lesión de los cuerpos celulares del área preóptica suprimían el sueño NMOR⁴⁷.

Recientemente se ha propuesto que la zona específica del área preóptica del hipotálamo que se encarga de la generación del sueño NMOR es el área preóptica ventral lateral y la medial, ya que se encontró un aumento de innumoreactividad de c-Fos, al que se le

considera como marcador de actividad, en estas dos áreas específicas durante el sueño NMOR⁴⁸. Así mismo, utilizando la resonancia magnética funcional se ha mostrado que el área preóptica medial está más activa durante el sueño NMOR⁴⁹ y que la lesión específica de esta área es la más efectiva para suprimir esta etapa de sueño⁴⁷.

El área preóptica principalmente produce GABA y galanina y manda proyecciones a distintos núcleos promotores de la vigilia, como el núcleo tubero mamar, el hipotálamo lateral, el locus coeruleus el rafe dorsal, PPT y LDT, inhibiendo así la actividad de estos núcleos (Figura 2).

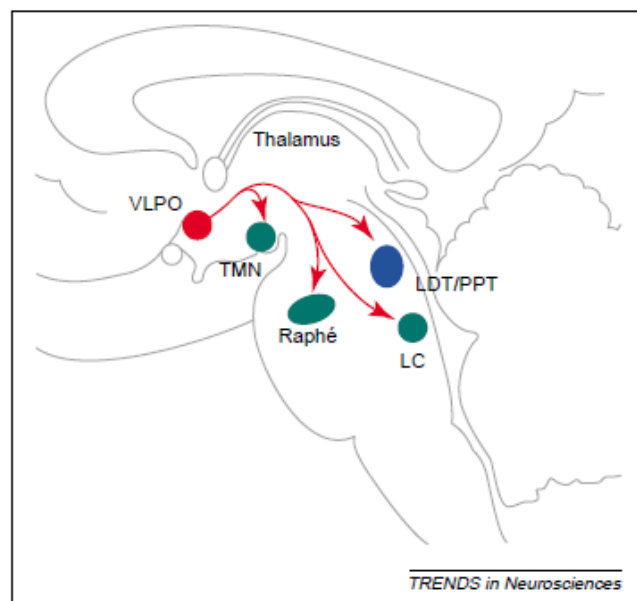


Figura 2. Las proyecciones del área preóptica ventrolateral (VLPO) se dirigen al sistema de alertamiento. Los axones de las neuronas del VLPO proyectan al rafe, LC, TMN y además inhiben también a las neuronas colinérgicas de PPT y LTD³⁷.

Sueño MOR

El sueño MOR se compone de varios eventos y éstos son generados por varios núcleos del tronco cerebral. Además, en esta etapa de sueño se presentan fenómenos tónicos y fásicos, como la atonía muscular y la desincronización electroencefalográfica o los movimientos oculares rápidos y las ondas PGO respectivamente. La atonía muscular es generada por las neuronas del núcleo Locus coeruleus, los movimientos oculares por la formación reticular, las ondas PGO por el área peribraquial o el núcleo subcoeruleus, el ritmo theta hipocampal se produce por la activación del pontis oralis, los “twiches” o espasmos musculares se generan aparentemente por la activación de la parte caudal del núcleo gigante celularis, el aumento de temperatura y los cambios en la frecuencia cardíaca y respiratoria ocurren por la activación del núcleo parabraquial, la activación cortical es producida por la actividad de la formación reticular mesencefálica y la formación reticular bulbar, también llamada núcleo magno celular ⁵⁰.

Como mencionamos al inicio del primer capítulo, el sueño MOR se presenta varias ocasiones durante el dormir, alternando con el sueño NMOR. Por ejemplo, en el humano se presenta normalmente en 4 ocasiones durante la noche, por lo tanto se requieren

mecanismos para iniciar y terminar estos episodios, pudiendo así alternar entre el sueño NMOR y el sueño MOR.

Los mecanismos de iniciación y término son controlados por neuronas colinérgicas de los núcleos PPT y LDT, y neuronas aminérgicas del Locus coeruleus y del rafe, respectivamente. En los años 60s, los investigadores Hernandez-Peón y Dement fueron los primeros en relacionar la neurotransmisión colinérgica en la regulación del sueño MOR. Posteriormente un gran número de investigaciones ha confirmado que la administración de acetilcolina o carbacol (un agonista colinérgico) en el tronco cerebral induce sueño MOR, específicamente en la formación reticular pontina mesencefálica ^{51, 52,53}. Otra evidencia de que la liberación de acetilcolina es la responsable de la generación de sueño MOR es que la estimulación eléctrica de PPT aumenta su liberación en la formación reticular pontina mesencefálica del gato⁵⁴ y que esta liberación es capaz de producir sueño MOR⁵⁵.

Durante el sueño MOR la actividad de las células aminérgicas se reduce notablemente y aumenta la actividad de las células colinérgicas, comenzando a generar así los otros eventos que caracterizan al sueño MOR, como la atonía muscular y los

movimientos oculares, entre otros. Se ha mostrado anatómicamente que cada uno de los núcleos involucrados en generar los eventos característicos de sueño MOR recibe entradas del núcleo PPT^{56,57,58}.

Los patrones de actividad neuronal de las células colinérgicas de PPT y LDT principalmente fueron estudiados por Datta, Steriade y Sakai. En gatos en libre movimiento se registró la actividad de 70 células colinérgicas de PPT, encontrándose que el 12.86% fueron “REM-on” y 60% “Wake-REM-on”³⁰. Ahora bien, se ha visto que la actividad de las células colinérgicas de PPT durante el sueño MOR es regulada por la interacción de otros neurotransmisores como glutamato y GABA. Se ha encontrado que cuando aumenta el nivel de actividad de las células colinérgicas de PPT al 65% por la liberación tónica de glutamato se induce sueño MOR. Los receptores a glutamato que son activados para producir sueño MOR son los de tipo kainato. Cuando los receptores que se activan en PPT son de tipo NMDA la actividad colinérgica aumenta a un 100% resultando en vigilia.⁵⁹ Mientras que durante el sueño NMOR los receptores de tipo GABA_B se activan en las células colinérgicas de PPT manteniendo baja la actividad de estas células, aproximadamente a un 7.4%³⁰.

Los estudios de Jouvet y las evidencias mostradas anteriormente condujeron al desarrollo de la teoría de interacción recíproca, propuesta por Hobson y McCarley en 1975⁶⁰. En este modelo se propone la existencia de un circuito que actúa como un “switch” regulando la generación del sueño MOR.

Este modelo propone que las neuronas aminérgicas y colinérgicas de la formación reticular mesopontina interactúan de forma tal que producen la alternación entre sueño MOR y NMOR. Básicamente, las células “REM-on” de la formación reticular pontina son colinoceptivamente excitadas posinápticamente y/o colinérgicamente excitadoras en sus terminaciones sinápticas. Mientras que las células “REM-off” son noradrenérgicamente y serotoninérgicamente inhibitorias. Durante la vigilia el sistema aminérgico está tónicamente activo e inhibe al sistema colinérgico. Durante el sueño NMOR la inhibición aminérgica disminuye y la excitación colinérgica aumenta, hasta que al inicio del sueño MOR, la inhibición aminérgica cesa y la excitabilidad colinérgica aumenta⁶¹. Ahora bien, como se mencionó anteriormente existen otros neurotransmisores involucrados, los cuales se han incluido actualmente en este modelo de la interacción recíproca (Figura 3).

Mesopontine regulator of REM-NREM alternation

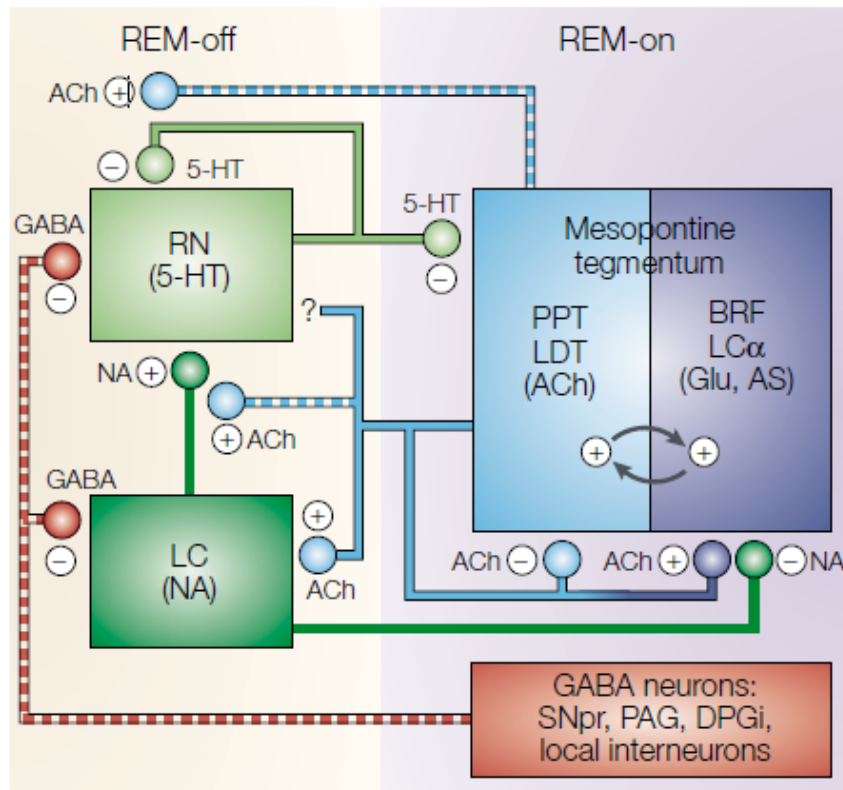


Figura 3. Modelo de interacción recíproca. La excitación colinérgica y no colinérgica involucra a la acetilcolina (ACh) y el glutamato (Glu) y aspartato (AS) incrementan el disparo de las células “REM-on”, mientras que la inhibición noradrenérgica, serotoninérgica y los autoreceptores colinérgicos interactúan suprimiendo la actividad de las células “REM-on”. Los efectos en neuronas colinérgicas y aminérgicas son excitadores, como se propuso en el modelo original de interacción recíproca, y pueden también actuar presinápticamente en los circuitos noradrenérgicos-serotoninérgicos o en los serotoninérgicos-serotoninérgicos. El GABA, el óxido nítrico algunos neuropéptidos pueden contribuir a la modulación de esta interacción. Formación reticular del tronco cerebral (BRF), Peri Locus Coeruleus alfa (LCα), Sustancia Negra pars reticularis (SNpr), sustancia gris periacueductal (PAG), Núcleo gigante celular dorsal (DPGi)⁶¹.

Como se puede ver, el sueño y la vigilia son estados fisiológicos complejos que involucran un gran número de neurotransmisores y estructuras que para la ejecución de cada estado deben de estar en un estricto equilibrio.

2. CANABINOIDES

2.1 La planta de la marihuana

El nombre de los cannabinoides proviene de la *Cannabis sativa*, mejor conocida como marihuana. El principal componente activo y responsable de los efectos psicotrópicos de esta planta es el Δ -9 tetrahydrocannabinol también llamado simplemente tetrahydrocannabinol o THC. El cual fue aislado y sintetizado por primera vez por el grupo de Mechoulam^{62,63,64}.

La marihuana tiene aproximadamente 460 compuestos de los cuales más de 60 son cannabinoides. Entre estos están el cannabinol (CBN), Δ -8 tetrahydrocannabinol o Δ -10 tetrahydrocannabinol, los cuales también son activos aunque menos potentes que el Δ -9 tetrahydrocannabinol y se encuentran en menores cantidades en la planta. Estos y otros cannabinoides tienen efectos sinérgicos o antagonistas con el THC y pueden modificar su acción cuando la cannabis es fumada⁶⁵.

Existen tres especies de la planta de la marihuana: la *Canabis sativa* (que es la más conocida y estudiada), la *Canabis indica* y la *Canabis ruderalis*⁶⁶. Estas se distribuyen de diferente forma alrededor

del mundo e incluso existe una gran variedad de subespecies de las mismas.

La proporción y cantidad de THC que contiene una planta varía dependiendo de su especie, lugar y condiciones de cultivo, así como del tiempo que se tarda en cosecharla. En los Países Bajos contiene 16% de THC , en Europa específicamente contiene de 6-8% y en E.U. aproximadamente 7% , aunque ocasionalmente en estos últimos años se han encontrado muestras de cannabis que exceden el 18% de THC, debido tal vez a las nuevas mezclas de especies y técnicas de cultivo⁶⁶. Incluso la proporción de los componentes activos de la marihuana puede ser diferente según el clima donde se cultiva. En lugares tropicales como África, Sudáfrica, México, Colombia y Brasil, usualmente hay mucho más THC que canabidiol en una planta, con una proporción de 10:1 o más⁶⁷.

Un cigarrillo de marihuana contiene en promedio de 10-20 mg de THC, fumada solo se absorbe del 10-20% de THC, es decir, se absorbería de 1-4 mg por cigarrillo. Sus efectos al fumarla son casi inmediatos, de 1-10 min el inicio y dura de 1-4 horas aproximadamente. Cuando se consume de forma oral tarda de 30-120 min en hacer efecto, y este puede durar de 4 a 10 horas. La

marihuana ingerida produce en el hígado un metabolito activo tan potente como el THC, el 11 hidroxil-THC, lo que potencia los efectos del consumo de esta droga. Cabe mencionar que el 11 hidroxil-THC también se produce cuando la marihuana es fumada pero en cantidades muy pequeñas, menores a una tercera parte del THC en plasma, mientras que cuando la vía es oral las cantidades de este metabolito y del THC son casi iguales⁶⁷.

Debido a que los cannabinoides son altamente solubles en lípidos, se acumulan en el tejido graso y aún a los 4 y 5 días después del consumo alcanzan un pico alto (Figura 4). De ahí que los cannabinoides se sigan liberando lentamente en todo el cuerpo, incluyendo el cerebro, que su vida media sea de aproximadamente 7 días y que éstos pueden tardarse en eliminar por completo del cuerpo hasta 30 días⁶⁸. Los metabolitos en parte son excretados en la orina (25%) y al intestino (65%), donde son reabsorbidos prolongando su acción⁶⁵.

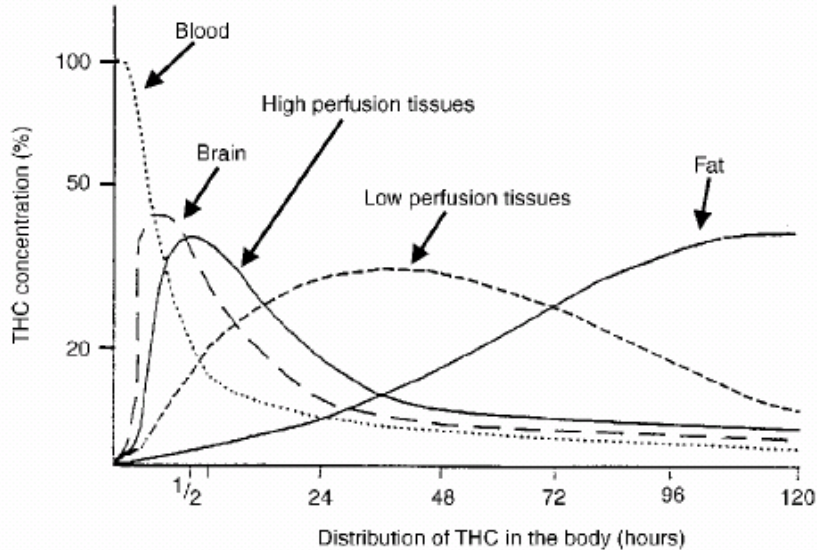


Figura 4. Distribución del THC en el cuerpo después de una sola administración en plasma. Se pueden observar básicamente dos fases de eliminación, una fase rápida (en minutos), que indica la captura rápida de la droga por el tejido adiposo y la fase lenta (en días) que muestra la liberación de THC por este tejido graso. También podemos observar en la distribución de THC en sangre que el nivel baja rápidamente aproximadamente a la media hora posterior a la administración. En el cerebro el THC tiene su pico máximo desde los 10 min y se mantiene media hora; aunque éste va decreciendo, permanece presente hasta 24h. En el tejido adiposo las concentraciones iniciales son muy bajas pero se puede observar que entre las 72 y 120 horas este tejido tiene la mayor concentración de THC. También se puede ver que el THC se distribuye de forma diferente en tejidos con alta o baja perfusión ⁶⁹.

El fumar o ingerir directamente esta planta no es el único medio de consumo que se ha utilizado. En la India se originó una forma también muy popular de consumir la marihuana. Ahí, el cannabis también se consume en forma de preparado; el más popular y potente es el Charas o Hachís, que es la resina pura de la planta de marihuana y tiene alrededor de 15-30% de THC, por lo que en términos generales lo hace más potente que el consumo de la planta

directamente. Esta resina es consumida de las dos formas, es decir, fumada o ingerida. Actualmente el uso de hachís se ha extendido a lo largo del mundo, aunque el mayor consumo es en Europa.

También existe otra forma de uso de la marihuana o hachís, el tópico. Esta forma de uso es exclusivamente medicinal, debido a que el THC actúa de manera local y no tiene ningún efecto psicotrópico, excluyendo así su uso recreativo. Se utiliza un preparado de la planta o hachís en alcohol o en aceite, el cual se administra tópicamente para aliviar el dolor.

2.2 Historia y uso de la marihuana

La marihuana es originaria de Asia central y se ha cultivado desde el 4,000 a.C. en China y el 3,000 a.C en Turkestán. Su utilización con fines medicinales en la India, China, Medio Oriente, Sudeste de Asia, Sudáfrica y Sudamérica es muy antigua. La primera evidencia de su uso es de hace 5,000 años en China, con el reinado del emperador Chen Nung, donde se recomendaba para la malaria, el estreñimiento, los dolores reumáticos y menstruales⁷⁰. En la India, el cannabis ha sido recomendado para estimular la mente, bajar la fiebre,

curar la disentería, estimular el apetito, facilitar la digestión, quitar los dolores de cabeza, curar las enfermedades venéreas e *inducir sueño*.

Más recientemente también se han encontrado reportes de su uso terapéutico. En 1860 el Dr. R.R. M'Veens informó a la sociedad médica de Ohio los descubrimientos del "Comité de Cannabis Indica". Él enumeró varias de las utilidades de la marihuana, entre las cuales estaba el tratamiento del tétanos, la neuralgia, la dismenorrea, las convulsiones, el dolor reumático y de parto, la gonorrea y bronquitis crónica. Incluso *como hipnótico* (droga inductora de sueño) lo comparó con el opio, mencionando que sus efectos son menos intensos pero que producen un *sueño "más natural"*. En 1890 el Dr. J.R. Reynolds lo recomendaba a pacientes con "*insomnio senil*" afirmando que en estos casos nada era de mejor utilidad que la marihuana. Incluso mencionaba que esta seguía siendo efectiva durante meses y años sin necesidad de aumentar la dosis⁷⁰.

A pesar de que el uso medicinal de esta planta es milenario, la investigación y su uso terapéutico en la actualidad se han visto seriamente afectados desde 1937, cuando se creó la ley de impuestos a la marihuana, y finalmente en 1992 cuando fue clasificada por la "Drug Enforcement Administration" (DEA) como droga de tipo I con lo

que está clasificada en la misma categoría que la heroína y la dietilamida de ácido lisérgico (LSD), es decir, actualmente se considera una droga peligrosa para la salud y sin utilidad terapéutica alguna. Hoy en día, la marihuana es la droga ilegal de mayor uso en el mundo⁷¹ y su consumo aun sigue siendo medicinal pero sobre todo es recreativo, lo que ha hecho que se considere un problema para la sociedad.

Por lo tanto, el desarrollo moderno del uso terapéutico de los cannabinoides debe de tener en cuenta el potencial de abuso en su consumo, la dificultad en separar los efectos psicotrópicos de los efectos terapéuticos, la amplia variación del contenido de THC en cada planta, así como de otras sustancias y el hecho de que actualmente se considera una droga ilegal de tipo I.

A pesar de ésto, no se puede negar la importancia milenaria de su uso terapéutico. Actualmente como resultado del descubrimiento de la estructura química del THC y de todo un sistema canabinérgico, se ha avanzado hacia la comprensión de la función de este sistema en una gran variedad de procesos fisiológicos. Incluso, se han podido desarrollar fármacos con actividad canabinérgica para probar su uso terapéutico de una forma más controlada.

2.3 Sistema Canabinérgico

La marihuana ha sido usada con fines medicinales y recreativos por más de 4,000 años. Sin embargo, hasta hace poco comenzamos a comprender como esta droga ejerce sus efectos a través de todo un sistema endógeno.

A partir del descubrimiento de los receptores membranales a canabinoides y sus ligandos endógenos se ha encontrado un sistema completo de señalización que incluye enzimas para la biosíntesis e inactivación de los ligandos endógenos.

Receptores a canabinoides

A finales de los 80s y principios de los 90s se descubrieron 2 tipos de receptores a los que el THC se unía. Estos fueron nombrados receptores a canabinoides debido a su afinidad con este compuesto. El receptor a canabinoides 1 (CB1) fue descubierto por Devane en 1988⁷² y clonado por Mastuda en 1990⁷³. Posteriormente, en 1993 se halló otro receptor a canabinoides el CB2, descrito inicialmente en linfocitos B y T ⁷⁴.

Ambos receptores constan de 7 dominios transmembranales, es decir, son de tipo metabotrópico y están acoplados a una proteína

Gi/o. El CB1 se encuentra principalmente distribuido en el sistema nervioso central, aunque también se encuentra en la periferia por ejemplo en las células inmunes, en el sistema reproductivo, en el tracto gastrointestinal y en los pulmones. Mientras que el CB2 está ampliamente distribuido en la periferia como en el sistema inmune, bazo, amígdalas, en células macrófagas y linfocitos^{72,73,74}.

Los estudios de mapeo del CB1 en el cerebro de la rata han mostrado que está localizado en los axones y terminales nerviosas y están prácticamente ausentes en el soma y las dendritas. Los receptores a canabinoides son predominantemente presinápticos, lo que coincide con el papel que se les ha dado como neuromoduladores o moduladores de la liberación de neurotransmisores⁷⁵. Como se había mencionado, el CB1 se encuentra ampliamente distribuido en el sistema nervioso central. Hay una gran densidad de éste en los ganglios basales, el cerebelo y el prosencéfalo (como tálamo, hipotálamo, sistema límbico, hipocampo etc.). Un ejemplo de su distribución se puede ver en la figura 5.

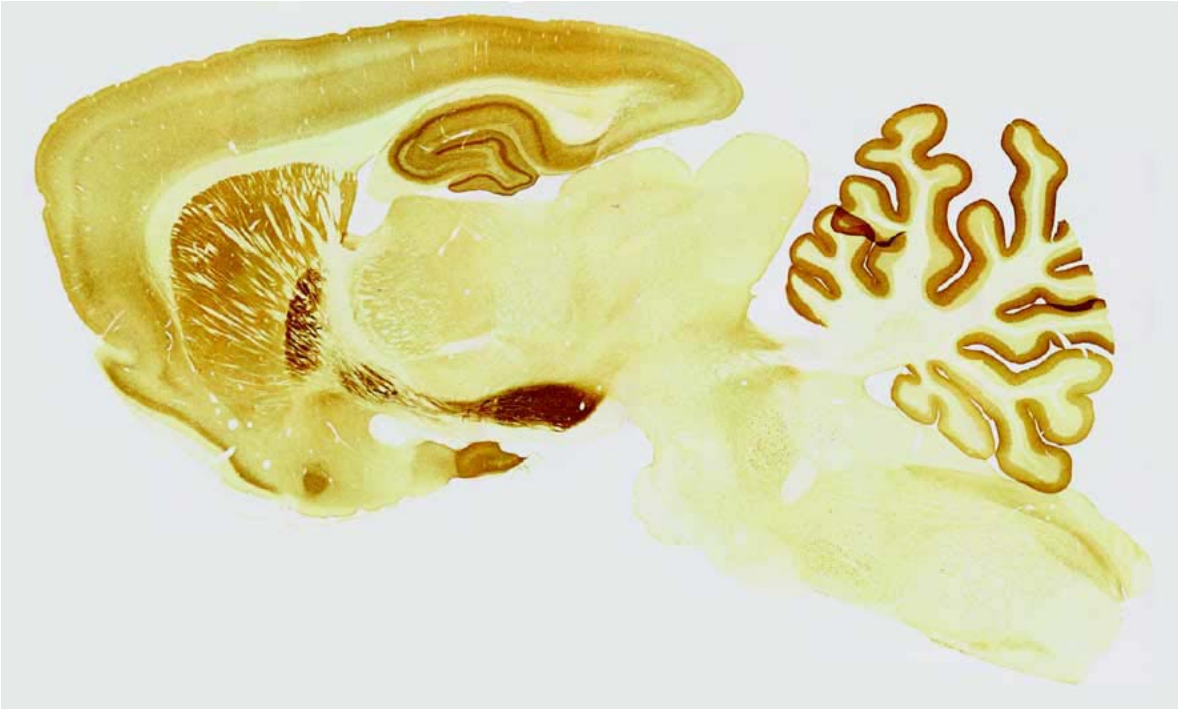


Figura 5. Inmunohistoquímica para el receptor CB1. En esta imagen se muestra un corte sagital de cerebro de rata. Las zonas más oscuras son aquellas en las que el CB1 se encuentra en mayor abundancia. Así, podemos ver que el CB1 se encuentra principalmente distribuido en la corteza, hipocampo, estriado, sustancia negra y cerebelo. La imagen se obtuvo del laboratorio de cannabinoides del Dr. Oscar Prospéro García.

El CB1 es el receptor acoplado a proteína G más abundante, con una densidad de 10-50 veces por encima de otros receptores clásicos como los de dopamina u opioides ^{76,77}. Su localización en el cerebro coincide con las propiedades farmacológicas reportadas para el THC.

El CB1 y el CB2 comparten 44% de la identidad total y el 68% de la identidad en los dominios transmembranales. Debido a que los dos receptores están acoplados a una proteína Gi/o inhiben la formación de AMPc. También se ha observado que la activación del CB1 afecta los canales iónicos, inhibiendo los canales de calcio tipo N y P/Q y

activando los de tipo A y los canales de potasio rectificantes de entrada ^{78, 79, 80}, (Figura 5).

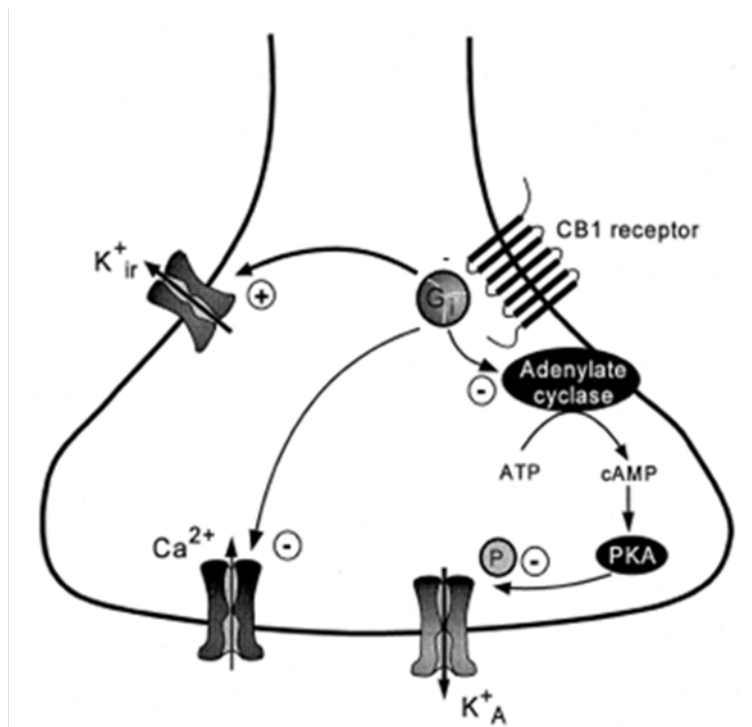


Figura 5. Mecanismos de transducción por la estimulación del CB1 en una terminal presináptica. La activación del receptor CB1 activa una proteína Gi inhibiendo a la adenilato ciclasa, disminuyendo así la producción de AMPc. Además la proteína G directamente inhibe a los canales de calcio de tipo N y P/Q y estimula a los canales de potasio rectificantes de entrada (Kir⁺). Por otra parte, la activación de los canales de potasio tipo A es también dependiente de la proteína G pero no de forma directa. Al inhibir a la adenilato ciclasa y disminuir al AMPc se inhiben los canales de potasio de tipo A, ya que son dependientes de PKA para poder fosforilarse ⁸¹.

Endocannabinoides

Por definición, los endocannabinoides (eCBs) son moléculas endógenas capaces de unirse y activar funcionalmente a los receptores a cannabinoides, ya sea al CB1, al CB2 o a ambos ⁸². Los

endocannabinoides son una familia de eicosanoides y derivados afines de ácidos grasos no saturados que estimulan a los receptores a cannabinoides. Entre estas moléculas endógenas se encuentran la anandamida (N-araquidoniletanolamida), el 2-AG (2 araquidonilglicerol), la Oleamida (Cis-9,10 octadecenamida), el PEA (N-palmitoiletanolamida), el OEA (N-oleoiletanolamida), la virodamina (O-araquidonoiletanolamina), NADA (N-araquidonoil-dopamina), y DEA (Docosatetraenoiletanolamida), entre otros (Figura 6).

Endocannabinoids and related compounds	Common name	Functional properties at cannabinoid receptors
N-arachidonylethanolamide	Anandamide	Partial CB1 agonist, weak CB2 agonist
2-arachidonoylglycerol	2-AG	Full CB1 and CB2 agonist
Cis-9,10-octadecenoamide	Oleamide	Weak CB1, CB2 agonist
N-palmitoylethanolamide	PEA	PPAR- agonist; it inhibits the expression of FAAH
N-oleoylethanolamide	OEA	TRPV1 agonist, PPAR α agonist
2-arachidonylglycerol ether	Noladin ether	CB1 agonist
O-arachidonylethanolamine	Virodhamine	Partial CB2 agonist and CB1 antagonist
N-Arachidonyldopamine	NADA	CB1 agonist and potent TRPV1 agonist

Figura 6. Endocannabinoides y compuestos relacionados. Muestra un listado de los endocannabinoides y sus propiedades de activación a los receptores a cannabinoides CB1 y CB2 ⁸³.

Por razones obvias nos vamos a centrar en dos de ellos solamente, la anandamida y la oleamida.

La anandamida fue el primer endocannabinoides descubierto, se identificó por primera vez en el cerebro de cerdo en 1992 por

Devane⁸⁴. Es la amida derivada del ácido araquidónico (AA) y la etanolamina. Su nombre proviene del sánscrito *ananda* y significa la que trae bendición interna y tranquilidad⁸⁵ y *amida* por su enlace químico que distingue a este endocanabinoide de los agonistas exógenos⁸¹.

La anandamida es principalmente un agonista al CB1 aunque también actúa sobre el CB2 con menor afinidad^{86,87}, lo que indica que también tiene efectos en la periferia y en el sistema inmune, ya que es donde el receptor CB2 es mayormente localizado. La afinidad de la anandamida por el CB2 es al menos 4 veces menor que por el CB1⁸⁸. Al igual que el THC, inhibe la actividad motora, disminuye la ansiedad y produce analgesia e hipotermia, efectos que son típicos al administrar canabinoides. Se ha demostrado que la anandamida inhibe a la adenilato ciclasa y a los canales de calcio de tipo N⁸⁵.

La anandamida ha mostrado una afinidad en el orden nanomolar al CB1 en homogenados de cerebro de rata⁸⁹. Inicialmente, anandamida fue cuantificada en el cerebro de cerdo, ahí se encontró a razón de 0.4 pmol/proteína⁸⁴. En la rata y en el humano se ha encontrado anandamida en el cerebro y periferia por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y espectrometría de

gases. En el cerebro de rata se ha detectado a una concentración de 29 pmol/g de tejido y en el de humano a 148 pmol/g de tejido^{90,91}. En el plasma se ha encontrado a una concentración de 4.4 pmol/ml en la rata, niveles muy parecidos a los de dopamina en el mismo animal⁹². En el cerebro se han encontrado niveles altos en áreas con alta densidad del CB1, como el hipocampo, estriado, cerebelo y corteza. Los niveles de anandamida en el cerebro son equivalentes a los de neurotransmisores como dopamina y serotonina, pero al menos 10 veces más bajos que los de GABA y glutamato⁸¹. Dentro de los endocannabinoides, el más abundante en el sistema nervioso central es el 2-AG (2-araquidonil glicerol). Se encuentra al menos 170 veces más alto que la anandamida (4nmol/g de tejido)^{93,94}. Los niveles de este endocanabinoide en el suero, plasma y líquido cefalorraquídeo son bajos, lo que indica que se metaboliza en los tejidos donde es sintetizado y que su acción no es de naturaleza hormonal.

Tanto la anandamida como la oleamida no entran dentro de la definición de los neurotransmisores clásicos debido a que son compuestos lipofílicos, que no son almacenados dentro de vesículas en el citoplasma y éstos pueden difundirse libremente a través de la membrana. Así, la anandamida se produce en la membrana a partir de

un fosfolípido precursor por la activación de una enzima para después ser liberada y activar a los receptores a cannabinoides. De su síntesis y degradación hablaremos detenidamente más adelante.

La oleamida (Cis-9-10-Octadecenoamida) es también una molécula de naturaleza lipídica. Esta fue encontrada por primera vez en el líquido cefalorraquídeo de gatos privados de sueño^{95,96}.

Este endocanabinoide se une a ambos receptores. Su síntesis y distribución en el cerebro aún no ha sido muy estudiada. La oleamida ha mostrado producir efectos clásicos de los cannabinoides o endocannabinoides como la anandamida, produce hipomotilidad, analgesia y reduce la temperatura corporal⁹⁷ y otros efectos que a lo largo del tiempo se ha visto que los cannabinoides también producen, como daño en la memoria, aumento del consumo de alimento e inmunosupresión^{98,99,100}.

La oleamida se une al CB1 sólo en altas concentraciones¹⁰¹ y también es capaz de unirse a otros receptores como a los 5HT_{1A}, 5HT_{2A} y 5HT₇ en neuronas¹⁰². Se ha probado que la oleamida se une al receptor CB1 y que por medio de la activación del receptor inhibe la formación de AMPc¹⁰¹. Además es degradada por la misma enzima

que degrada a la anandamida, la hidrolasa de los ácidos grasos amidados (FAAH). Todo esto sugiere que forma parte de una extensa familia de compuestos similares a los endocannabinoides⁸³.

Biosíntesis y Degradación

Los endocannabinoides no son almacenados en vesículas como los neurotransmisores clásicos. Éstos son sintetizados en la membrana celular y liberados a demanda, por medio de una vía dependiente de Ca^{++} .

La anandamida se produce a partir de fosfolípidos precursores que se encuentran enclavados en la membrana celular por medio de la actividad de dos enzimas. El primer paso de la síntesis consiste en la catálisis de dos fosfolípidos, la fosfatidil etanolamina (PE) y la fosfatidil colina (PC), que por medio de la actividad de la enzima N-aciltransferasa (NAT) producen N-araquidonoil-fosfatidiletanolamina (NAPE), tomando el ácido araquidónico de la PC y uniéndolo a la cabeza del grupo de la PE. El segundo paso consiste en la hidrólisis de la NAPE por medio de la enzima fosfolipasa D (PLD), la cual produce anandamida y ácido fosfatídico, el cual se recicla para producir glicerol¹⁰³ (Figura 7). En cultivos de neuronas corticales de

rata se ha observado que la actividad de la NAT es dependiente de Ca^{++} ¹⁰⁴.

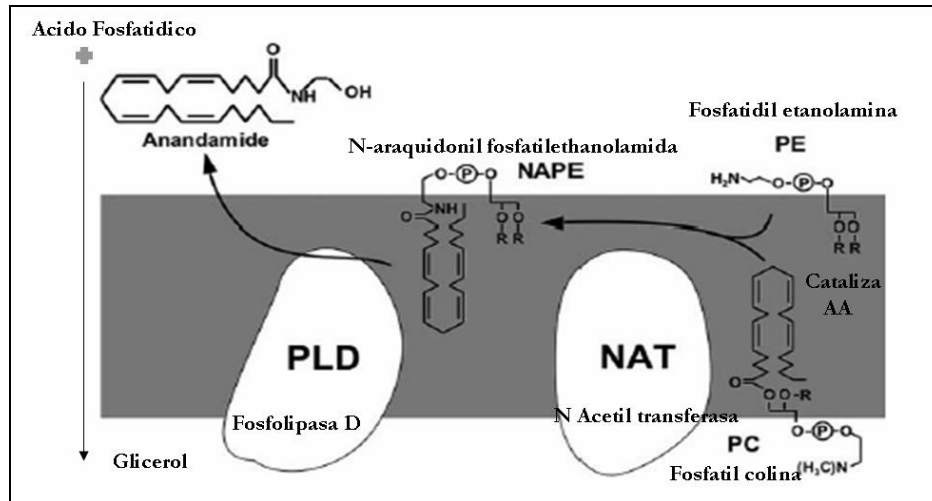


Figura 7. Biosíntesis de anandamida. Ilustra la formación de anandamida en 2 pasos. El primero es la formación del precursor de anandamida, NAPE por medio de la actividad de la NAT, la cual lo produce catalizando PE y PC. El segundo paso, es la formación de anandamida por medio de la PLD que toma el NAPE y lo hidroliza para formar anandamida ¹⁰³.

Ahora bien, la síntesis de oleamida aún no es clara, pero se cree que se forma a partir de N-acil glicina, por acción de la enzima peptidil glicina α -amida monooxigenasa (PGAM) ¹⁰⁵. Estudios in vitro han mostrado que la PGAM genera oleamida eficientemente ¹⁰⁶ (Figura 8).

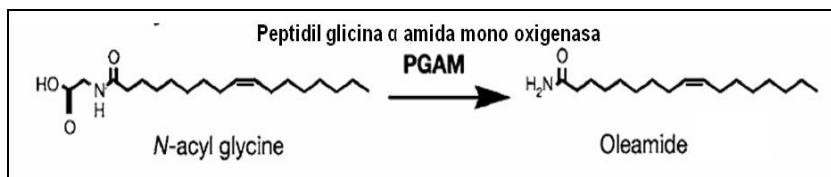


Figura 8. Posible biosíntesis de Oleamida. A través de la enzima PGAM se forma oleamida de N-acil glicina¹⁰⁵.

La anandamida y la oleamida son degradadas por la misma enzima, la hidrolasa de los ácidos grasos amidados. La FAAH es la enzima principal que se encarga de la inactivación de ácidos grasos amidados, entre los cuales están la anandamida, el N-palmitoil etanolamida, el N-estearoil etanolamida, la N-oleoil etanolamida y por supuesto la oleamida¹⁰⁷. La FAAH es una proteína integral de la membrana de 597 aminoácidos, ha sido clonada en varias especies y muestra un grado alto de conservación entre el humano y el ratón¹⁰⁸. La FAAH degrada a la anandamida en ácido araquidónico y etanolamina, mientras que a la oleamida la convierte en ácido oleico y amonía.

El papel que juega la FAAH en el proceso de degradación de los ácidos grasos amidados es realmente importante. Actualmente se han generado ratones knockout de FAAH [FAAH(-/-)] los cuales muestran

disminución en la hidrólisis de anandamida y otros FAAs (ácidos grasos amidados) de 50-100 veces en diversos tejidos, lo que indica que esta enzima es la principal para degradar estos lípidos *in vivo*. La administración de anandamida en el ratón FAAH (-/-) produce efectos exagerados en la hipomotilidad, analgesia, hipotermia y catalepsia, comparados con los efectos que produce la misma administración en ratones silvestres¹⁰⁵.

También se ha observado que los niveles endógenos de anandamida y otros FAAs se encuentran al menos 10 veces más elevados en el cerebro del ratón FAAH (-/-)^{109,110}. Además, si se administra un inhibidor de la FAAH, el URB597, se produce una inhibición dosis dependiente de la actividad de la FAAH en el cerebro de la rata. Después de una inyección i.p. de 0.3 mg/kg, el URB597 inhibe a la FAAH en 15 min y esta inhibición dura hasta 16h. Asociado a esto los niveles de anandamida en el cerebro se triplican, intensificando y prolongando sus efectos en la hipotermia, la analgesia y la hiperfagia¹¹¹.

Por medio de microscopía electrónica se ha visto que la FAAH se encuentra localizada predominantemente dentro de la célula, principalmente en la mitocondria y en el retículo endoplasmático

aunque no exclusivamente. Aún no se sabe con exactitud cómo es que la anandamida que se encuentra en la membrana llega hasta ahí, una posibilidad es que exista una proteína intracelular encargada de secuestrar a la anandamida de la membrana internalizándola y facilitando su movimiento hacia la mitocondria o el retículo endoplasmático¹¹².

Para concluir, los endocannabinoides son moléculas de naturaleza lipídica que se sintetizan en la membrana celular a partir de lípidos precursores. Estos son sintetizados por enzimas ancladas a la membrana que son dependientes de calcio. Una vez sintetizados, los endocannabinoides son liberados y viajan a la presinapsis, uniéndose así a sus receptores. Por esta razón, los endocannabinoides se consideran neuromoduladores o transmisores retrógrados. Al activar al CB1 o CB2 que están acoplados a una proteína $G_{i/o}$ inhiben la liberación de neurotransmisores como GABA, Glutamato etc. (Figura 9). Posteriormente, los endocannabinoides son degradados por enzimas específicas, que para el caso de oleamida y anandamida es la FAAH.

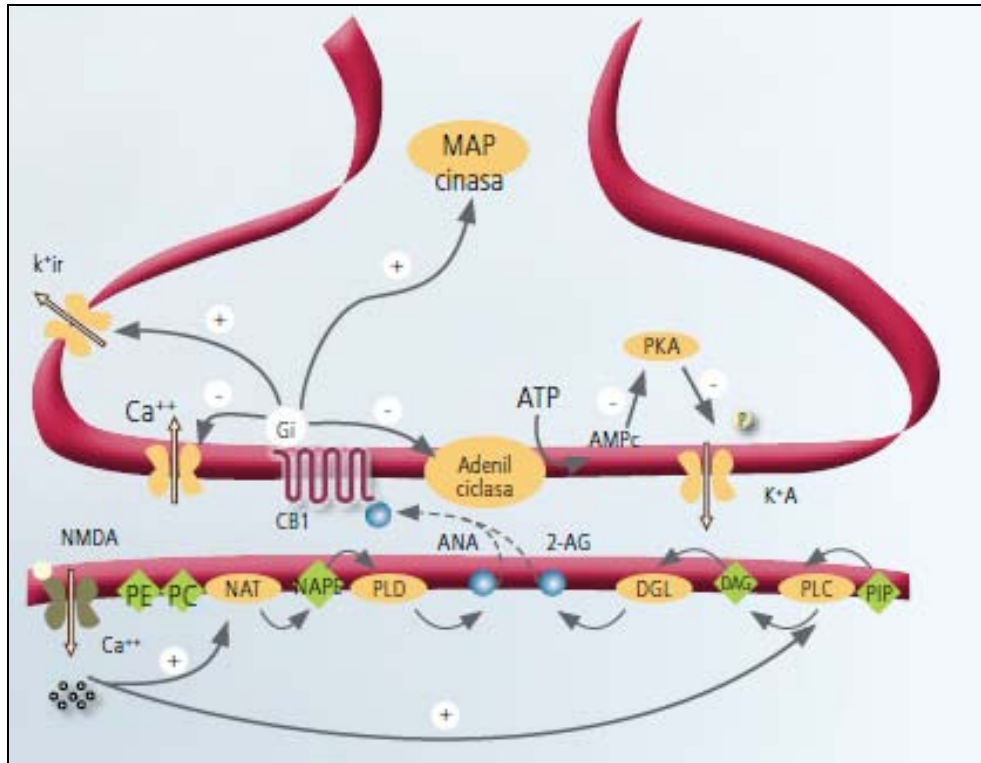


Figura 9. Biosíntesis y mecanismo de acción de los endocannabinoides. El calcio activa a la N-acil transferasa (NAT). La liberación del Ca^{++} puede ser activada por receptores ionotrópicos de glutamato, NMDA o canales de Ca^{++} dependientes de voltaje. Una vez que la NAT es activada ésta toma a la fosfatidiletanolamida (PE) y a la fosfatidil colina (PC) como sustrato para generar N-araquidonil-fosfatidiletanolamina (NAPE). La NAPE se convierte en anandamida a través de la enzima fosfolipasa D (PLD). Ahora bien, para la biosíntesis del 2-AG, la activación de un receptor acoplado a una proteína $G_{i/o}$ activa a la fosfolipasa C (PLC), la cual toma como sustrato fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂) para generar diacil glicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃). El DAG es transformado a 2-AG por la enzima diacilglicerol lipasa (DGL). Una vez sintetizados los endocannabinoides son liberados como mensajeros retrógrados activando los receptores CB₁. La $G_{i/o}$ inhibe a la adenilato ciclasa (AC), disminuyendo la formación de AMPc. Este efecto previene la activación de la PKA, evitando la fosforilación de los canales de potasio tipo A (K^+A). La $G_{i/o}$ también inhibe canales de Ca^{++} , a los tipo K^+ir y activa la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPcinasa). La actividad de la anandamida termina cuando es convertida a ácido araquidónico y etanolamina por la hidrolasa de los ácidos grasos amidados (FAAH). En el caso del 2-AG éste es inactivado por la monoacil glicerol lipasa (MAGL)¹¹³.

3. Sueño y Canabinoides

Recapitulando un poco, desde hace unos miles de años la marihuana era una planta que se utilizaba con diversos fines medicinales, entre los cuales cabe destacar que en la India se recomendaba para mejorar el sueño. No fue hasta 1860 que se presento un primer reporte médico donde se mencionaba que una de las utilidades de esta planta era la de actuar como hipnótico y cuatro décadas después fue recomendada para el insomnio senil.

Debido principalmente a que la marihuana se catalogó como droga ilegal (tipo I) no siguieron reportándose sus efectos en la medicina, hasta que en 1960 y 70 se reanudaron las investigaciones, sobre todo en lo que tenía que ver con el sueño. A pesar de que existen varios reportes en estos años los efectos resultaron ser contradictorios, tal vez en gran medida debido a que se utilizaba la planta, que como sabemos presenta grandes variaciones en la cantidad de THC que produce, así como en la de los otros canabinoides que la componen, dificultando la dosificación y la comparación entre estudios.

Posterior al descubrimiento de los endocannabinoides y de los receptores a cannabinoides se reanudó la investigación sobre la participación de los cannabinoides en el sueño. Así, recientemente la anandamida y la oleamida, dos moléculas endógenas con actividad cannabinérgica que se unen al receptor CB1^{114,115} y son degradadas por la misma enzima, la FAAH¹¹⁶, se han propuesto como reguladoras de diversas funciones fisiológicas, entre las cuales están la temperatura corporal, el consumo de alimento, la conducta sexual y el sueño^{117,118,119,120,121,122}.

Existen evidencias farmacológicas que vinculan al sistema cannabinérgico con el sueño. Se ha mostrado en ratas que la administración aguda intracerebroventricular (icv) de anandamida aumenta el sueño NMOR y el sueño MOR a expensas de la vigilia¹²³. Cuando la anandamida es administrada directamente a PPT causa un efecto similar aunque más evidente¹²⁴. La administración del SR151716A, un antagonista al CB1, previene este efecto indicando que el aumento en el sueño es debido a la activación del CB1.

La oleamida fue aislada por primera vez del líquido cefalorraquídeo (LCR) de gatos privados de sueño durante 22h¹²⁵ y desde entonces diversos grupos han probado sus efectos en el sueño.

La administración sistémica de 5mg/kg de oleamida 2h antes del inicio del periodo de oscuridad, que es cuando las ratas están más activas, indujo sueño y acortó la latencia de éste a 4min en comparación con los controles cuya latencia fue una hora¹²⁵. Adicionalmente, se ha reportado que 6h de privación de sueño aumentan las concentraciones de oleamida de 3 a 4 veces en el líquido cefalorraquídeo de ratas. Además, la administración de oleamida reduce la actividad motora en el laberinto de brazos abiertos, mientras induce signos electroencefalográficos de sueño¹²⁶.

La administración intraperitoneal de 10mg/kg de oleamida acorta la latencia al sueño y aumenta el tiempo total de sueño principalmente por un aumento del sueño NMOR. Estos efectos fueron prevenidos por la administración de SR141716A^{127,128}.

Por otro lado, los ratones que carecen de FAAH, que recordemos es la enzima que degrada tanto a anandamida como a oleamida muestran una gran cantidad de sueño de ondas lentas y un aumento de la potencia de delta¹²⁹.

Por otra parte se ha reportado que la administración sistémica de 3mg/kg de SR141716A reduce el sueño MOR y NMOR aumentando la vigilia¹²⁸. Incluso, la administración del SR141716A puede prevenir el rebote de sueño observado en ratas después de 24h de privación selectiva de sueño MOR. Más aun se ha mostrado que las manipulaciones sobre el sueño pueden producir cambios en el sistema canabinérgico. Durante el rebote de sueño consecutivo a la privación selectiva de sueño MOR hay un aumento del CB1 en el puente de la rata¹³⁰.

Los endocannabinoides y sus receptores también se expresan de forma diferente a lo largo del ciclo luz oscuridad. La anandamida se ha medido en diversas estructuras cerebrales como el hipocampo, el puente y el hipotálamo además de en el LCR a lo largo del ciclo luz oscuridad utilizando HPLC y espectrometría de masas, se mostró que ésta es detectable en el hipocampo y el puente durante la fase de oscuridad pero no durante la de luz y que presenta un pico en el LCR

al inicio del periodo de oscuridad. Sin embargo, en el hipotálamo la anandamida sólo es detectable durante la fase de luz¹³¹. El CB1 también presenta fluctuaciones dependientes del ciclo luz oscuridad. Utilizando la técnica de “Western blot” se ha medido la cantidad de proteína de CB1 a lo largo del ciclo en diferentes estructuras como el hipocampo y el puente, esta fue mayor a las 13:00h en el periodo de luz, mientras su pico más bajo fue a la 1:00h en el periodo de oscuridad. Utilizando RT-PCR se midió la cantidad de mRNA y se vio que el pico más alto es a las 21:00h indicando que hay un retardo de 16h en la producción de la proteína¹³².

Por otra parte, existe evidencia que muestra que la administración aguda de anandamida o de THC en ratas aumenta la Bmax de los receptores a cannabinoides en el cerebelo y el hipocampo y este efecto se mantiene a lo largo de una administración subcrónica. Ahora bien, mientras que el aumento en Bmax después de la administración aguda es causado por cambios en la afinidad (Kd) del receptor CB1, el aumento de la Bmax después de la administración subcrónica se debe a un aumento en la densidad de receptores. Otras áreas como el hipotálamo no sufrieron cambios tras las administraciones¹³³. Aunque existen algunas evidencias que el THC

puede disminuir el número de receptores CB1 en algunas áreas cerebrales como el cerebelo o el estriado esto sólo se observa cuando se administran dosis sistémicas muy altas. Hasta ahora no existe evidencia de que la administración crónica de anandamida produzca una disminución en la afinidad o en el número de receptores CB1, por lo que creemos que es importante explorar si las administraciones subcrónicas de los endocannabinoides pueden mejorar el sueño.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La evidencia experimental presentada sugiere que la anandamida y la oleamida pueden mejorar el sueño después de una administración aguda y que este efecto es, en su mayoría consecuencia de la activación del CB1. Sin embargo, aún no se sabe si estos efectos se mantienen después de varias administraciones. En este contexto, decidimos evaluar los efectos de la administración subcrónica de anandamida y oleamida sobre el sueño, así como los efectos de la suspensión súbita de éstos (abstinencia) y por último el bloqueo del receptor CB1 antes de la administración de estos endocannabinoides para probar si los efectos en el sueño se deben a la activación del CB1.

HIPÓTESIS

La administración aguda y subcrónica de los endocannabinoides anandamida y oleamida mejora el sueño y este efecto es mediado a través de receptor a cannabinoides CB1.

Objetivos

- 1) Realizar curvas dosis respuesta de anandamida y oleamida para determinar la dosis efectiva a la cual de forma aguda mejoran el sueño.
- 2) Analizar los efectos sobre el sueño inducidos por la administración subcrónica de anandamida y oleamida.
- 3) Analizar los efectos sobre el sueño inducidos por la suspensión súbita de ambos endocannabinoides en los animales que han sido administrados de forma subcrónica.
- 4) Bloquear los efectos producidos por la administración aguda y subcrónica de anandamida y oleamida utilizando un antagonista al receptor CB1.

MÉTODO

Sujetos

Se utilizaron 102 ratas macho de la cepa Wistar, con un peso entre 250 y 280 gr. Todos los animales fueron alojados en cajas individuales de plexiglas. A lo largo del estudio la temperatura ambiental se mantuvo a 22 ± 1 °C y el ciclo luz oscuridad fue controlado 12:12h (08:00 am – 08:00 pm). El alimento y el agua estuvieron disponible *ad libitum*.

Cirugía

Todos los animales fueron implantados con electrodos y cánulas mediante una cirugía estereotáxica. Para este procedimiento fueron anestesiados intraperitonealmente con una mezcla anestésica que contenía 66 mg/kg ketamina, 0.26 mg/kg xylazina y 1.3 mg/kg acepromazina. En la cirugía se les implantó una cánula guía de 23 gauges directo al ventrículo lateral (P=0.8, L=1.5, V=3.8) para la administración icv de los fármacos, dos electrodos al hipocampo (P=4.0, L=2.5, V=2.5) para el registro del electroencefalograma, de acuerdo al atlas de cerebro de rata de Paxinos y Watson¹³⁴, dos electrodos con tornillo implantados en los huesos frontales para

utilizarlos como referencia y por último dos electrodos a los músculos de la nuca para el registro del electromiograma.

Los animales fueron tratados de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-199) y la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del National Institute of Health, y de la European Community Council Directive 86/609/EEC. Adicionalmente, el protocolo fue aprobado por el comité de ética e investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Registros de Sueño

Después de la cirugía los animales implantados fueron alojados individualmente y se dejaron recuperar por 10 días. Una vez que terminó este periodo las ratas fueron habituadas a las condiciones del registro por 24h. Después del periodo de habituación se dividieron a las ratas en diferentes grupos experimentales, en los cuales se les administraba vehículo, oleamida o anandamida a las 8:00 am (al comienzo del periodo de luz). Inmediatamente después de la administración se comenzó a grabar el registro de sueño y se mantuvo durante 24h.

Las señales de EEG y EMG fueron amplificadas con un polígrafo Grass Modelo 7 y un amplificador Modelo 7P511 con un rango de frecuencia para el EEG de 1 a 30 y para el EMG de 30 a 100 Hz. Para la adquisición y análisis de las señales se utilizó el programa ICELUS[®].

Los animales fueron sacrificados al final de los experimentos con una sobredosis intraperitoneal de pentobarbital sódico. Para verificar la posición de la cánula se utilizó una inyección icv de rojo de Ponceu (5µl) para teñir el sistema ventricular cerebral. Los cerebros fueron extraídos y seccionados para verificar que todos los ventrículos estuvieran teñidos.

Fármacos

La araquidoniletanolamida (anandamida, ANA) y la oleamida (OLE) se obtuvieron de Sigma Aldrich, y el antagonista al CB1, AM251, se obtuvo de Cayman Chemical. En estos experimentos se utilizó este antagonista y no el SR141716A porque es más específico para el CB1 y está comercialmente disponible. La anandamida y la oleamida fueron disueltas en una solución de 5% etanol en solución salina, el AM251 se disolvió en 1µl de dimetil sulfoxido (DMSO). Las

dosis y los volúmenes utilizados se describen a continuación para cada experimento.

Protocolo experimental

Curva Dosis Respuesta de Anandamida y Oleamida

Para determinar la dosis en la que la anandamida y la oleamida producen un mayor efecto en el sueño se utilizaron 7 grupos de animales (n=6 para cada grupo) a los cuales se les administró una sola vez el fármaco (administración aguda). El grupo CONTROL recibió 5µl de vehículo (salina con 5% de etanol), el grupo de ANA1 (1µg/5µl de vehículo), el grupo de ANA2 (2µg/5µl de vehículo), el grupo de ANA4 (4µg/5µl de vehículo), el grupo OLE6 (6µg/5µl de vehículo), el grupo OLE12 (12µg/5µl de vehículo) y el grupo OLE25 (25µg/5µl de vehículo). En todos los grupos experimentales los fármacos fueron administrados a las 8:00am. El registro de sueño comenzó inmediatamente después de la administración y tuvo una duración de 24h.

Administración subcrónica y abstinencia

Para las administraciones subcrónicas se utilizaron 3 grupos (n=6 para cada grupo). Los mismos animales usados en la

administración aguda en los grupos CONTROL, ANA2 (2µg/5µl de vehículo) y OLE25 (25µg/5µl de vehículo) se siguieron administrando diariamente con las mismas dosis y los mismos fármacos a las 8:00am durante 15 días. Estas dosis fueron las más efectivas para aumentar el sueño MOR después de la administración aguda. Los animales no fueron registrados hasta el día 15 de la administración. En este día inmediatamente después de la administración del vehículo o de los cannabinoides los animales fueron registrados por 24h. El día 16, todos los grupos recibieron vehículo (5µl) a la misma hora y se registraron por 24h, con el fin de detectar si presentaban signos de abstinencia en el sueño. Además, para detectar si los efectos de anandamida y oleamida sobre el sueño están mediados por la activación del CB1 utilizamos un antagonista a este receptor, el AM251.

Curva Dosis respuesta de AM251

Se llevó a cabo una curva dosis respuesta de AM251 para determinar el efecto del bloqueo del CB1 y así potencialmente prevenir la actividad de los endocannabinoides administrados. La curva dosis respuesta de AM251 comenzó con la dosis equimolar a 2µg de anandamida, que fue la dosis que tuvo efectos en el sueño. Se utilizaron 4 grupos (n=6 para cada grupo), el grupo CONTROL al que

se le administro 1µl de vehículo (DMSO), el grupo de AM251-3.2 (3.2µg/1µl de DMSO), el grupo de AM251-6.4 (6.4µg/1µl de DMSO) y el grupo de AM251-12.8 (12.8µg/1µl de DMSO). La administración se llevo a cabo a las 8:00am. El registro de sueño comenzó inmediatamente y tuvo una duración de 24h.

Bloqueo de la administración aguda y subcrónica de anandamida y oleamida

Para bloquear los efectos de la administración aguda de anandamida o oleamida se utilizaron 3 grupos (n=6 para cada grupo). El grupo CONTROL (1µl de DMSO, 15 min después recibieron 4µl de etanol al 5% en solución salina), AM251/ANA (3.2µg AM251/1µl de DMSO, 15 min después recibieron 2µg de ANA/4µl de salina con 5% de etanol) y AM251/OLE (3.2µg AM251/1µl de DMSO, 15 min después recibieron 25µg de OLE/4µl de salina con 5% de etanol). Los animales fueron administrados a las 8:00am y el registro de sueño se llevó a cabo inmediatamente con una duración de 24h.

Para conocer los efectos del bloqueo con AM251 en la administración subcrónica se utilizaron 3 grupos adicionales que recibieron vehículo, anandamida u oleamida diariamente durante 15

días (n=6 para cada grupo). Las administraciones fueron exactamente iguales que las descritas para el experimento de administración subcrónica. El día 15, se administró el AM251 de la siguiente forma: para el grupo CONTROL (1µl de DMSO, 15 min después recibieron 4µl de salina con 5% de etanol), AM251/ANA (3.2µg AM251/1µl de DMSO, 15 min después recibieron 2µg de ANA/4µl de salina con 5% de etanol) y AM251/OLE (3.2µg AM251/1µl de DMSO, 15 min después recibieron 25µg de OLE/4µl de salina con 5% de etanol). Los animales fueron administrados a las 8:00am y el registro de sueño se llevó a cabo inmediatamente y tuvo una duración de 24h.

Análisis de datos

Los registros electroencefalográficos fueron analizados cada 12 segundos y se clasificaron en los siguientes estados de vigilancia: Vigilia (V), sueño NMOR (NMOR) y sueño MOR (MOR). Los criterios electroencefalográficos usados para definir estos estados de vigilancia fueron los siguientes: la vigilia se caracterizó por un electroencefalograma con actividad rápida de bajo voltaje y actividad theta así como alta actividad muscular en el EMG; el sueño NMOR con ondas delta y una disminución en la actividad muscular y el sueño MOR con actividad teta y atonía muscular. El tiempo que pasaban los

animales en vigilia, NMOR y MOR se calculó por hora durante dos periodos de 12h (total 24h). La latencia a sueño NMOR se calculó midiendo el tiempo transcurrido hasta tener el primer periodo de sueño NMOR, y la de sueño MOR se midió desde el primer periodo de sueño NMOR al sueño MOR. La frecuencia y la duración promedio de sueño MOR también fueron medidos.

Estadística

Los resultados de la vigilia, el sueño NMOR y el sueño MOR fueron comparados con una ANOVA mixta y una corrección de Greenhouse-Geisser, además de una ANOVA subsidiaria para detectar los cambios por hora con una prueba post hoc LSD usada sólo para la comparación específica cuando estaba indicada por la ANOVA mixta, a excepción de la curva dosis respuesta de AM251 para la cual se usó una ANOVA de una vía y un post hoc LSD. Finalmente, la frecuencia del sueño MOR se analizó con una prueba de Kruskal-Wallis y con un post hoc U de Mann-Whitney con su respectiva corrección de Bonferroni.

RESULTADOS

Curva dosis respuesta de anandamida y oleamida

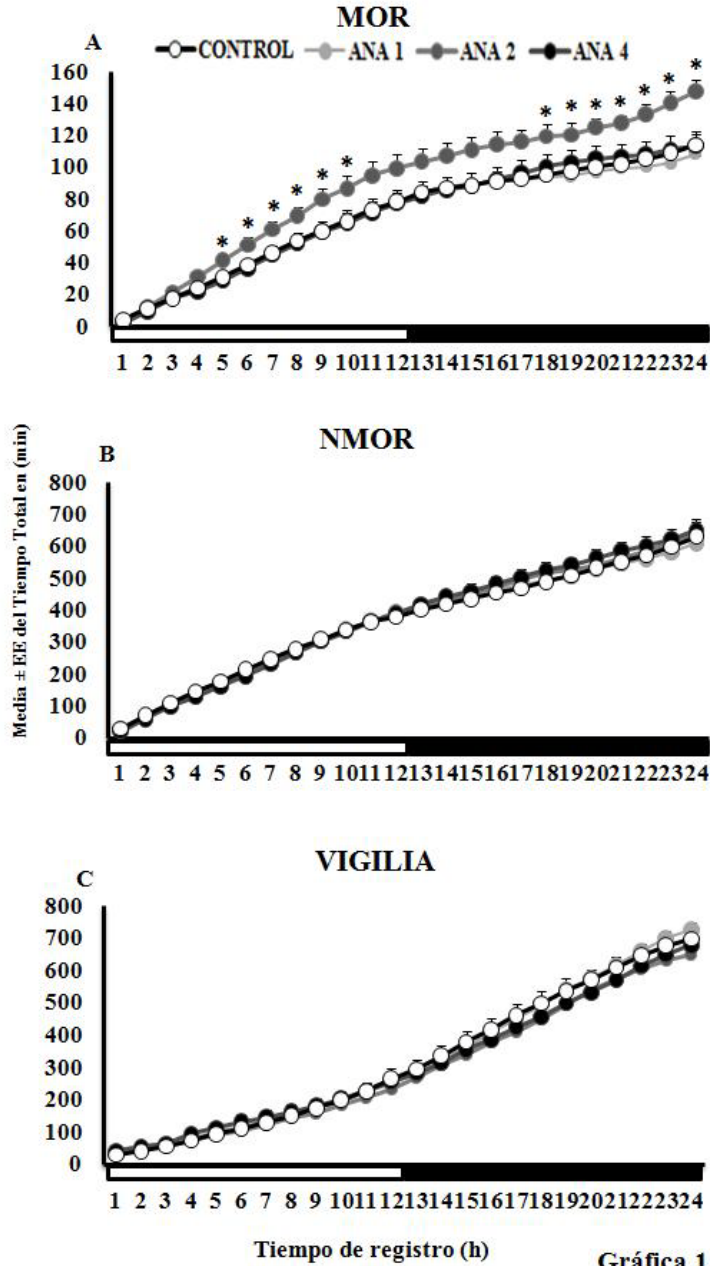
Los resultados muestran que la administración aguda de $2\mu\text{g}$ de anandamida aumenta significativamente el sueño MOR en comparación con el grupo control. El análisis estadístico con la ANOVA mixta indica una interacción significativa grupo x tiempo para el sueño MOR ($F_{7,549, 50.32} = 2.489$, $p < 0.05$, $\epsilon = 109$) y diferencias de la hora 5 a la 10 y desde la hora 18 a la 24 con las ANOVAs subsidiarias (Tabla 1).

Administración Aguda de Anandamida ANOVA subsidiaria de sueño MOR	
Hora	Significancia
5	$F(3,20) = 3.18$ *
6	$F(3,20) = 3.16$ *
7	$F(3,20) = 3.26$ *
8	$F(3,20) = 3.14$ *
9	$F(3,20) = 3.72$ *
10	$F(3,20) = 3.15$ *
18	$F(3,20) = 3.36$ *
19	$F(3,20) = 3.34$ *
20	$F(3,20) = 4.01$ *
21	$F(3,20) = 4.69$ *
22	$F(3,20) = 5.01$ *
23	$F(3,20) = 5.58$ *
24	$F(3,20) = 5.62$ *

* $p < 0.05$ vs CONTROL **Tabla 1**

El aumento en el tiempo total de sueño MOR producido por la administración de anandamida se observó a partir de la 5ta hora hasta las 24h aunque no en todas las horas resultó significativo (Gráfica 1A). La vigilia mostró una pequeña reducción en el tiempo total pero no fue significativa (Gráfica 1C), y el sueño NMOR tampoco mostró diferencias significativas. El tiempo que aumentó el sueño MOR fue tomado de la vigilia, que se redujo un poco aunque no significativamente (Gráfica 1B).

**ADMINISTRACIÓN AGUDA
CURVA DOSIS RESPUESTA DE ANANDAMIDA**



Gráfica 1. Curva dosis respuesta de la administración aguda de 3 dosis de anandamida en el ciclo sueño vigilia. Muestra los grupos ANA 1 (1µg), ANA2 (2µ), ANA4 (4µg) y el grupo CONTROL que recibió vehículo. En el Panel (A) se observa el sueño MOR, en el panel (B) el sueño NMOR y en el (C) la vigilia. Los resultados están expresados como la media \pm EE del tiempo acumulado (min) a lo largo de 24h de registro y el ciclo luz oscuridad está representado con una barra blanca-negra en el eje de las X. Los análisis estadísticos fueron hechos con una ANOVA mixta que indicó una interacción significativa grupo \times tiempo para el sueño MOR y las diferencias específicas evaluadas con las ANOVAs subsidiarias (* $p < 0.05$). Es importante mencionar que algunos de los EE son muy pequeños para ser apreciados en las gráficas.

Por otra parte, la administración aguda de oleamida a $25\mu\text{g}$ aumentó significativamente el sueño MOR en comparación con el grupo control (Gráfica 2). El análisis estadístico con la ANOVA mixta mostró que hay una interacción significativa de grupo x tiempo para el sueño MOR ($F_{7.75,51.67}=288$, $p<0.05$, $\epsilon=0.112$) y diferencias significativas desde la hora 6 a la 24, aunque no todas las horas fueron significativas, con las ANOVAs subsidiarias (Tabla 2).

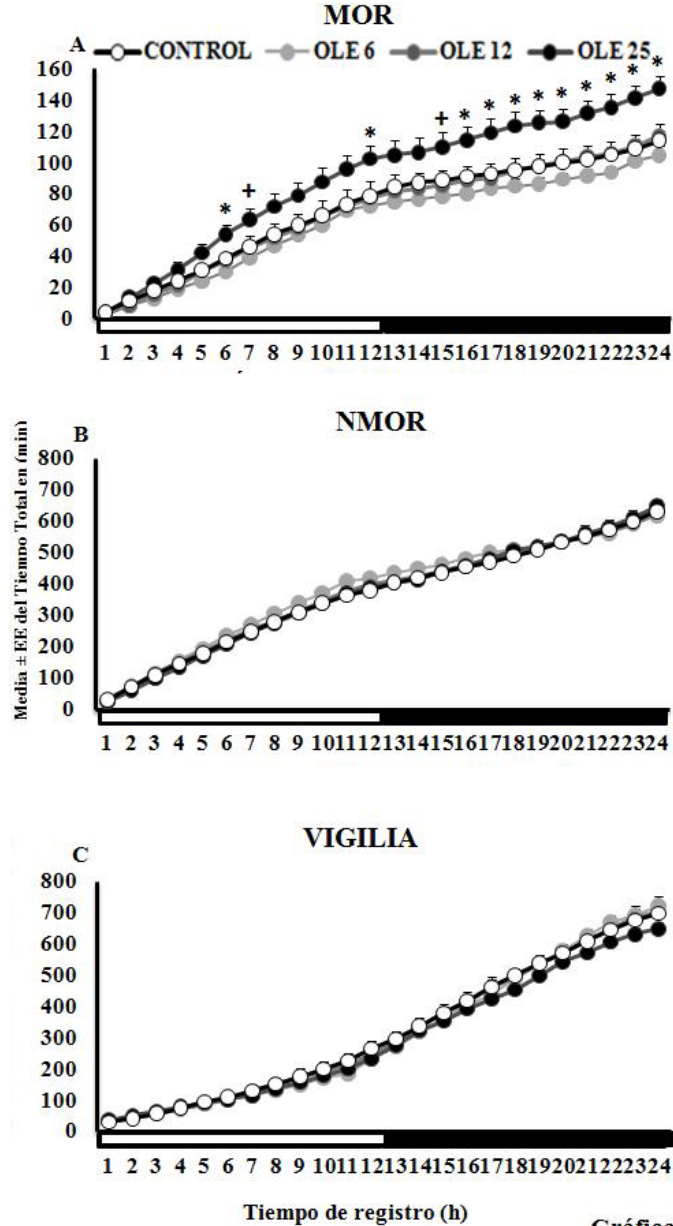
Administración Aguda de Oleamida
ANOVA subsidiaria de sueño MOR

Hora	Significancia
6	$F(3,20) = 4.03$ *
7	$F(3,20) = 3.17$ +
12	$F(3,20) = 3.12$ *
15	$F(3,20) = 3.45$ +
16	$F(3,20) = 4.28$ *
17	$F(3,20) = 4.86$ *
18	$F(3,20) = 6.22$ *
19	$F(3,20) = 7.01$ *
20	$F(3,20) = 5.96$ *
21	$F(3,20) = 7.67$ *
22	$F(3,20) = 7.72$ *
23	$F(3,20) = 7.78$ *
24	$F(3,20) = 7.01$ *

* $p<0.05$ vs CONTROL
+ $p<0.05$ vs OLE6 y OLE12

Tabla 2

**ADMINISTRACIÓN AGUDA
CURVA DOSIS RESPUESTA DE OLEAMIDA**



Gráfica 2

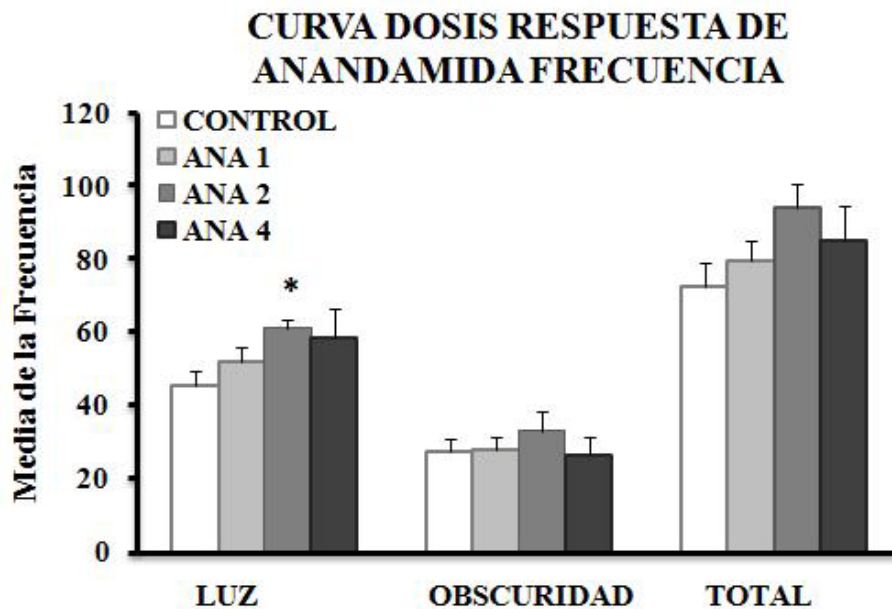
Gráfica 2. Curva dosis respuesta de oleamida en el ciclo sueño vigilia. Muestra a los grupos OLE 6 (6 μ g), OLE12 (12 μ g), OLE25 (25 μ g) y el grupo CONTROL que recibió vehículo. En el Panel (A) se observa el sueño MOR, en el panel (B) el sueño NMOR y en el (C) la vigilia. Los resultados están expresados como la media \pm EE del tiempo acumulado (min) a lo largo de 24h de registro y el ciclo luz obscuridad está representado con una barra blanca-negra en el eje de las X. Los análisis estadísticos fueron hechos con una ANOVA mixta que indicó una interacción significativa grupoxtiempo para el sueño MOR y las diferencias específicas evaluadas con las ANOVAs subsidiarias. Las diferencias contra el grupo CONTROL fueron marcadas con (*) $p < 0.05$ y las diferencias entre OLE6 y OLE12 con (+) $p < 0.05$. Es importante mencionar que algunos de los EE son muy pequeños para ser apreciados en las gráficas.

De forma muy similar que con anandamida la vigilia y el sueño NMOR no mostraron diferencias significativas y el tiempo que aumentó el sueño MOR fue a costa de una pequeña disminución de la vigilia (Gráfica 2).

Para la curva dosis respuesta de anandamida y oleamida se utilizó el mismo grupo control, ya que los experimentos se hicieron al mismo tiempo. Sin embargo, se graficaron en distintas figuras ya que los efectos se pueden apreciar con mejor claridad por separado (Gráfica 1y 2)

El aumento de sueño MOR producido por la administración de 2µg de anandamida se debe a un aumento de la frecuencia de los episodios de sueño MOR más que a cambios en la duración media de los episodios. Mientras que de forma muy parecida aunque no significativa, el aumento de sueño MOR producido por la administración de 25 µg oleamida mostró una tendencia a aumentar la frecuencia y no la duración de los episodios de sueño MOR. La administración aguda de 2µg de anandamida aumentó significativamente la frecuencia de los episodios de sueño MOR durante la fase de luz ($H_3=8.49$, $p<0.05$) con respecto al control

(Gráfica 3). Un patrón similar se observó con la administración de 25µg de oleamida, aunque no hubo diferencias significativas.



Gráfica 3

Gráfica 3. Frecuencia de los episodios de sueño MOR en el ciclo luz- oscuridad y durante el total de las 24h Muestra la frecuencia del sueño MOR bajo los efectos de las 3 dosis utilizadas de anandamida. Los resultados se expresan como la media± EE de la frecuencia del sueño MOR para las dosis de anandamida ANA1 (1µg), ANA2 (2µg), ANA4 (4µg) y el CONTROL (vehículo). El análisis estadístico con la prueba de Kruskal-Wallis revela diferencias significativas entre los grupos y el test post hoc U de Mann Whitney indica diferencias significativas entre ANA2 y el CONTROL (*p<0.05) en la fase de luz.

Administración Subcrónica y Abstinencia de Anandamida y Oleamida

La administración subcrónica (15 días) de anandamida u oleamida se llevó a cabo con las dosis de 2 y 25µg respectivamente, ya que estas dosis fueron las que aumentaron el sueño MOR durante la administración aguda.

Los resultados muestran que la administración subcrónica de anandamida u oleamida aumentan el sueño MOR significativamente (Gráfica 4). La ANOVA mixta mostró una interacción significativa de grupo x tiempo para el sueño MOR ($F_{4,95, 37.15}=3.87$, $p<0.05, \epsilon=0.108$). Ambos, anandamida y oleamida, producen efectos similares a diferentes dosis. Se observa que la administración subcrónica facilita aún más el aumento de sueño MOR. Los endocannabinoides producen un aumento significativo de sueño MOR desde la 5ta hora hasta las 24h, como se muestra en la Tabla 3 de las ANOVAs subsidiarias. La vigilia y el sueño NMOR, no mostraron diferencias significativas.

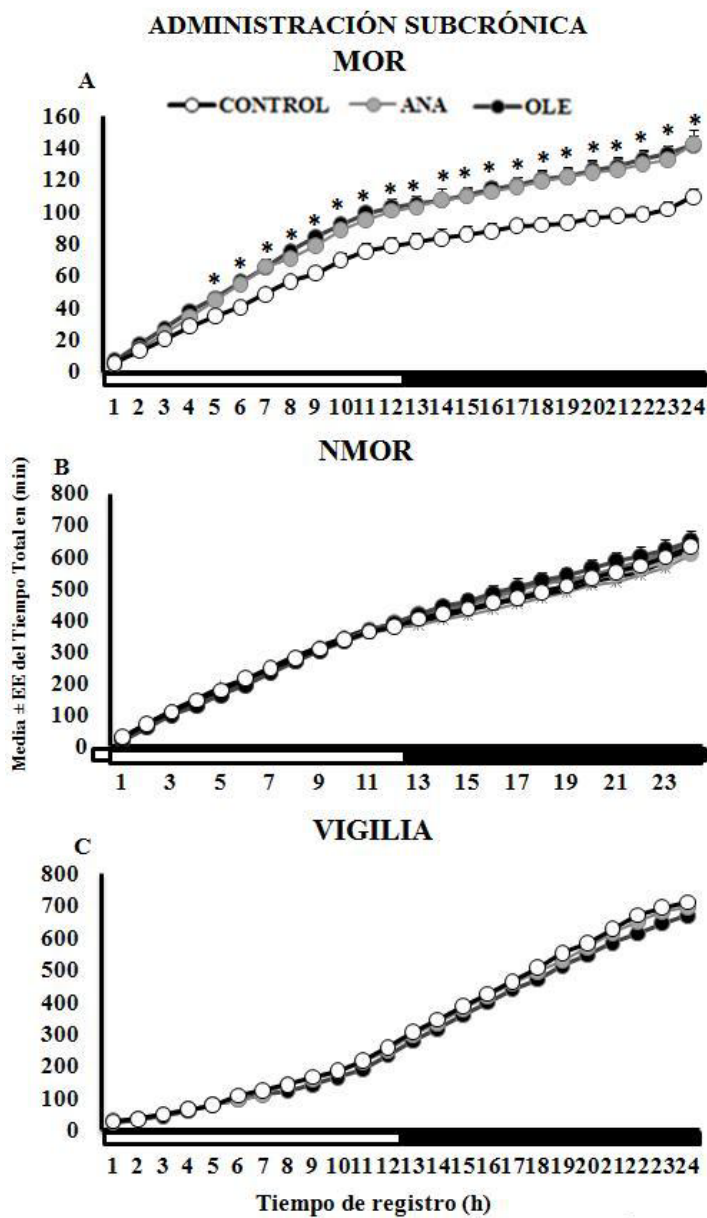
**Administración Subchronica
ANOVA subsidiaria de sueño MOR**

Hora	Significancia
5	F(2,15) = 3.88 *
6	F(2,15) = 5.14 *
7	F(2,15) = 6.53 *
8	F(2,15) = 5.86 *
9	F(2,15) = 7.55 *
10	F(2,15) = 7.00 *
11	F(2,15) = 5.49 *
12	F(2,15) = 5.24 *
13	F(2,15) = 4.89 *
14	F(2,15) = 5.67 *
15	F(2,15) = 6.60 *
16	F(2,15) = 7.83 *
17	F(2,15) = 7.55 *
18	F(2,15) = 8.03 *
19	F(2,15) = 8.43 *
20	F(2,15) = 7.47 *
21	F(2,15) = 7.81 *
22	F(2,15) = 7.83 *
23	F(2,15) = 8.38 *
24	F(2,15) = 7.51 *

*p<0.05 vs CONTROL

Tabla 3

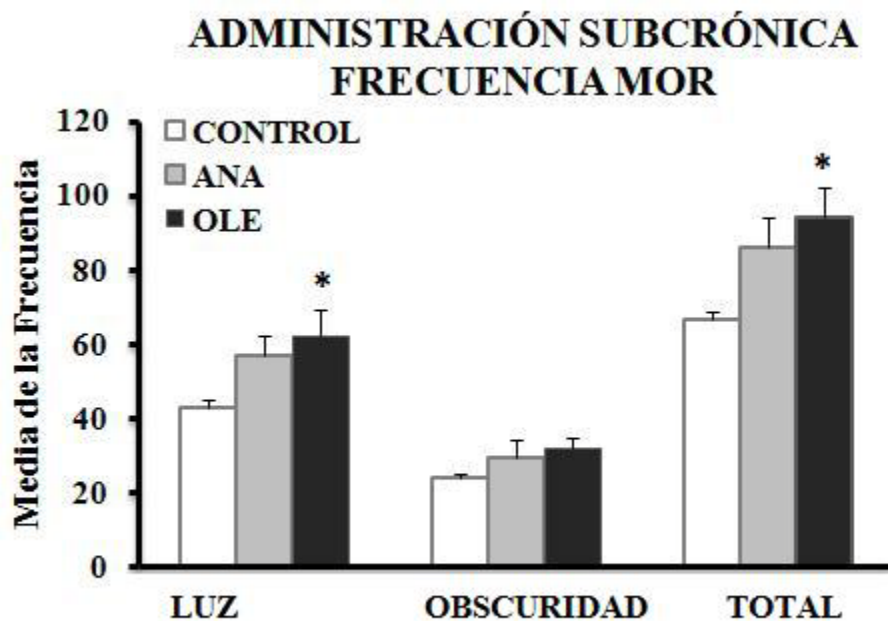
Ahora bien, como en los otros experimentos el aumento de sueño MOR se debe a una reducción no significativa de la vigilia (Gráfica 4).



Gráfica 4

Gráfica 4. Administración subcrónica de anandamida u oleamida en el ciclo sueño vigilia. Se muestran los grupos de ANA 2 (2 μ g), OLE 25 (25 μ) y el grupo CONTROL (vehículo) tras 15 días de administración. En el Panel (A) se observa el sueño MOR, en el panel (B) el sueño NMOR y en el (C) la vigilia. Los resultados están expresados como la media \pm EE del tiempo acumulado (min) a lo largo de 24h de registro y el ciclo luz oscuridad está representado con una barra blanca-negra en el eje de las X. Los análisis estadísticos fueron hechos con una ANOVA mixta que indicó una interacción significativa grupoxtiempo para el sueño MOR y las diferencias específicas evaluadas con las ANOVAs subsidiarias muestran las diferencias contra el grupo CONTROL (* $p < 0.05$). Es importante mencionar que algunos de los EE son muy pequeños para ser apreciados en las gráficas.

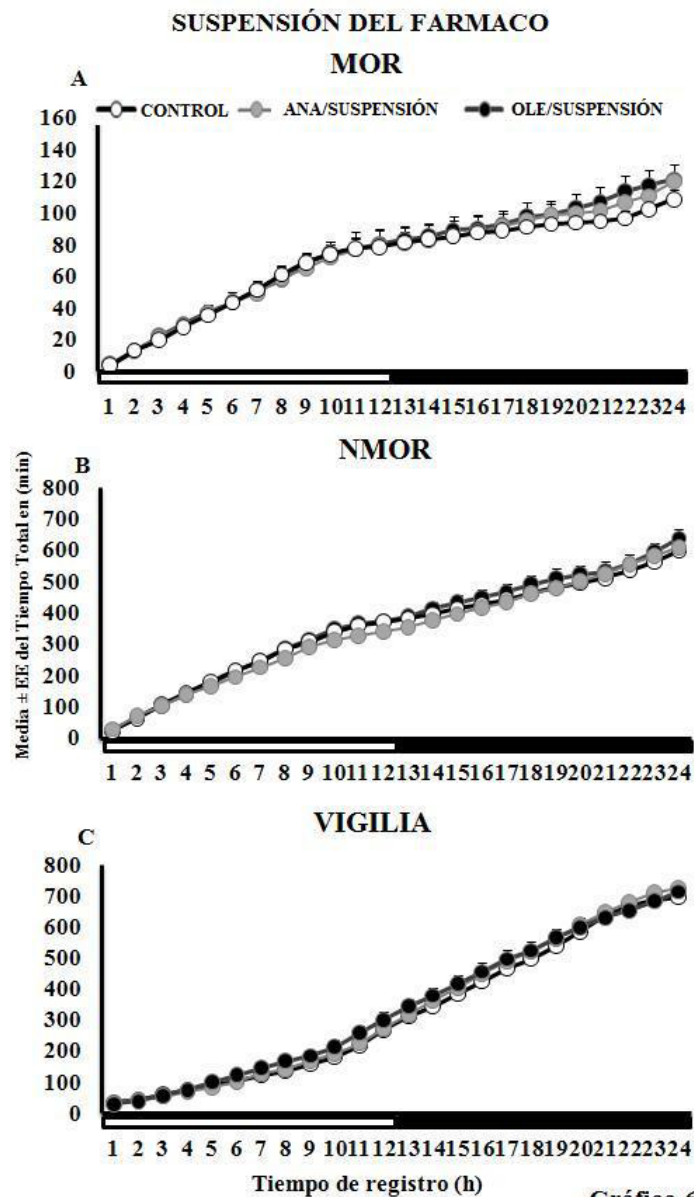
El aumento observado después de la administración subcrónica de anandamida fue producido al parecer por una tendencia a aumentar de la frecuencia del sueño MOR más que por aumentar la duración media de los episodios. La administración subcrónica de oleamida aumentó significativamente la frecuencia del sueño MOR durante el periodo de luz ($H_2 = 6.23$, $p < 0.05$) y el tiempo total ($H_2 = 8.05$, $p < 0.05$) ver gráfica 5.



Gráfica 5

Gráfica 5. Frecuencia de los episodios de sueño MOR en la fase de luz, oscuridad y el tiempo total de 24h en la administración subcrónica de anandamida u oleamida. Los resultados están expresados como la media \pm EE de la frecuencia del sueño MOR para ANA (2 μ g), OLE (μ g) y el grupo CONTROL (vehículo) después de 15 días de administración. Los análisis estadísticos con el test de Kruskal-Wallis, indican diferencias significativas entre los grupos de OLE y el CONTROL, en la fase de luz y en el tiempo total (* $p < 0.05$).

En el día 16 todos los grupos administrados subcrónicamente durante 15 días con canabinoides fueron administrados con vehículo. Mostramos que el retiro súbito de los canabinoides tras la administración subcrónica no produjo cambios. Los animales que habían recibido oleamida o anandamida por 15 días mostraron un ciclo sueño vigilia igual al de los controles cuando les fue retirado el fármaco (Gráfica 6).

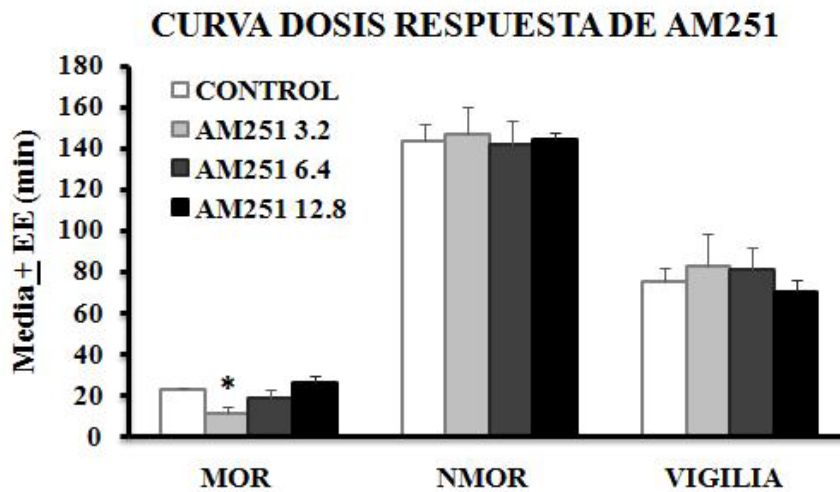


Gráfica 6

Gráfica 6. Efectos de la suspensión súbita de los endocannabinoides (abstinencia) en el ciclo sueño vigilia. Se muestran los grupos: ANA/SUSPENSIÓN, OLE/SUSPENSIÓN, y el grupo CONTROL que recibió vehículo todo el tiempo. Se observa en el Panel (A) el sueño MOR, en el panel (B) el sueño NMOR y en el (C) la vigilia. Los resultados están expresados como la media \pm EE del tiempo acumulado (min) a lo largo de 24h de registro y el ciclo luz oscuridad está representado con una barra blanca-negra en el eje de las X. Los análisis estadísticos fueron hechos con una ANOVA mixta que indicó que no hay diferencias significativas.

Curva Dosis Respuesta de AM251

En gráfica 7, se muestra la curva hecha para ver los efectos del AM251 sobre el sueño. La dosis de 3.2 μ g disminuye el sueño MOR durante las primeras 4h de la administración y después regresa a la línea base en las siguientes 20h. Debido a esto, los datos presentados son de las 4h seguidas a la administración. Se utilizó una ANOVA de una vía para este análisis, la cual indicó diferencias significativas con el grupo control ($F_{3, 20} = 3.11$, $p < 0.05$). Se observó una reducción del sueño MOR con la dosis de 3.2 μ g.



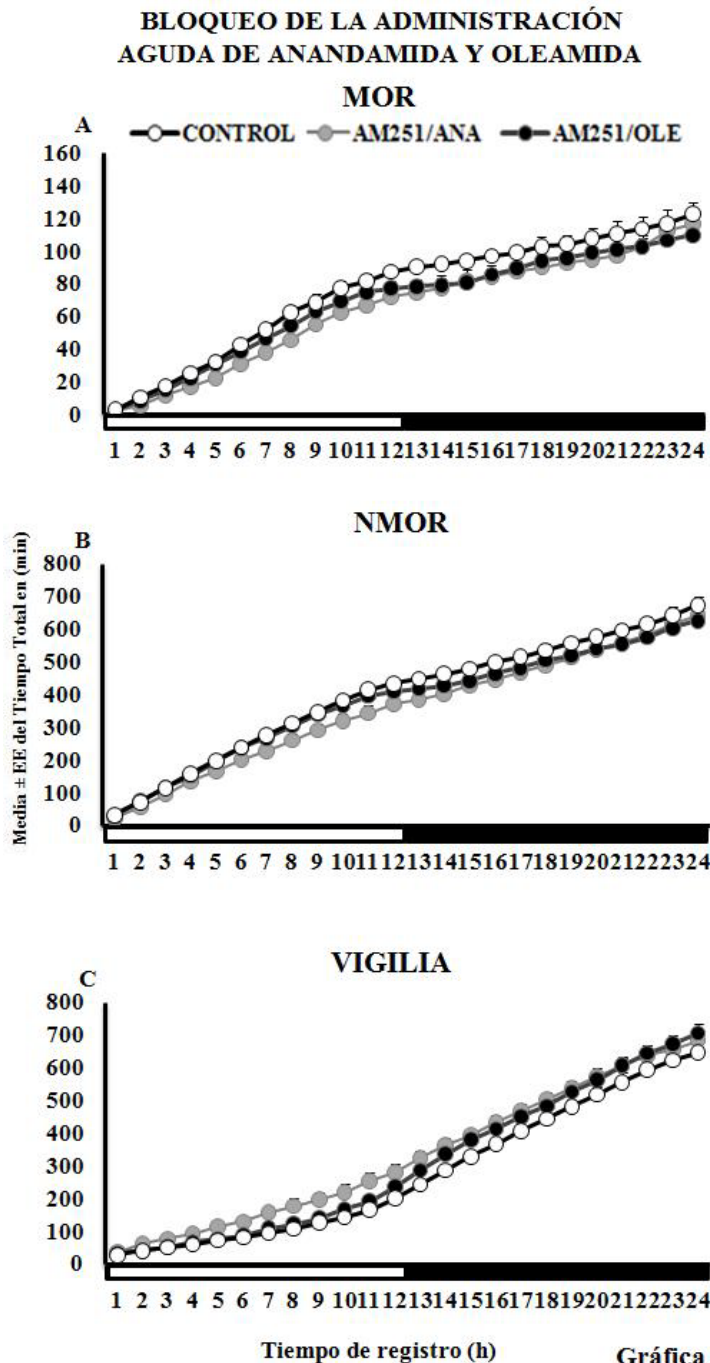
Gráfica 7

Gráfica 7. Curva dosis respuesta de AM251. Los resultados están expresados como la media \pm del tiempo en minutos para las primeras 4h de registro usando 3 dosis de AM251: AM251 3.2 (3.2 μ g), AM251 6.4 (6.4 μ g), AM251 12.8 (12.8 μ g) y el grupo CONTROL (vehículo). El análisis consistió en una ANOVA de una vía que indicó diferencias significativas en el sueño MOR y una prueba post hoc LSD que indicó diferencias significativas entre el AM251 3.2 y el grupo CONTROL (* $p < 0.05$).

Bloqueo de la administración aguda y subcrónica de anandamida y oleamida

Con el fin de tratar de prevenir los efectos de la administración aguda y subcrónica de anandamida y oleamida se administró el antagonista al CB1, el AM51 a una dosis de 3.2µg 15 minutos antes de la administración aguda o subcrónica (día 15). Como se puede ver en las gráficas 8 y 9 la administración del antagonista al CB1 previene los efectos de anandamida y oleamida sobre el sueño MOR en la administración aguda y subcrónica.

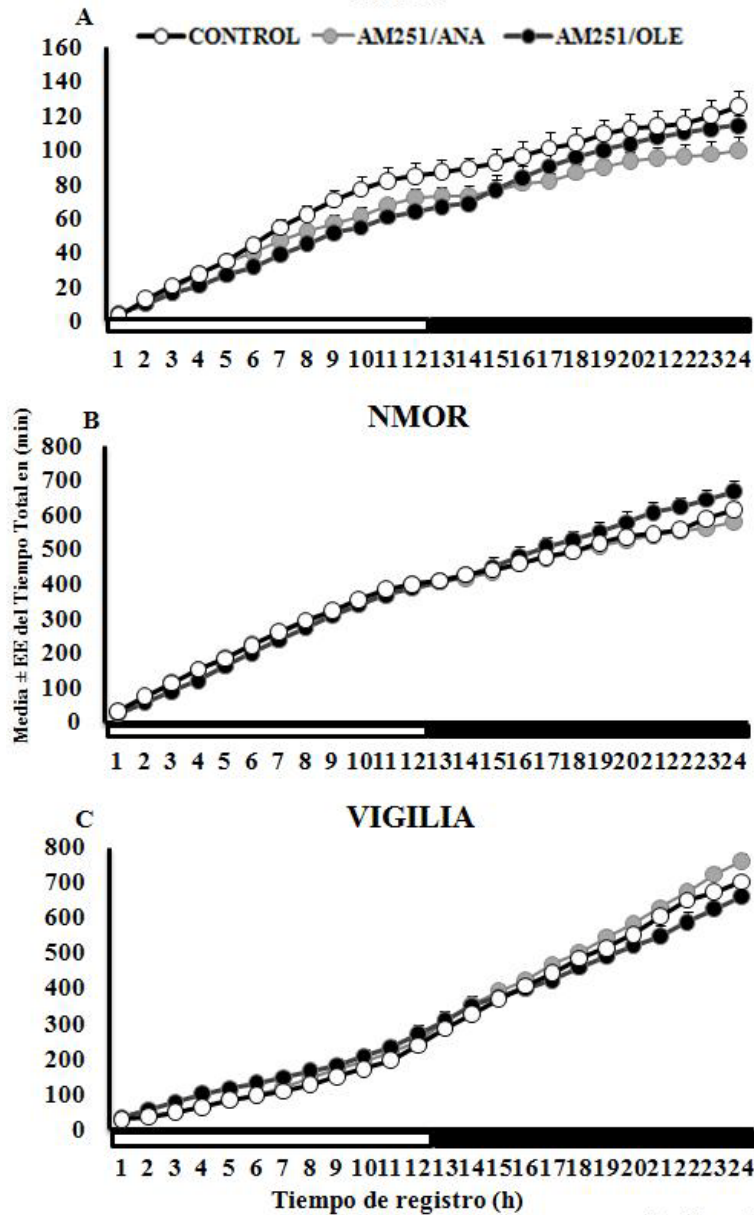
Por último, analizamos las latencias de sueño no MOR y sueño MOR en cada uno de los experimentos descritos pero no se encontraron diferencias significativas con el grupo control.



Gráfica 8

Gráfica 8. Bloqueo de los efectos inducidos por la administración aguda de anandamida y oleamida en el ciclo sueño vigilia con AM251. Se observan a los grupos AM251/ANA (AM251 3.2 μ g 15 min antes de ANA 2 μ g), AM251/OLE (AM251 3.2 μ g 15 min antes de OLE 25 μ g) y el grupo CONTROL (DMSO, 15 min antes del vehículo con salina y 5% de ETOH). En el Panel (A) se muestra el sueño MOR, en el panel (B) el sueño NMOR y en el (C) la vigilia. Los resultados están expresados como la media \pm EE del tiempo acumulado (min) a lo largo de 24h de registro y el ciclo luz obscuridad está representado con una barra blanca-negra en el eje de las X. Los análisis estadísticos fueron hechos con una ANOVA mixta que indicó que no había diferencias significativas. Es importante mencionar que algunos de los EE son muy pequeños para ser apreciados en las gráficas.

**BLOQUEO DE LA ADMINISTRACIÓN
SUBCRÓNICA DE ANANDAMIDA Y OLEAMIDA
MOR**



Gráfica 9

Gráfica 9. Bloqueo de los efectos inducidos por la administración subcrónica de anandamida y oleamida en el ciclo sueño vigilia con AM251. Muestra a los grupos de AM251/ANA (AM251 3.2µg 15 min antes de ANA 2µg), AM251/OLE (AM251 3.2µg 15 min antes de OLE 25µg) y el grupo CONTROL (DMSO, 15 min antes del vehículo con salina y 5% de ETOH). En el Panel (A) se observa el sueño MOR, en el panel (B) el sueño NMOR y en el (C) la vigilia. No se encontraron diferencias significativas, lo que muestra que la previa administración del antagonista al CB1 previene los efectos inducidos por anandamida y oleamida en el sueño.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Los resultados indican que la administración aguda y subcrónica de anandamida (2 μ g) u oleamida (25 μ g) aumentan el sueño MOR. A estas dosis ambos endocannabinoides producen efectos muy similares. Nuestros datos apoyan hallazgos previos donde se había mostrado que la administración aguda de anandamida produce un aumento del sueño MOR¹²⁴. Además, por primera vez hemos reportado un estudio donde se describen los efectos de los endocannabinoides en el sueño por 24h después de una sola administración. También hemos podido demostrar que estos endocannabinoides son capaces de aumentar el sueño MOR durante 2 semanas. En cuanto al sueño NMOR, no encontramos cambios inducidos por la administración de estos endocannabinoides aunque previamente se había reportado que la anandamida aumenta el sueño NMOR¹²⁴ y que la oleamida acorta la latencia al sueño^{126,127}, y aumenta el sueño NMOR cuando es administrada sistémicamente¹³⁵. Una explicación para estas diferencias es que usamos dosis diferentes a los experimentos ya reportados. Además, hicimos los registros electroencefalográficos en el hipocampo, lo cual pudo haber evitado la observación de la

expresión robusta de ondas lentas. Al llevar a cabo las curvas dosis respuesta para los endocannabinoides nos hemos podido dar cuenta que el margen para inducir cambios en el sueño con la administración de cannabinoides como la anandamida y la oleamida es muy pequeño.

En la curva dosis respuesta de anandamida podemos observar que la dosis más alta no produjo efectos en el sueño. Esto se puede explicar considerando que los cannabinoides producen una U invertida. Se ha reportado, por ejemplo, que en la ansiedad, dosis bajas de anandamida producen un efecto ansiolítico, mientras que dosis altas producen lo contrario, ansiogénesis, induciendo así un efecto bifásico¹³⁶. Por otra parte, la administración de AM404 (un inhibidor selectivo de un transportador putativo de anandamida) produce una curva dosis respuesta de tipo U invertida en la prueba de preferencia condicionada de lugar¹³⁷.

La administración subcrónica de anandamida u oleamida aumenta el sueño MOR, ambos endocannabinoides producen un efecto muy similar, causando un aumento desde la 5ta hora post administración a las 24h y manteniendo este aumento gracias a un incremento en la frecuencia de los episodios de sueño MOR. El aumento de sueño MOR fue aún mayor después de la administración

crónica. Una explicación potencial para este fenómeno es que la administración subcrónica de anandamida podría producir un aumento en la B_{max} del receptor a cannabinoides aumentando el número de receptores¹³³.

Posterior a la suspensión súbita de la administración de los endocannabinoides, los grupos que recibieron anandamida u oleamida durante 15 días presentaron un ciclo sueño vigilia muy similar al de los animales control, cuando el día 16 les fue retirado el fármaco. Lo que indica que no hay efectos de abstinencia, que se vean reflejados en el sueño. En cuanto a la oleamida se ha reportado que ésta difícilmente puede inducir dependencia física¹³⁸ y que la anandamida es capaz de producir este efecto pero solo a dosis muy altas (20mg/kg i.p.)¹³⁹.

Los resultados de la administración aguda y subcrónica de estos endocannabinoides indican que ambos pueden facilitar de alguna manera los mecanismos de inicio de sueño MOR. Ahora bien, hay que remarcar que a la dosis de anandamida utilizada en estos estudios (2 μ g) no pudimos reproducir los efectos reportados previamente con la dosis de 1.25 μ g¹²⁴.

Para probar la potencial función del CB1 como el mediador de los efectos producidos por los endocannabinoides en el sueño MOR, se usó un antagonista al receptor CB1, el AM251. Los resultados muestran que el AM251 reduce el sueño MOR en las primeras 4 horas post administración, datos que apoyan las observaciones previas de Santucci¹²⁶, quien administró el antagonista al receptor CB1 (SR141716A) causando una disminución del sueño MOR y no MOR, y como consecuencia un aumento de la vigilia. En el caso de la curva dosis respuesta del AM251 el registro electroencefalográfico fue de 24h, pero solo reportamos los efectos en las primeras 4h post administración, debido que en este lapso de tiempo fue cuando se observaron los efectos en el sueño MOR. Es interesante también que el AM251 induzca efectos mayores a menores dosis. Parece que este antagonista produce un patrón similar a los efectos de los agonistas al CB1, una U invertida. No tenemos datos que expliquen los mecanismos subyacentes a esta conducta farmacológica pero observamos la ocurrencia de este fenómeno.

En este contexto, el bloqueo de los efectos de estos endocannabinoides en el sueño da un fuerte soporte experimental al

papel del receptor CB1 en la generación del sueño MOR. Estos hallazgos apoyan los resultados estudios previos, donde se ha mostrado que la administración del SR141617A bloquea los efectos producidos por anandamida y oleamida en el sueño y también previene el rebote de sueño MOR^{124,127,130}.

Los endocannabinoides no son las únicas moléculas que promueven el sueño. La cortistatina, la hormona concentradora de melanina y muchas otras sustancias más, incluyendo algunos neurotransmisores tienen efectos sobre el sueño. El sueño en general depende no solo de la acción de una familia de moléculas como los endocannabinoides sino de la actividad de muchas otras moléculas más como proteínas, prostaglandinas y adenosina, por ejemplo.

En resumen, se ha encontrado que tanto la administración aguda como subcrónica de anandamida y oleamida aumenta el sueño MOR y que estos cambios se deben a un aumento en la frecuencia de los episodios ya sea por una tendencia o por un aumento significativo. Además, la suspensión súbita de estos endocannabinoides después de la administración subcrónica no produce efectos de abstinencia en el ciclo sueño vigilia. Por último, se ha proporcionado evidencia que muestra que los efectos de estos endocannabinoides en el sueño se

deben a la activación del CB1. En conclusión, estos estudios apoyan la función de los endocannabinoides en la regulación del sueño MOR.

Actualmente, los tratamientos farmacológicos para inducir sueño son pocos. La mayoría de la medicación utilizada no induce sueño delta (o profundo) e interfiere con el sueño MOR. Además, de que algunos producen dependencia y abstinencia¹⁴⁰. Debido a esto es sumamente importante estudiar los efectos de otras moléculas como los endocannabinoides. La investigación de sus mecanismos de acción, la dosificación y las futuras pruebas en modelos animales que nos permitan estudiar sus efectos en el insomnio posiblemente proveerán el desarrollo de nuevos tratamientos para mejorar el sueño en pacientes. Los efectos terapéuticos a los que me refiero no se limitan a los agonistas endógenos del CB1. Falta por explorar el uso de agonistas sintéticos o fármacos que inhiban la degradación enzimática de los endocannabinoides, por mencionar algunos. En conclusión, esta es una línea de investigación muy reciente pero prometedora para el futuro desarrollo terapéutico de los cannabinoides.

AGRADECIMIENTOS:

Los trabajos presentados en esta tesis se realizaron gracias al apoyo otorgado por el donativo 24768 del CONACyT a OPG y a la beca doctoral del CONACyT otorgada a Mónica Andrea Herrera Solís.

REFERENCIAS

¹Gottesmann C. Neurophysiological support of consciousness during waking and sleep. *Prog Neurobiol.* 59:469-508, 1999.

²Revisado en: Datta S, Maclean RR. Neurobiological mechanism for the regulation of mammalian sleep-wake behavior: reinterpretation of historical evidence and inclusion of contemporary cellular and molecular evidence. *Neurosci Biobehav Rev.* 5:775-824. 2007.

³Aserinsky E. The discovery of REM sleep. *J Hist Neurosci.* 5:213-27, 1996.

⁴Aserinsky E, Kleiman N. Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science.* 118:273-4, 1953.

⁵Dement W, Kleitman N. Cyclic variations in EEG during sleep and their relation to eye movements, body, motility, and dreaming. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl.* 9:673-90, 1957.

⁶Dement W. The occurrence of low voltage, fast, electroencephalogram patterns during behavioral sleep in the cat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl.* 10: 291-6, 1958.

⁷Jouvet M, Michel F. Corrélations électromyographiques du sommeil chez le chat dédortiqué et mésencephalique chronique. *C R Soc Biol.* 153:422-25, 1959.

⁸KygerMH, Roth T, Dement WC. Principles and practice of sleep medicine. 5th Edition. 2009.

⁹Drucker-Colin R, Aguilar-Robledo R, Garcia-Hernandez F, Fernandez-Cancino F, Bermudez Rattoni F. Fetal suprachiasmatic nucleus transplants: diurnal rhythm recovery of lesioned rats. *Brain Res.* 311:353-7, 1984.

¹⁰Cassone VM, Chesworth MJ, Armstrong SM. Entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin depends upon the hypothalamic suprachiasmatic nuclei. *Physiol Behav.* 36:1111-21, 1986.

¹¹Jonhson RF, More RY, Morin LP. Loss of entrainment and anatomical plasticity after lesions of the hamster retinohypothalamic tract. *Brain Res.* 44:231-42, 1988.

¹²Mosko S, Moree RY. Retinohypothalamic tract development: alternation by supraquiasmatic lesions in the neonatal rat. *Brain Res.* 164: 1-15, 1979.

-
- ¹³Gillette MU, Sejnowski TJ. Physiology Biological clocks coordinately keep life on time. *Science*. 309: 1196-98, 2005.
- ¹⁴Moruzzi G, Magoun HW. Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroenceph Clin Neurophysiol*. 1:455-73, 1949.
- ¹⁵Revisado en: Sakai K, Crochet S. A neural mechanism of sleep and wakefulness. *Sleep and Biological Rhythms*. 1: 29-42, 2003.
- ¹⁶Hobson JA, Mc Carley RW, Wyzinski PW. Sleep cycle oscillation reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science*. 189: 55-8, 1975.
- ¹⁷Jones BE. From waking to sleeping: neuronal and chemical substrates. *Trends Pharmacol Sci*. 11:578-86, 2005.
- ¹⁸Aston-Jones G, Bloom FE. Norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats exhibit pronounced res ponded responses to non-noxious environmental stimuli. *J Neurosci*. 1:887-900, 1981.
- ¹⁹Aston-Jones G, Bloom FE. Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *J neurosci*. 1-876-86, 1981.
- ²⁰Lydic R, McCarley RW, Hobson JA. The time-course of dorsal rafe discharge, PGO waves, and muscle tone averaged across multiple sleep cycles. *Brain Res*. 274: 365-70, 1983.
- ²¹McGinty DJ, Harper RM. Dorsal raphe neurons: depression of firing during sleep in cats. *Brain Res*. 101: 569-75, 1976.
- ²²Datta S. Cellular basis of ponto-geniculo-occipital wave generation and modulation. *Cell Mol Neurobiol*. 17: 341-65, 1997.
- ²³Sakai K, Crochet S. Role of dorsal raphe neurons in paradoxical sleep generation in cat: no evidence for a serotonergic mechanism. *Eur J Neurosci*. 13: 103-12, 2001.
- ²⁴Sakai K, Crochet S. A neural mechanism of sleep and wakefulness. *Sleep and Biological Rhythms*. 1: 29-42, 2003.
- ²⁵Boutrel B, Moncaca C, Hen R, Hamon M, Adrien J. Involment of 5HT1A receptors in homeostatic and stress induced adaptative regulation of paradoxical sleep: studies in 5HT1A knock-out mice. *J Neurosci*. 22: 4686-92, 2002.
- ²⁶Monti JM, Jantos H. Dose-dependent effects of 5HT1A receptor agonist 8-OH-DPAT on sleep and wakefulness in rat. *J Sleep Res*. 1:169-75, 1992.
- ²⁷Garcia-Rill E, Skinner RD, Conrad C, Mosley D, Cambell C. Projections of the mesencephalic locomotor region in the rat. *Brain Res Bull*. 17: 33-40, 1986.
- ²⁸Garcia-Rill E, Skinner RD, Fitzgerald JA. Activity in the mesencephalic locomotor region during locomotion. *Exp Neurol*. 82: 609-622, 1983.
- ²⁹Datta S. Neuronal activity in the peribraquial area: relationship to behavioral state control. *Neurosci Biobehav Rev*. 19: 67-84, 1995.

-
- ³⁰Datta S, Siwel DF. Single cell activity patterns of pedunculo-pontine tegmentum neurons across the sleep-wake cycle in freely moving rats. *J Neurosci Res.* 70:611-21, 2002.
- ³¹Steriade M, Oakson G, Ropert N. Firing rates and patterns of midbrain reticular neurons during steady and transitional states of the sleep-waking cycle. *Exp Brain Res.* 46:37-51, 1982.
- ³²Kitskiss A, Steriade M. Immediate behavioral effects of kainic acid injections into the midbrain reticular core. *Behav Brain Res.* 3:361-80, 1981.
- ³³Maloney KJ, Mainville L, Jones BE. c-Fos expression in dopaminergic and GABAergic neurons of the ventral mesencephalic tegmentum after paradoxical sleep deprivation and recovery. *Eur J Neurosci.* 15: 774-78, 2002.
- ³⁴Mirenovic J, Schultz W. Preferential activation of midbrain dopamine neurons by appetitive rather than aversive stimuli. *Nature.* 379:449-51, 1996.
- ³⁵Feenstra MG, Botterblom MH, Mastenbroek S. Dopamine and noradrenaline efflux in the prefrontal cortex in the light and dark period: effects of novelty and handling and comparison to the nucleus accumbens. *Neuroscience.* 100:741-8, 2000.
- ³⁶Monti JM, Fernández M, Jantos H. Sleep during acute dopamine D1 agonist SKF 38393 or D1 antagonist SCH 23390 administration in rats. *Neuropsychopharmacology.* 3:153-62, 1990.
- ³⁷Saper CB, Chou TC, Scammell TE. The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness. *Trends Neurosci.* 24:726-31, 2001.
- ³⁸McGinty DJ. Somnolence, recovery and hyposomnia following ventro-medial diencephalic lesions in the rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 26: 70-9, 1969.
- ³⁹Swett CP, Hobson JA. The effects of posterior hypothalamic lesion on behavioral and electrographic manifestation of sleep and waking in cats. *Arch Ital Biol.* 106: 283-93, 1968.
- ⁴⁰Sakai K, Yoshimoto Y, Luppi PH, Fort P, el Mansari M, Salvert D, Jouvet M. Lower brainstem afferents to the cat posterior hypothalamus: a double-labeling study. *Brain Res Bull.* 24: 437-55, 1990.
- ⁴¹Koyama Y, Kodama T, Takahashi K, Okai K, Kayama Y. Firing properties of neurones in the laterodorsal hypothalamic area during sleep and wakefulness. *Psychiatry Clin Neurosci.* 56: 339-40, 2002.
- ⁴²Martínez-Rodríguez JE, Iranzo A, Santamaría J. Narcolepsy. *Med Clin.* 119:749-54, 2002.
- ⁴³Detari L, Juhasz G, Kukorelli T. Firing properties of cat basal forebrain neurons during sleep-wakefulness cycle. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 58: 362-8, 1984.
- ⁴⁴Day J, Damsma G, Fibiger HC. Cholinergic activity in the rat hippocampus, cortex and striatum correlates with locomotor activity: an in vivo microdialysis study. *Pharmacol Biochem Behav.* 38: 723-9, 1991.
- ⁴⁵Llinas RR, Steriade M. Bursting of thalamic neurons and states of vigilance. *J Neurophysiol.* 95: 3297-308, 2006.
- ⁴⁶McGinty DJ, Serman MB. Sleep suppression after basal forebrain lesions in the cat. *Science.* 160: 1253-55, 1968.

-
- ⁴⁷John J. Kumar VM. Effect of NMDA lesion of the medial preoptic neurons on sleep and other functions. *Sleep*. 21: 587-98, 1998.
- ⁴⁸Gong H, McGinty D, Guzman-Marin R, Chew KT, Stewart D, Szymusiak R. Activation of c-fos in GABAergic neurons in the preoptic area during sleep and in response to sleep deprivation. *J Physiol*. 556: 935-46, 2004.
- ⁴⁹Khubchandani M, Jagannathan NR, Mallick HN, Mohan Kumar V. Functional MRI shows activation of medial preoptic area during sleep. *Neuroimage*. 26: 29-35, 2005.
- ⁵⁰Datta S, Maclean RR. Neurobiological mechanisms for the regulation of mammalian sleep-wake behavior: reinterpretation of historical evidence and inclusion of contemporary cellular and molecular evidence. *Neurosci Biobehav Rev*. 5:775-824, 2007.
- ⁵¹Hobson JA, Golberg M, Vivaldi E, Riew D. Enhancement of desynchronized sleep signs after pontine microinjection of muscarinic agonist bethanechol. *Brain Res*. 275: 127-36, 1983.
- ⁵²Shiromani PJ, McGinty DJ. Pontine neuronal response to local cholinergic infusion: relation to REM sleep. *Brain Res* 386:20-31, 1986.
- ⁵³Velazquez-Moctezuma J, Gillin JC, Shiromani PJ. Effect of specific M1, M2 muscarinic receptor agonists on REM sleep generation. *Brain Res*. 503:128-31, 1989.
- ⁵⁴Lydic R, Baghdoyan HA. Pedunculopontine stimulation alters respiration and increases Ach release in the pontine reticular formation. *Am J Physiol*. 264:544-55, 1993.
- ⁵⁵Kodama T, Takahashi Y, Honda Y. Enhancement of acetylcholine release during paradoxical sleep in the dorsal tegmental field of the cat brain stem. *Neurosci Lett*. 114: 277-82, 1990.
- ⁵⁶Hallanger AE, Wainer BH. Ascending projections from the pedunculopontine tegmental nucleus and the adjacent mesopontine tegmentum in rat. *J Comp Neurol*. 274: 483-515, 1988.
- ⁵⁷Mitani A, Ito K, Hallanger AE, Wainer BH, Kataoka K, McCarley RW. Cholinergic projections from the laterodorsal and pedunculopontine tegmental nuclei to the pontine gigantocellular tegmental field in the cat. *Brain Res*. 451:397-402, 1988.
- ⁵⁸Semba K, Fibiger HC. Afferent connections of the laterodorsal and the pedunculopontine tegmental nuclei in the rat: a retro- and antero-grade transport and immunohistochemical study. *J Comp Neurol*. 323: 387-410, 1992.
- ⁵⁹Datta S, Spoley EE, Patterson EH. Microinjection of glutamate into the pedunculopontine tegmentum induces REM sleep and wakefulness in rat. *Am J Physiol Regul Inter Comp Physiol*. 280: 752-9, 2001.
- ⁶⁰McCarley RW, Hobson JA. Neuronal excitability modulation over the sleep cycle: a structural and mathematical model. *Science*. 189: 58-60, 1975.
- ⁶¹Pace-Schott EF, Hobson A. The neurobiology of sleep: genetics, cellular physiology and subcortical networks. *Nature*. 3: 591-605, 2002.
- ⁶²Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *Journal of the American Chemical Society*. 86, 1646-7, 1964.

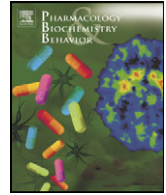
-
- ⁶³Mechoulam, R, Braun P, Gaoni Y. A stereospecific synthesis of (-)-delta I- and (-)-delta 1(6)-tetrahydrocannabinols. *J Am Chem Soc.* 89, 4552-4, 1967.
- ⁶⁴Mechoulam R, Gaoni Y. The absolute configuration of delta-I –tetrahydrocannabinol, the mayor active constituent of hashish. *Tetrahedron Lett.* 12: 1109-11, 1967.
- ⁶⁵Ashton C H. Pharmacology and effects of cannabis: a brief review. *Br J Psychiatry.* 178:101-6,2001
- ⁶⁶Russo E. History of Cannabis and its preparations in Saga, Science, and Sobriquet. *Chem Biodivers.* 4:1614-48, 2007.
- ⁶⁷Iversen L.L, *The science of marijuana.* Ed. Oxford. NY, 2000.
- ⁶⁸Maykut, MO. Health consequences of acute and choronic marijuana use. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 9: 209-38, 1985.
- ⁶⁹Nahas, GG. Marijuana: toxicity and tolerance. In *medical Aspects of Drug Abuse.* Ed. RichterRW. 16-36. Baltimore, MD: HARper & Row. 1975.
- ⁷⁰Grinspoon L, Babalar J B. *Marihuana, la medicina prohibida.* Ed. Paidós. Barcelona, España, 1997
- ⁷¹Adams, IB, Martin, BR. Cannabis:Pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction.* 91: 1585-1614, 1996.
- ⁷²Devane W A, Dysarz F A, Johnson M, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular Pharmacology* 34:605-13, 1988.
- ⁷³Mastuda LA, Lolait SJ, Browstein, MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346: 561-4, 1990.
- ⁷⁴Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a perifheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365: 61-5, 1993.
- ⁷⁵Iversen L. Cannabis and the brain. *Brain.* 126;1252-70, 2003.
- ⁷⁶Howlett AC, Bidaut-Russell M, Devane WA, Melvin LS, Johnson MR and Herkenham M. The cannabinoid receptor; biochemical, anatomical andbehavioral characterization. *Trends in Neurosciences.* 13; 420-3, 1990.
- ⁷⁷Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, and Rice KC. Characterization and localization of a canabinoid receptor in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *Journal of Neuroscience.* 11; 563-83, 1991
- ⁷⁸Mackie K, Hille B. Cannabinoids inhibit N-tipe calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89;3825-9, 1992.
- ⁷⁹Mackie K, Lai Y, Westenbroek R, Michell R. CAnnabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in ArT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci.* 15; 6552-61, 1995.

-
- ⁸⁰McAllister SD, Griffin G, Satin LS, Abood ME. Cannabinoid receptors can activate and inhibit G protein coupled inwardly rectifying potassium channels in a xenopus oocyte expression system. *JPharmacol Exp Ther.* 291; 618-26, 1999.
- ⁸¹Ameri, A. The effects of cannabinoids on brain. *Progress in Neurobiology.* 58:315-48. 1999.
- ⁸²Di Marzo V, Fontana A. Anandamide, an endogenous ligands of cannabinoid receptors. *Neurobiol Dis.* 5: 386-404. 1998.
- ⁸³Prospéro-García O, Herrera-Solís A, Prospéro-García A, Di Marzo V. Function of endocannabinoids and related compounds in sleep. In *Sleep Disorders: Diagnosis and Therapeutics.* Informa Healthcare. ED. Pandi-Perumal SR. UK. 259-267, 2008
- ⁸⁴Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. Isolation and structure of brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science.* 258:1946-9, 1992.
- ⁸⁵Felder CC, Glass M. Cannabinoid receptors and their endogenous agonists. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 38:179-200, 1998.
- ⁸⁶Hillard CL, Manna S, Greenberg MJ., DiCamelli R, Ross RA, Stevenson LA, Murphy V, Pertwee RG, Campbell WB. Synthesis and characterization of potent and selective agonists of the neuronal cannabinoid receptor (CB1). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 289, 1427-33, 1999.
- ⁸⁷Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological Reviews.* 54, 161-202, 2002.
- ⁸⁸Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, Lai Y, Ma LA, Mitchell RL. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol.* 48:443-50, 1995.
- ⁸⁹Childers SR, Sexton T, Roy MB. Effects of anandamide on cannabinoid receptors in rat brain membranes. *Biochem Pharmacol.* 47: 711-15, 1994.
- ⁹⁰Felder CC, Briley EM, Axelrod J, Simpson JT, Mackie K, Devane WA. Anandamide, an endogenous cannabinoid eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction. *Proc Natl Sci USA.* 90: 7656-60, 1993.
- ⁹¹Felder CC, Nielsen A, Briley EM, Palkovits M, Piller J, Axelrod J, Nguyen DN, Richardson JM, Riggan RM, Koppel GA, Paul SM, Becker GW. Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in the brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett.* 393:231-35, 1996.
- ⁹²Wang PC, Buu NT, Kruchel O, Genest J. Conjugation patterns of endogenous plasma catecholamines in human and rat. A new specific method for analysis of gluconide-conjugated catecholamines. *J Lab Clin Med.* 101:141-51, 1983.
- ⁹³Stella N, Schweitzer P, Piomelli D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* 388:773-78, 1997.

-
- ⁹⁴Sigiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 215:89-97, 1995.
- ⁹⁵Lerner RA, Siuzdak G, Prospéro-García O, Henriksen SJ, Boger DL, Cravatt BF. Cerebrodiene: a brain lipid isolated from sleep-deprived cats. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91: 9505–8, 1994.
- ⁹⁶Cravatt DF, Prospéro-García O, Siuzdak G, Gilula NB, Henriksen SJ, Boger DL, Lerner RA. Chemical characterization of a family of brain lipids that induce sleep. *Science.* 268: 1506–9, 1995.
- ⁹⁷Mechoulam R, Fride E, Hanus L, Sheskin T, Bisogno T, Di Marzo V, Bayewitch M. Anandamide may mediate sleep induction. *Nature.* 4: 25–6, 1997.
- ⁹⁸Murillo-Rodríguez E, Giordano M, Cabeza R, Henriksen SJ, Méndez Díaz M, Navarro L, Prospero-Garcia O. Oleamide modulates memory in rats. *Neurosci Lett.* 313: 61–4, 2001.
- ⁹⁹Martinez-Gonzalez D, Bonilla-Jaime H, Morales-Otal A, Henriksen SJ, Velázquez-Moctezuma J, Prospéro-García O. Oleamide and anandamide effects on food intake and sexual behavior of rats. *Neurosci Lett.* 364: 1–6, 2004.
- ¹⁰⁰Langstein J, Hofstadter F, Schwarz H. Cis-9, 10-octadecenoamide, an endogenous sleep-inducing CNS compound, inhibits lymphocyte proliferation. *Res Immunol.* 147: 389–96, 1996.
- ¹⁰¹Leggett JD, Aspley S, Beckett SR, D'Antona AM, Kendall DA, Kendall DA. Oleamide is a selective endogenous agonist of rat and human CB1 cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol.* 141: 253–62, 2004.
- ¹⁰²Boger DL, Patterson, JE, Jin Q. Structural requirements for 5HT_{2A} and 5HT_{1A} serotonin receptor potentiation by biologically active lipid oleamide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95:4102-07, 1998.
- ¹⁰³Piomelli D. The endogenous cannabinoid system and the treatment of marijuana dependence. *Neuropharmacol.* 47:359-67, 2004.
- ¹⁰⁴Cadas H, Di Thomaso E, Piomelli D. Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain. *J Neurosci.* 17:1226-42, 1997.
- ¹⁰⁵McKinney MK, Cravatt BF. Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annu Rev Biochem.* 74:411-32, 2005.
- ¹⁰⁶Wilcox BJ, Ritenour-Rodgers KJ, Asser AS, Baumgart LE, Baumgart MA, Boger DL, DeBlassio JL, deLong MA, Glufke U, Henz ME, King L 3rd, Merkler KA, Patterson JE, Robleski JJ, Vederas JC, Merkler DJ. N-acylglycine amidation: implications for the biosynthesis of fatty acid primary amides. *Biochemistry.* 38:3235-45, 1999.
- ¹⁰⁷Cravatt BF, Lichtman AH. The enzymatic inactivation of the fatty amide class of signaling lipids. *Chem Phys Lipids* 121:135-48, 2002.
- ¹⁰⁸Bisogno T, Ligresti A, Di Marzo V. The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects. *Pharmacol Biochem Behav.* 2:224-38, 2005.
- ¹⁰⁹Cravatt BF, Demarest K, Patricelli MP, Bracey MH, Giang DK, Martin BR, Lichtman AH. Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 16:9371-6, 2001.

-
- ¹¹⁰Cravatt BF, Saghatelian A, Hawkins EG, Clement AB, Bracey MH, Lichtman AH. Functional disassociation of the central and peripheral fatty acid amide signaling systems. *Proc Natl Acad Sci USA*. 29:10821-6, 2004.
- ¹¹¹Kathuria S, Gaetani S, Fegley D, Valiño F, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, La Rana G, Calignano A, Giustino A, Tattoli M, Palmery M, Cuomo V, Piomelli D. Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat Med*. 1:76-81, 2003.
- ¹¹²Gulyas AI, Cravatt BF, Bracey MH, Dinh TP, Piomelli D, Boscia F, Freund TF. Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur J Neurosci*. 2:441-58, 2004.
- ¹¹³Prospéro-García O, Herrera-Solís A, Méndez-Díaz M, Ruíz Contreras A, Pérez Morales M. Modulación del sueño por endocannabinoides. *Avances en la Medicina del Sueño en Latinoamérica*, 1: 6-13, 2009.
- ¹¹⁴Axerol J, Felder CC. Cannabinoid receptors and their endogenous agonist, anandamide. *Neurochem Res*. 23: 575-81, 1998.
- ¹¹⁵Leggett JD, Aspley S, Beckett SR, D'Antona AM, Kendall DA, Kendall DA. Oleamide is a selective endogenous agonist of rat and human CB1 cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol*. 141:253-62, 2004.
- ¹¹⁶Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*. 384:83-7, 1996.
- ¹¹⁷Crawley JN, Corwin RL, Robinson JK, Felder CC, Devane WA, Axelrod J. Anandamide, an endogenous ligand of the cannabinoid receptor, induces hypomotility and hypothermia in vivo in rodents. *Pharmacol Biochem Behav*. 46:967-72, 1993.
- ¹¹⁸Basile AS, Hanus L, Mendelson WB. Characterization of the hypnotic properties of oleamide. *Neuroreport*. 10:947-51, 1999.
- ¹¹⁹Maione S, Bisogno T, de Novellis V, et al. Elevation of endocannabinoid levels in the ventrolateral periaqueductal grey through inhibition of fatty acid amide hydrolase affects descending nociceptive pathways via both cannabinoid receptor type 1 and transient receptor potential vanilloid type-1 receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 316:969-82, 2006.
- ¹²⁰Martínez-González D, Bonilla-Jaime H, Morales-Otal A, Henriksen SJ, Velázquez-Moctezuma J, Prospéro-García O. Oleamide and anandamide effects on food intake and sexual behavior of rats. *Neurosci Lett*. 364:1-6, 2004.
- ¹²¹Rueda-Orozco P, Soria-Gómez E, Montes-Rodríguez CJ, Martínez-Vargas M, Galicia O, Navarro L, Prospéro-García O. A potential function of endocannabinoids in the selection of a navigation strategy by rats. *Psychopharmacol*. 198: 565-76, 2008.
- ¹²²Huitrón-Reséndiz S, Sanchez-Alavez M, Wills DN, Cravatt BF, Henriksen SJ. Characterization of the sleep-wake patterns in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Sleep*. 27:857-65, 2004.
- ¹²³Murillo-Rodríguez E, Sánchez-Alavez M, Navarro L, Martínez-González D, Drucker-Colín R, Prospéro-García O. Anandamide modulates sleep and memory in rats. *Brain Res*. 812:270-4, 1998.
- ¹²⁴Murillo-Rodríguez E, Cabeza R, Méndez-Díaz M, Navarro L, Prospéro-García O. Anandamide-induced sleep is blocked by SR141716A, a CB1 receptor antagonist and by U73122, a phospholipase C inhibitor. *Neuroreport*. 12:2131-6, 2001.

-
- ¹²⁵Cravatt BF, Prospéro-García O, Siuzdak G, et al. Chemical characterization of a family of brain lipids that induce sleep. *Science*. 268:1506-9, 1995.
- ¹²⁶Basile A, Hanus L, Mendelson WB. Characterization of the hypnotic proprieties of oleamide. *Neuro Report*. 10: 047-51, 1999.
- ¹²⁷Mendelson WB, Basile AS. The hypnotic action of fatty acid amide, Oleamide. *Neuropsychology*. 25: 36-9, 2001.
- ¹²⁸Santucci V, Storme JJ, Soubrié P, Le Fur G. Arousal-enhancing properties of the CB1 cannabinoid receptor antagonist SR 141716A in rats as assessed by electroencephalographic spectral and sleep-waking cycle analysis. *Life Sci*. 58:103-10, 1996.
- ¹²⁹Huitrón-Reséndiz S, Sanchez-Alavez M, Wills DN, Cravatt BF, Henriksen SJ. Characterization of the sleep-wake patterns in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Sleep*. 27:857-65, 2004.
- ¹³⁰Navarro L, Martínez-Vargas M, Murillo-Rodríguez E, Landa A, Méndez-Díaz M, Prospéro-García O. Potential role of the cannabinoid receptor CB1 in rapid eye movement sleep rebound. *Neuroscience*. 120:855-9, 2003.
- ¹³¹Murillo-Rodríguez E, Desarnaud F, Prospero-Garcia O. Diurnal variation of arachidonylethanolamine, palmitoylethanolamide and oleoylethanolamide in the brain rat. *Life Sci*. 79: 30-7, 2006.
- ¹³²Martinez-Vargas M, Murillo-Rodríguez E, Gonzalez-Rivera R, Landa A, Mendez-Diaz M, Prospero-Garcia O, Navarro L. Sleep modulates cannabinoid receptor 1 expression in the pons of rats. *Neuroscience*. 117:97-201, 2003.
- ¹³³Romero J, Garcia L, Fernandez-Ruiz J, Cebeira M, Ramos JA. Changes in rat brain Cannabinoid binding sites after or chronic exposure to their endogenous agonist, anandamide, A-9 -Tetrahydrocannabinol. *Pharmacol Biochem Behav*. 51: 731-37, 1995.
- ¹³⁴Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Raven Press, 1986.
- ¹³⁵Laposky AD, Homanics GE, Basile A, Mendelson WB. Deletion of the GABA (A) receptor beta 3 subunit eliminates the hypnotic actions of oleamide in mice. *Neuroreport*. 12: 4143-7, 2001.
- ¹³⁶Viveros MP, Marco EM, File SE. Endocannabinoid system and stress and anxiety response. *Pharmacol – biochem Behav*. 81: 331-42, 2005.
- ¹³⁷Bortolato M, Campolongo P, Mangieri RA, Scattoni ML, Frau R, Trezza V, La Rana G, Russo R, Calignano A, Gessa GL, Cuomo V and Piomelli D. Anxiolytic-like properties of the anandamide transport inhibitor AM404. *Neuropsychopharmacology*. 31:2652-59, 2006.
- ¹³⁸Fedorova I, Hashimoto A, Fecik RA, Hedrick MP, Hanus LO, Boger DL, Rice KC, Basile AS. Behavioral evidence for the interaction of oleamide with multiple neurotransmitter systems. *J Pharmacol Exp Ther*. 299:332-42, 2001.
- ¹³⁹Costa B, Giagnoni G, Colleoni M. Precipitated and spontaneous withdrawal in rats tolerant to anandamide. *Psychopharmacology (Berl)*. 149:121-8, 2000.
- ¹⁴⁰Benca RM. Diagnosis and treatment of chronic insomnia: a review. *Psychiatr Serv*. 56:332-43, 2005.



Acute and subchronic administration of anandamide or oleamide increases REM sleep in rats

Andrea Herrera-Solís, Khalil Guzmán Vásquez, Oscar Prospéro-García *

Laboratorio de Canabinoides, Grupo de Neurociencias, Departamento de Fisiología, Apdo. Postal 70-250, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, Mexico, D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 August 2009

Received in revised form 8 December 2009

Accepted 17 December 2009

Available online 7 January 2010

Keywords:

Anandamide

Oleamide

Endocannabinoids

Sleep

Subchronic

REM sleep

ABSTRACT

Anandamide and oleamide, induce sleep when administered acutely, via the CB1 receptor. Their subchronic administration must be tested to demonstrate the absence of tolerance to this effect, and that the sudden withdrawal of these endocannabinoids (eCBs) does not affect sleep negatively. The sleep–waking cycle of rats was evaluated for 24 h, under the effect of an acute or subchronic administration of eCBs, and during sudden eCBs withdrawal. AM251, a CB1 receptor antagonist (CB1Ra) was utilized to block eCBs effects. Our results indicated that both acute and subchronic administration of eCBs increase REMS. During eCBs withdrawal, rats lack the expression of an abstinence-like syndrome. AM251 was efficacious to prevent REMS increase caused by both acute and subchronic administration of these eCBs, suggesting that this effect is mediated by the CB1 receptor. Our data further support a role of the eCBs in REMS regulation.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Anandamide (ANA) and oleamide (OLE) are two endogenous molecules with cannabinoid activity that bind to the cannabinoid receptor 1 (CB1) (Axelrod and Felder 1998; Leggett et al., 2004) and are degraded by the fatty acid amide hydrolase (FAAH) (Cravatt et al., 1996). Recently it has been proposed that these lipids are involved in the regulation of several physiological functions and behaviors. For example, core temperature, pain perception, locomotor activity, memory regulation, food intake, sexual behavior, and sleep (Crawley et al., 1993; Basile et al., 1999; Maione et al., 2006; Martínez-González et al., 2004; Rueda-Orozco et al., 2008a, b; Huitrón-Reséndiz et al., 2001).

Regarding anandamide, its acute intracerebroventricular (icv) administration increases non-rapid-eye movement sleep (NREM) and rapid eye movement sleep (REMS) at the expense of waking in rats (Murillo-Rodríguez et al., 1998). Likewise, anandamide administered directly into the peduncle pontine tegmental nucleus (PPTg) causes a similar although stronger effect (Murillo-Rodríguez et al., 2001). This effect was blocked with the CB1 receptor antagonist, SR141716A, indicating that the effect on sleep results from the CB1 receptor activation.

Oleamide was isolated for the first time from the cerebrospinal fluid (CSF) of sleep-deprived cats (Cravatt et al., 1995). We have

observed that its systemic administration induces sleep in rats, with shortened sleep latency (Cravatt et al., 1995). In addition, 6 h of sleep deprivation increases 3- to 4-fold the oleamide concentration in rats' CSF. SR141716A, as with anandamide, prevents oleamide's sleep-inducing effects (Mendelson and Basile, 1999). Moreover, SR141716A reduces both NREM and REMS while increasing waking after its systemic administration at a 3 mg/kg dose (Santucci et al., 1996).

Furthermore, mice lacking fatty acid amide hydrolase FAAH (−/−), an enzyme that degrades anandamide and oleamide, exhibit a higher SWS expression and a higher delta power than wild-type mice (Huitrón-Reséndiz et al., 2004), further supporting the notion that eCBs modulate sleep. SR141716A prevents the REMS rebound observed in rats after a 24-h period of selective REMS deprivation (REMSD). During the rebound, consecutive to REMSD, the CB1 receptor increases in the pons of rats (Navarro et al., 2003).

This experimental evidence suggests that anandamide and oleamide improve sleep after their acute administration and this effect is a consequence of mainly, although not entirely, the activation of the CB1 receptor. In this context, we decided to evaluate the effect on sleep of the subchronic administration of these eCBs, during eCBs withdrawal, and after AM251-blocking of the CB1 receptor.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

Adult male Wistar rats, weighing 250–280 g, were used. All animals were housed individually in Plexiglas cages. They were maintained at an ambient temperature of 22 ± 1 °C and a controlled

* Corresponding author. Depto. De Fisiología, Fac. de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-250, Mexico, D.F. 04510, Mexico. Tel.: +52 55 6232509; fax: +52 55 6232241.

E-mail address: opg@unam.mx (O. Prospéro-García).

12:12-h light–dark cycle (08:00 AM–08.00 PM) throughout the study. Food and water were available ad libitum.

2.2. Surgery

Rats ($n = 102$) were stereotaxically implanted under anesthesia (cocktail: 66 mg/kg ketamine, 0.26 mg/kg xylazine, and 1.3 mg/kg acepromazine) with a stainless-steel guide cannula (23 gauge) aimed at the lateral ventricle ($P = 0.8$, $L = 1.5$, $V = 3.8$) for icv administration of drugs. Two electrodes were inserted into the hippocampus ($P = 4.0$, $L = 2.5$, $V = 2.5$) according to the Paxinos and Watson atlas (1986) for recording the electroencephalographic (EEG) equivalent from this structure. Although fully developed slow waves are not obtained from this structure, we still have a signal indicative of NREM sleep. In addition, the theta rhythm is easily recorded from the hippocampus, helping us to easily differentiate between waking and REMS. Two additional screw electrodes were implanted into the frontal bones for grounding the animal. Two twisted wire electrodes were placed into the neck musculature for electromyographic (EMG) recordings. Animals were treated according to the Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-199), the Guide for Care and Use of Laboratory Animals established by the National Institutes of Health, and the European Community Council Directive 86/609/EEC. Additionally, our protocol was approved by the Research and Ethics Committee of the Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Every effort was made to minimize the number of animals used and their potential suffering.

2.3. Sleep recording

After surgery, animals were monitored and allowed to recover for 10 days. Upon the completion of this period, rats were habituated to the recording conditions for 24 h. Once the habituation period was completed, rats were divided into different experimental groups. They received a daily icv administration of either vehicle or anandamide or oleamide at 8:00 AM (at the beginning of the light period). Immediately after the administration, the sleep–waking cycle was recorded for 24 h.

The EEG and EMG signals were amplified with a Grass Model 7 polygraph, Amplifier Model 7P511, in a frequency range of 1 to 30 and 30 to 100 Hz, respectively. Signals were acquired and analyzed with the ICELUS[®] software.

Animals were killed at the end of the experiment with an i.p. overdose of sodium pentobarbital to verify the position of the cannula. Ponceau red stain (5 μ l) was injected into the ventricle through the cannula, aimed at dyeing the cerebral ventricle system. Brains were removed and dissected to verify that all the ventricles were stained.

2.4. Chemicals

Arachidonyl ethanolamide (anandamide, ANA) and oleamide (OLE) were obtained from Sigma Aldrich, and the CB1 antagonist, AM251, was obtained from Cayman Chemical. We decided to use AM251 over SR141716a for two reasons: 1, it is more specific for CB1 receptors and 2, it is commercially available. ANA or OLE was dissolved in a mixture of 5% ethanol in saline, and AM251 was dissolved in 1 μ l of dimethyl sulfoxide (DMSO). Doses of drugs and volumes will be specified later in the description of each experiment.

2.5. Experimental protocol

2.5.1. Anandamide and oleamide dose–response curve

To determine the dose at which anandamide or oleamide produce a more reliable effect on sleep, seven groups of animals ($n = 6$ for each group) received an acute icv administration. The CONTROL group received 5 μ l vehicle (saline with 5% ethanol), ANA1 group (1 μ g/5 μ l

of vehicle), ANA2 (2 μ g/5 μ l of vehicle), ANA4 (4 μ g/5 μ l of vehicle), OLE6 (6 μ g/5 μ l of vehicle), OLE12 (12 μ g/5 μ l of vehicle) and OLE25 (25 μ g/5 μ l of vehicle). All experimental drugs were administered at 8:00 AM and sleep was recorded immediately thereafter for 24 h.

2.5.2. Subchronic administration and drug withdrawal

Three subchronic administration groups were used ($n = 6$ for each group). The same animals used in groups CONTROL, ANA2 (2 μ g/5 μ l of vehicle), and OLE25 (25 μ g/5 μ l of vehicle) for the acute administration were treated daily with identical doses at 8:00 AM for 15 days. These doses were the most efficient in increasing REMS after the acute administration. Rats were not sleep-recorded until day 15 of administration. On this day, immediately after the drug or vehicle administration, animals were sleep-recorded for 24 h. On day 16, all groups received 5 μ l vehicle at the same hour and were recorded for 24 h, to detect early withdrawal signs on sleep. In addition, to further document that the sleep-inducing effect of anandamide and oleamide was mediated by the CB1 receptor, an antagonist of this receptor, AM251, was used.

2.5.3. AM251 dose–response curve

We performed an AM251 dose–response curve to determine the effect by blocking the CB1 receptor and, thereby, potentially preventing the activity of the endogenous eCBs. The dose–response curve was started with a dose that was equimolar to 2 μ g of anandamide, the very dose producing the most significant effects on sleep by increasing REMS. Four groups were acutely icv administered ($n = 6$ for each group), the CONTROL group received 1 μ l vehicle (DMSO), AM251-3.2 group (3.2 μ g/1 μ l of vehicle), AM251-6.4 (6.4 μ g/1 μ l of vehicle), AM251-12.8 (12.8 μ g/1 μ l of vehicle). Rats were injected at 8:00 AM and sleep was recorded immediately for 24 h.

2.5.4. Blockade of acute and subchronic administration of anandamide or oleamide

To block the effects of the acute administration of anandamide or oleamide, 3 groups were used ($n = 6$ for each group): CONTROL (1 μ l of DMSO, 15 min before receiving 4 μ l saline with 5% ethanol), AM251/ANA (3.2 μ g AM251/1 μ l of DMSO, 15 min before receiving 2 μ g ANA/4 μ l saline with 5% ethanol), and AM251/OLE (3.2 μ g AM251/1 μ l of DMSO, 15 min before receiving 25 μ g OLE/4 μ l saline with 5% ethanol). Rats were injected at 8:00 AM and sleep was recorded immediately thereafter for 24 h.

To document the AM251 blocking effect on the subchronic eCBs administration, three additional groups of rats received either the vehicle, anandamide or oleamide during 15 days ($n = 6$ for each group) exactly as described for the subchronic administration experiment. On day 15, AM251 was administered as follows: CONTROL (1 μ l of DMSO 15 min before administering 4 μ l saline with 5% ethanol), AM251/ANA (3.2 μ g AM251/1 μ l of DMSO, 15 min before administering 2 μ g ANA/4 μ l saline with 5% ethanol), and AM251/OLE (3.2 μ g AM251/1 μ l of DMSO, 15 min before administering 25 μ g OLE/4 μ l saline with 5% ethanol). Rats were injected at 8:00 AM and sleep was recorded immediately thereafter for 24 h.

2.6. Data analysis

Polygraphic recordings were analyzed every 12 s and classified according to the following vigilance stages: wakefulness (W), non-rapid-eye movement (NREM), and rapid eye movement (REMS) sleep. Electrophysiological criteria were used to define these stages of vigilance as follows: W was characterized by the EEG expressing mixed low fast voltage and theta activity, as well as high muscle activity. In NREM, rats showed an EEG with delta waves and EMG with decreased amplitude. Finally, in REMS rats showed an EEG with theta activity and an EMG absent activity (postural atonia). The time spent in W, NREM, and REMS per hour was calculated during two periods of 12 h (total 24 h). Latency of NREM and REM sleep was also calculated by measuring the time

elapsed from the start of the sleep recording to the first NREM bout. REMS latency was considered from the first SWS bout to the first REMS bout. Frequency and average duration of REMS bouts were also calculated.

2.6.1. Statistics

Results of REMS, SWS, and W were compared by a mixed analysis of variance (ANOVA) with a Greenhouse–Geisser correction, and subsidiary ANOVAs to detect changes per hour with an LSD post hoc test used only for specific comparison when indicated by mixed ANOVA, except for the AM251 dose–response curve to which one way ANOVA was applied. Sleep latencies and average duration of REMS episodes were analyzed with one way ANOVA and post hoc LSD. Finally, frequency of REMS was analyzed with Kruskal–Wallis test with post hoc Mann–Whitney *U*-test and Bonferroni correction.

3. Results

3.1. Anandamide and oleamide dose–response curve

Our results showed that the acute administration of 2 µg of anandamide significantly increased REMS in comparison with the CONTROL group and the other doses of anandamide. Statistical analysis by mixed ANOVA indicated a significant group × time interaction for REMS ($F_{7,549, 50.32} = 2.489, P < 0.05, \epsilon = 109$) and differences from the 5th to the 10th hour and from the 18th to the 24th hour with subsidiary ANOVAs (Table 1). The increase in the total time of REMS produced by anandamide was observed from the 5th to the 24th hour, although not all the hours were significant (Fig. 1A). Waking exhibited a reduction in the total time, however non significant (Fig. 1C). Likewise NREM exhibited no significant differences. The time added to the increase of REM sleep was taken from the small non significant reduction of the waking time (Fig. 1B).

On the other hand, acute administration of 25 µg of oleamide significantly increased REMS in comparison to the CONTROL group and the other doses (Fig. 1D to F). Statistical analysis by mixed ANOVA indicated a significant group × time interaction for REMS ($F_{7,75, 51.67} = 2.88, P < 0.05, \epsilon = 0.112$) and differences from the 6th to the 24th hour, although in this case not all the hours were significantly different, with subsidiary ANOVA (Table 2). Similar to anandamide, waking and NREM depicted no significant differences and the time spent on increasing REM sleep was taken from a small fraction of the waking time (Fig. 1D, E, and F).

A group of the dose–response curve of anandamide and oleamide was established at the same time; hence, the CONTROL group is the same for both dose–response curves, therefore the values of this group are plotted in Fig. 1A to F. We decided to illustrate the effects of these eCBs separately for the sake of clarity.

The increase of REMS produced by the administration of 2 µg of anandamide or 25 µg of oleamide was mainly due to an increase in the

frequency of REMS episodes rather than to changes in the bouts' mean duration. The acute administration of 2 µg anandamide significantly increased the frequency of bouts in the light phase ($H_3 = 8.49, P < 0.05$) with respect to the CONTROL group (Fig. 2A). A similar pattern was observed with 25 µg of oleamide, although it did not reach statistical significance.

3.2. Subchronic administration and drug withdrawal

The subchronic administrations (15 days) of anandamide or oleamide were performed by using 2 and 25 µg, respectively. These doses had been effective to increase REMS in their acute administrations.

Our results show that the subchronic administrations of anandamide or oleamide increased REM sleep significantly (Fig. 3A). Mixed ANOVA indicated a significant group × time interaction for REMS ($F_{4,95, 37.15} = 3.87, P < 0.05, \epsilon = 0.108$). Both anandamide and oleamide induced similar effects, although at different doses. It seems that the subchronic administration facilitated even more REMS increase. These eCBs produced a significant increase of REMS from the 5th to 24th hour as shown by subsidiary ANOVA (Table 3). Waking and NREM depicted no significant differences. However, as in the other experiments, the increase of REMS is due to a non significant reduction of the waking time (Fig. 3B and C).

Increased REMS observed after the subchronic administration of anandamide was mainly produced by an increase in the frequency of REMS episodes rather than by changes in the duration of the bouts. Subchronic administration of oleamide significantly increased bouts frequency during the light period ($H_2 = 6.23, P < 0.05$), and increased the total time ($H_2 = 8.05, P < 0.05$) (Fig. 4).

On day 16, all rats belonging to any of the three groups were injected with the vehicle. No changes were documented. Rats receiving anandamide or oleamide exhibited a sleep–waking cycle similar to the one of those rats receiving vehicle (Fig. 3D to F).

3.3. AM251 dose–response curve

Fig. 2, B shows the dose–response curve performed to evaluate the effect of AM251 on sleep. The 3.2 µg dose decreased REMS during the first 4 h after its administration with a return to baseline for the 20 following hours. Thus, the data reported here concern only the 4-h period after treatment. Statistical analysis using a one way ANOVA indicates significant differences with the CONTROL group ($F_{3, 20} = 3.11, P < 0.05$).

Although there was a decrease in REMS frequency with the 3.2 µg dose of AM251, significance was not reached. Neither was significant differences observed in the duration of REMS bouts.

3.4. Blockade of acute and subchronic administration of anandamide or oleamide

In an attempt to block anandamide or oleamide effects induced by their acute or subchronic administration on sleep and to further explore the involvement of the CB1 receptor in these effects, we administered 3.2 µg AM251, 15 min before the administration of anandamide or oleamide. As can be seen in Fig. 1G to I and Fig. 3G to I, the administration of the CB1 antagonist receptor blocked the effects of anandamide or oleamide on REMS after their acute or subchronic administration.

Finally, we examined the latencies of NREM and REMS in each of these experiments and found no significant differences regarding the CONTROL groups in any of the latencies.

4. Discussion

Our results indicate that the acute and the subchronic administration of anandamide (2 µg) or oleamide (25 µg) increase REMS. At

Table 1
Acute administration anandamide subsidiary ANOVA of REMS.

Hour	Significant <i>F</i>
5	$F_{(3, 20)} = 3.18^*$
6	$F_{(3, 20)} = 3.16^*$
7	$F_{(3, 20)} = 3.26^*$
8	$F_{(3, 20)} = 3.14^*$
9	$F_{(3, 20)} = 3.72^*$
10	$F_{(3, 20)} = 3.15^*$
18	$F_{(3, 20)} = 3.36^*$
19	$F_{(3, 20)} = 3.34^*$
20	$F_{(3, 20)} = 4.01^*$
21	$F_{(3, 20)} = 4.69^*$
22	$F_{(3, 20)} = 5.01^*$
23	$F_{(3, 20)} = 5.58^*$
24	$F_{(3, 20)} = 5.62^*$

* $P < 0.05$ vs CONTROL.

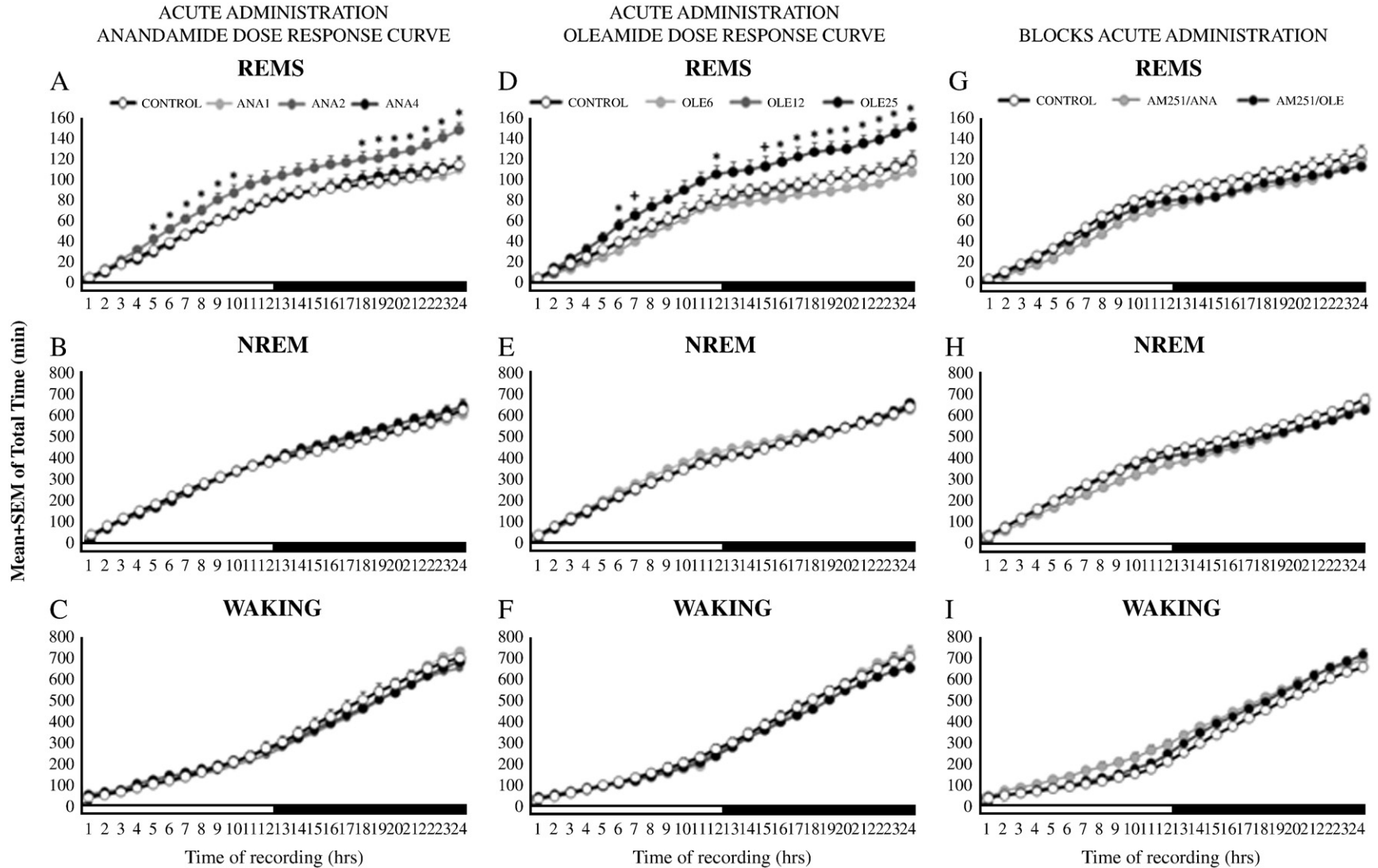


Fig. 1. The left side of this panel illustrates the dose–response curve of the acute administration of 3 doses of anandamide on the sleep–waking cycle, ANA1 (1 μ g), ANA2 (2 μ g), ANA4 (4 μ g), plus the CONTROL group (vehicle). Panel (A) REMS: rapid eye movement sleep. (B) NREM: non-rapid-eye movement sleep. (C) Wakefulness. Panels in the middle of this figure illustrate the dose–response curve of the acute administration of oleamide on the sleep–waking cycle. OLE6 (6 μ g), OLE12 (12 μ g), OLE25 (25 μ g), and CONTROL group (vehicle). (D) REMS: rapid eye movement sleep. (E) NREM: non-rapid-eye movement sleep, and (F) Wakefulness. The CONTROL group is the same for both dose–response curves. Graphs in the right side of this figure illustrate the blockade of the effects induced by the acute administration of anandamide or oleamide on the sleep–waking cycle, by AM251: AM251/ANA (AM251 3.2 μ g, 15 min before ANA 2 μ g), AM251/OLE (AM251 3.2 μ g, 15 min before OLE 25 μ g), and CONTROL group (DMSO, 15 min before vehicle saline/ETOH). (G) REMS: rapid eye movement sleep. (H) NREM: non-rapid-eye movement sleep, and (I) Wakefulness. Results are expressed as mean \pm SEM of the accumulated time (minutes) of 24 h of recording and the light–dark cycle is indicated by a white–black bar in the X axis. Statistical analysis, using a mixed ANOVA test, indicated a significant group \times time interaction for REMS, and significant differences for individual time points with a subsidiary ANOVA. Differences against CONTROL group (* P <0.05) and “+” differences between OLE6 and OLE12 (+ P <0.05). Is important to mention some SEM levels are too small to be appreciated in the graphs. No significant differences were detected in the groups receiving AM251.

Table 2
Acute administration oleamide subsidiary ANOVA of REMS.

Hour	Significant <i>F</i>
6	$F_{(3, 20)} = 4.03^*$
7	$F_{(3, 20)} = 3.17^+$
12	$F_{(3, 20)} = 3.12^*$
15	$F_{(3, 20)} = 3.45^+$
16	$F_{(3, 20)} = 4.28^*$
17	$F_{(3, 20)} = 4.86^*$
18	$F_{(3, 20)} = 6.22^*$
19	$F_{(3, 20)} = 7.01^*$
20	$F_{(3, 20)} = 5.96^*$
21	$F_{(3, 20)} = 7.67^*$
22	$F_{(3, 20)} = 7.72^*$
23	$F_{(3, 20)} = 7.78^*$
24	$F_{(3, 20)} = 7.01^*$

* $P < 0.05$ vs CONTROL.

+ $P < 0.05$ vs OLE6 and OLE12.

these doses, both eCBs effects are very similar. We have previously shown that the icv administration of anandamide produces REMS increase (Murillo-Rodríguez et al., 2001). In this report we are supporting our previous findings, and in addition, we are reporting for the first time a study describing long-lasting effects, at least for 24 h

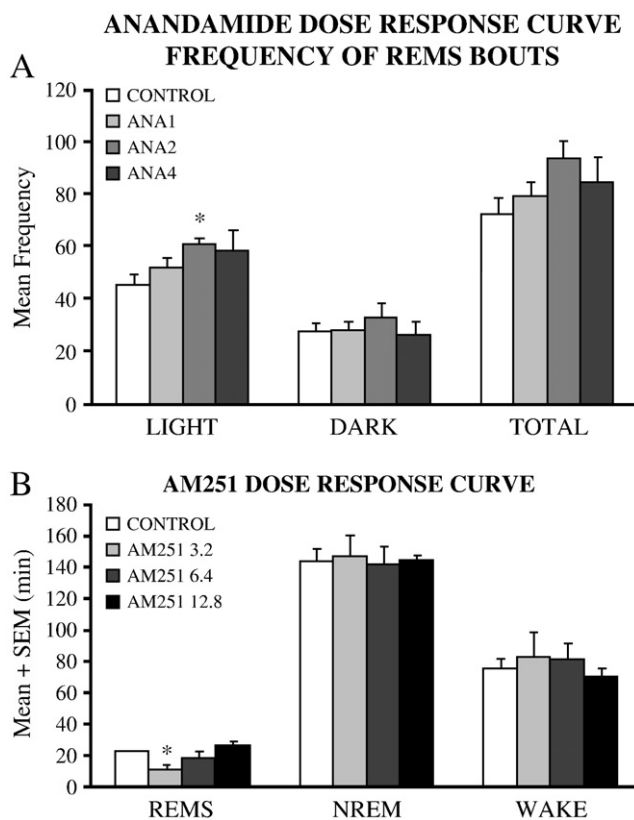


Fig. 2. Panel (A) shows the frequency of REMS bouts in the light and in the dark phase, and during the entire light–dark cycle (Total), under the effect of the different doses used. Results are expressed as mean \pm SEM of REMS frequency for 3 doses of anandamide; ANA1 (1 μ g), ANA2 (2 μ g), ANA4 (4 μ g), and CONTROL group (vehicle). Statistical analysis (Kruskal–Wallis test) revealed significant differences between groups, and a Mann–Whitney *U*-test post hoc test indicated significant differences between ANA2 and CONTROL group (* $P < 0.05$) in the light phase. Panel (B) shows the dose–response curve of AM251 on the sleep–waking cycle. The results are expressed as mean \pm SEM of time (minutes) for the first 4 h of recording for 3 doses of AM251: AM251 3.2 (3.2 μ g), AM251 6.4 (6.4 μ g), AM251 12.8 (12.8 μ g), and CONTROL group (vehicle). A one way ANOVA test indicated significant differences among groups for REMS, and post hoc LSD indicated significant differences between AM251 3.2 and CONTROL groups (* $P < 0.05$).

after a single administration. Moreover, we are showing that eCBs are able to produce a REMS increase for 2 weeks. Oleamide also produced such a long-lasting effect on REMS. Regarding NREM, we did not detect changes induced by these eCBs, despite that we had previously reported that anandamide increases it (Murillo-Rodríguez et al., 2001), and that it has also been reported that oleamide shortens sleep latency (Mendelson and Basile, 1999; 2001), and that its systemic administration increases NREM and total sleep (Laposky et al., 2001). The potential explanation for these discrepancies is that we used different doses of these eCBs in this study as compared with our previous reports. Also, we recorded the EEG from the hippocampus, and this fact might prevent us from observing robust expression of slow waves. In addition, it has come to our attention that the margin to induce changes in the sleep–waking cycle by means of eCBs is very narrow.

Regarding anandamide's dose–response curve, the highest dose did not produce any effect on sleep. This is not surprising since it has been reported that eCBs induce biphasic effects, like in anxiety, where low doses of anandamide are anxiolytic whereas high doses are anxiogenic (Viveros, et al., 2005). On the other side, administration of AM404 (selective inhibitor of a putative anandamide transporter) produces an inverse U-shaped response in the conditioned place preference test (Bortolato, et al., 2006).

The subchronic administration of anandamide or oleamide increased REMS. Both eCBs caused a similar effect, producing and increase from the 5th hour of administration to the 24th hour, mainly due to an increase in the bouts' frequency. The increase was even higher after the subchronic than after the acute administration. A potential explanation for this phenomenon is that the subchronic administration of anandamide increases the B_{max} of the cannabinoid receptor, as well as the number of receptors (Romero et al., 1995). During acute drug withdrawal, those groups receiving anandamide or oleamide had a sleep–waking cycle similar to the one exhibited by the CONTROL group, indicating that there are no abstinence effects, at least expressed as changes in the sleep–waking cycle. However, it has been reported that oleamide is a poor inducer of physical dependence (Fedorova et al., 2001) and anandamide is capable of producing this effect only at high doses (20 mg/kg, i.p.) (Costa et al., 2000).

Results of the acute and subchronic administration of these eCBs indicate that they may be facilitating somehow REMS triggering mechanisms. However, we have to remark that at the dose presently used (2 μ g) we could not reproduce the original effect induced by anandamide at the dose of 1.25 μ g (Murillo-Rodríguez et al., 2001).

To support a potential role of the CB1 receptor as mediator of the effects produced by these eCBs on REMS, we used the CB1 receptor antagonist, AM251. Our results showed that AM251 reduces REMS within the first 4 h post administration, supporting the pioneer observations made by Santucci et al. (1996) who administered the CB1 receptor antagonist, SR141716A, causing a decrease of both REMS and NREM, and consequently an increase in waking. Although we recorded 24 h after the administration of AM251, here we are reporting only the first 4 h in which we observed its effect on REM sleep. It is also interesting that AM251 induces the strongest effect with the lowest dose used, and it is less effective with a higher dose. It seems like AM251 causes a pattern of effects similar to CB1 agonists (inverted U shape) but in the opposite direction. We do not have data to explain the mechanisms subserving this pharmacological behavior, but its phenomenological occurrence seems to be warranted.

In this context, blockage of the eCBs effect on REMS lends further support to the role of the CB1 receptor in the generation of REMS, and that eCBs, such as anandamide and oleamide among others not yet tested, are the ones activating this receptor. Our findings also support studies performed by our own group and by others showing that SR141716A blocks the effects produced by anandamide and oleamide on sleep and also prevents REMS rebound (Murillo-Rodríguez et al., 2001; Mendelson and Basile, 1999; Navarro et al., 2003).

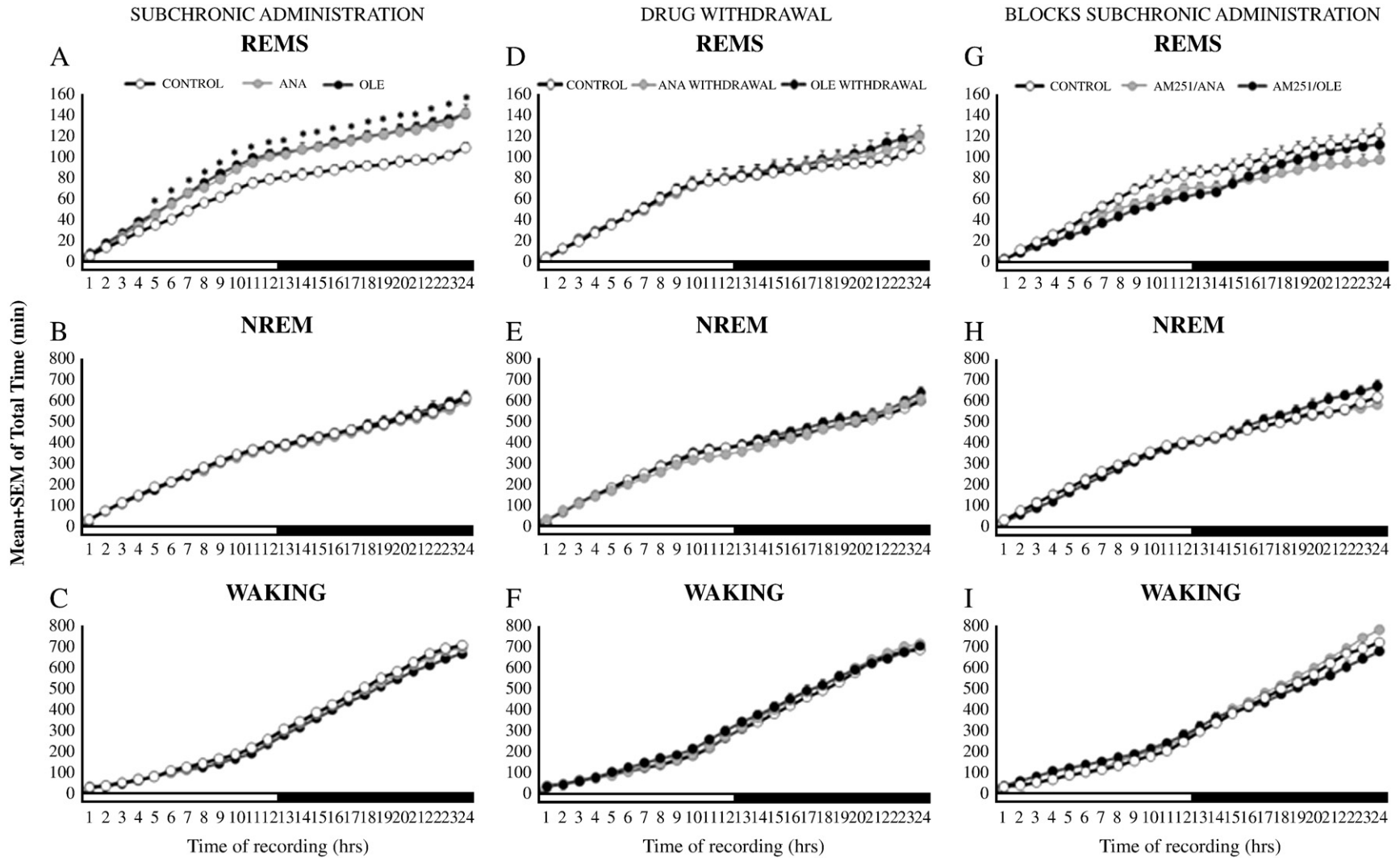


Fig. 3. On the left side of this figure, the effects of the subchronic administration of anandamide or oleamide on the sleep–waking cycle can be observed: ANA (2 μ g), OLE (25 μ g), and CONTROL group (vehicle). (A) REMS: rapid eye movement sleep. (B) NREM: non-rapid-eye movement sleep, and (C) Wakefulness. Graphs in the middle of this figure illustrate the drugs withdrawal effect on the sleep–waking cycle: ANA WITHDRAWAL, OLE WITHDRAWAL, and CONTROL group (vehicle). These graphs illustrate the effect of substituting anandamide or oleamide by the vehicle, 24 h after the last administration of any of these eCBs. Panel (D) REMS: rapid eye movement sleep (E) NREM: non-rapid-eye movement sleep, and (F) Wakefulness. No statistical differences were found. Graphs on the right side of this figure illustrate the blockade of the effects of the subchronic administration of anandamide or oleamide on the sleep–waking cycle by AM251. Groups were subchronically administered with anandamide, oleamide, or vehicle and, on the 15 day, AM251 was added: AM251/ANA (AM251 3.2 μ g, 15 min before ANA 2 μ g), AM251/OLE (AM251 3.2 μ g, 15 min before OLE 25 μ g), and CONTROL group (DMSO, 15 min before vehicle saline/ETOH). (G) REMS: rapid eye movement sleep. (H) NREM: non-rapid-eye movement sleep. (I) Wakefulness. Statistical analysis revealed a lack of significant differences. Results are expressed as mean \pm SEM of the accumulated time (minutes) of 24 h of recording and the light–dark cycle is indicated by a white–black bar in the X axis. Statistical analysis, using a mixed ANOVA test, indicated a significant group \times time interaction for REMS, and significant differences for individual time points with a subsidiary ANOVA. Differences against CONTROL group ($*P < 0.05$). It is important to mention some SEM levels are too small to be appreciated in the graphs.

Table 3
Subchronic administration subsidiary ANOVA of REMS.

Hour	Significant F
5	$F_{(2, 15)} = 3.88^*$
6	$F_{(2, 15)} = 5.14^*$
7	$F_{(2, 15)} = 6.53^*$
8	$F_{(2, 15)} = 5.86^*$
9	$F_{(2, 15)} = 7.55^*$
10	$F_{(2, 15)} = 7.00^*$
11	$F_{(2, 15)} = 5.49^*$
12	$F_{(2, 15)} = 5.24^*$
13	$F_{(2, 15)} = 4.89^*$
14	$F_{(2, 15)} = 5.67^*$
15	$F_{(2, 15)} = 6.60^*$
16	$F_{(2, 15)} = 7.83^*$
17	$F_{(2, 15)} = 7.55^*$
18	$F_{(2, 15)} = 8.03^*$
19	$F_{(2, 15)} = 8.43^*$
20	$F_{(2, 15)} = 7.47^*$
21	$F_{(2, 15)} = 7.81^*$
22	$F_{(2, 15)} = 7.83^*$
23	$F_{(2, 15)} = 8.38^*$
24	$F_{(2, 15)} = 7.51^*$

* $P < 0.05$ vs CONTROL.

With all, it has been amply shown that eCBs are not the only molecules with sleep-promoting properties. Many proteins are examples of molecules with sleep-inducing properties, i. e. cortistatin, melanin concentrating hormone and many others as we have reviewed elsewhere (Prospéro-García and Méndez-Díaz, 2004). This fact implies that sleep in general depends not only on the action of one family of molecules as eCBs, but on the activity of many more with other chemical nature, i. e. proteins, prostaglandins, and adenosine.

In summary, we have found that both acute and subchronic administrations of anandamide or oleamide increase REMS and that these changes are mainly due to an increase in bouts frequency. In addition, we did not find any signs of acute withdrawal once these eCBs were suddenly suspended, at least not expressed as changes in the sleep-waking cycle. Furthermore, we are providing evidence that these eCBs effects are mediated by the CB1 receptor. In conclusion, this study supports the role of these endogenous cannabinoids in the regulation of REMS.

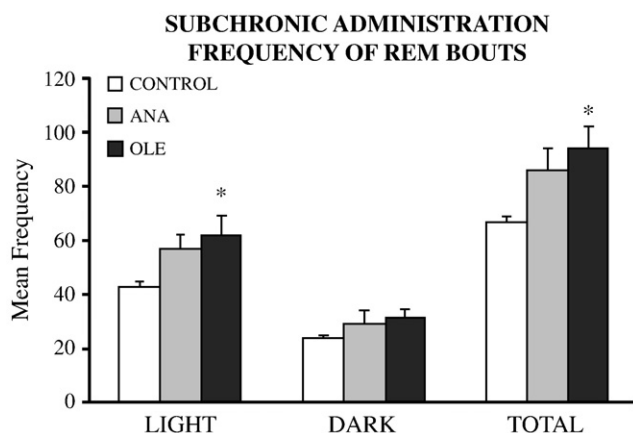


Fig. 4. Illustration of the frequency of REMS bouts in the light phase, dark phase, and during the entire light-dark cycle (Total), for the subchronic administration of anandamide or oleamide. Results are expressed as mean \pm SEM of REMS frequency for ANA (2 μ g), OLE (25 μ g) and CONTROL group (vehicle). Statistical analysis (Kruskal-Wallis test) indicated significant differences between groups and significant differences between groups OLE and CONTROL, in the light phase and the total light-dark cycle (* $P < 0.05$).

Acknowledgements

This study was supported by Grant 24768 from CONACyT to OPG and a fellowship from CONACyT to AHS. We thank PhD Alejandra Ruiz for her help in statistics procedures. This work is part of AHS's Doctoral Dissertation in Programa de Investigación Biomédica of UNAM.

References

- Axelrod J, Felder CC. Cannabinoid receptors and their endogenous agonist, anandamide. *Neurochem Res* 1998;23:575–81.
- Basile AS, Hanus L, Mendelson WB. Characterization of the hypnotic properties of oleamide. *Neuroreport* 1999;10:947–51.
- Bortolato M, Campolongo P, Mangieri RA, Scattoni ML, Frau R, Trezza V, et al. Anxiolytic-like properties of the anandamide transport inhibitor AM404. *Neuropsychopharmacology* 2006;31:2652–9.
- Costa B, Giagnoni G, Colleoni M. Precipitated and spontaneous withdrawal in rats tolerant to anandamide. *Psychopharmacol (Berl)* 2000;149:121–8.
- Cravatt BF, Prospéro-García O, Siuzdak G, et al. Chemical characterization of a family of brain lipids that induce sleep. *Science* 1995;268:1506–9.
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 1996;384:83–7.
- Crawley JN, Corwin RL, Robinson JK, Felder CC, Devane WA, Axelrod J. Anandamide, an endogenous ligand of the cannabinoid receptor, induces hypomotility and hypothermia in vivo in rodents. *Pharmacol Biochem Behav* 1993;46:967–72.
- Fedorova I, Hashimoto A, Fecik RA, Hedrick MP, Hanus LO, Boger DL, et al. Behavioral evidence for the interaction of oleamide with multiple neurotransmitter systems. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;299:332–42.
- Huitrón-Reséndiz S, Gombart L, Cravatt BF, Henriksen SJ. Effect of oleamide on sleep and its relationship to blood pressure, body temperature, and locomotor activity in rats. *Exp Neurol* 2001;172:235–43.
- Huitrón-Reséndiz S, Sanchez-Alavez M, Wills DN, Cravatt BF, Henriksen SJ. Characterization of the sleep-wake patterns in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Sleep* 2004;27:857–65.
- Lapovsky AD, Homanics GE, Basile A, Mendelson WB. Deletion of the GABA(A) receptor beta 3 subunit eliminates the hypnotic actions of oleamide in mice. *Neuroreport* 2001;12:4143–7.
- Leggett JD, Aspley S, Beckett SR, D'Antona AM, Kendall DA, Kendall DA. Oleamide is a selective endogenous agonist of rat and human CB1 cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol* 2004;141:253–62.
- Maione S, Bisogno T, de Novellis V, et al. Elevation of endocannabinoid levels in the ventrolateral periaqueductal grey through inhibition of fatty acid amide hydrolase affects descending nociceptive pathways via both cannabinoid receptor type 1 and transient receptor potential vanilloid type-1 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;316:969–82.
- Martínez-González D, Bonilla-Jaime H, Morales-Otal A, Henriksen SJ Velázquez-Moctezuma J, Prospéro-García O. Oleamide and anandamide effects on food intake and sexual behavior of rats. *Neurosci Lett* 2004;24(364):1–6.
- Mendelson WB, Basile AS. The hypnotic actions of oleamide are blocked by a cannabinoid receptor antagonist. *Neuroreport* 1999;10:3237–9.
- Mendelson WB, Basile AS. The hypnotic actions of the fatty acid amide, oleamide. *Neuropsychopharmacol* 2001;25:36–9.
- Murillo-Rodríguez E, Sánchez-Alavez M, Navarro L, Martínez-González D, Drucker-Colín R, Prospéro-García O. Anandamide modulates sleep and memory in rats. *Brain Res* 1998;812:270–4.
- Murillo-Rodríguez E, Cabeza R, Méndez-Díaz M, Navarro L, Prospéro-García O. Anandamide-induced sleep is blocked by SR141716A, a CB1 receptor antagonist and by U73122, a phospholipase C inhibitor. *Neuroreport* 2001;12:2131–6.
- Navarro L, Martínez-Vargas M, Murillo-Rodríguez E, Landa A, Méndez-Díaz M, Prospéro-García O. Potential role of the cannabinoid receptor CB1 in rapid eye movement sleep rebound. *Neuroscience* 2003;120:855–9.
- Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Raven Press; 1986.
- Prospéro-García O, Méndez-Díaz M. The role of neuropeptides in sleep modulation. *Drug News Perspect* 2004;17:518–22.
- Romero J, García L, Fernández-Ruiz JJ, Cebeira M, Ramos JA. Changes in rat brain cannabinoid binding sites after acute or chronic exposure to their endogenous agonist, anandamide, or to delta 9-tetrahydrocannabinol. *Pharmacol Biochem Behav* 1995;51:731–7.
- Rueda-Orozco P, Soria-Gómez E, Montes-Rodríguez CJ, Martínez-Vargas M, Galicia O, Navarro L, et al. A potential function of endocannabinoids in the selection of a navigation strategy by rats. *Psychopharmacol* 2008a;198:565–76.
- Rueda-Orozco P, Montes-Rodríguez CJ, Soria-Gómez E, Méndez-Díaz M, Prospéro-García O. Impairment of endocannabinoids activity in the dorsolateral striatum delays extinction of behavior in a procedural memory task in rats. *Neuropharmacol* 2008b;55:55–62.
- Santucci V, Storme JJ, Soubrié P, Le Fur G. Arousal-enhancing properties of the CB1 cannabinoid receptor antagonist SR 141716A in rats as assessed by electroencephalographic spectral and sleep-waking cycle analysis. *Life Sci* 1996;58:103–10.
- Viveros MP, Marco EM, File SE. Endocannabinoid system and stress and anxiety response. *Pharmacol Biochem Behav* 2005;81:331–42.