



Universidad Nacional Autónoma de México



Facultad de Psicología

*“Participación del sistema canabinoide en las alteraciones en los patrones de sueño en ratas adultas crecidas con privación de cuidado maternal”*

T E S I S

Que para obtener el grado de

L i c e n c i a d a e n P s i c o l o g í a

P r e s e n t a:

Nidia Mariel Reyes Prieto

Número de cuenta: 30332064-1

Director: Dr. Oscar Prospéro García

Revisora: Dra. Alejandra Ruiz Contreras

México, Ciudad Universitaria

2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Esta tesis se desarrolló en el laboratorio de Canabinoides, a cargo del Dr. Oscar Próspero García, en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, con el apoyo económico del Donativo IN208010 de DGAPA-UNAM y el Donativo 80148 de CONACyT.

**Dedico esta tesis a mis padres. Gracias mamá por enseñarme que una mujer puede lograr todos sus sueños, por admirarte tanto. Gracias papá por haberme enseñado que el trabajo y el esfuerzo son el único camino para llegar al éxito. Por ellos que me han enseñado que la vida se vive con pasión. Por su amor eterno, gracias.**

## ÍNDICE TEMÁTICO

<b>RESUMEN</b> .....	7
<b>1. MARCO TEÓRICO</b> .....	8
<b>1.1 Modelo; Privación de cuidado maternal (PCM)</b> .....	8
1.1.1 <i>Estrés y Privación de cuidado maternal (PCM)</i> .....	11
1.1.2 <i>Sueño y Privación de cuidado maternal (PCM)</i> .....	18
<b>1.2 Sistema canabinoide (SeC)</b> .....	22
1.2.1 Canabinoides.....	23
1.2.1.1 Fitocannabinoides.....	24
1.2.1.2 Canabinoides endógenos o endocannabinoides.....	25
1.2.1.3 Canabinoides sintéticos.....	26
1.2.1.4 Biosíntesis, difusión y eliminación.....	27
1.2.2 <i>Receptores a cannabinoides (CB1 y CB2)</i> .....	28
1.2.2.1 Mecanismos de transducción de cannabinoides.....	29
1.2.3 <i>Funciones del sistema canabinoide</i> .....	32
1.2.3.1 Sueño y endocannabinoides.....	33
1.2.3.2 Oleamida.....	34
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	37
<b>2.1 Pregunta de investigación</b> .....	37
<b>2.2 Justificación</b> .....	38
<b>2.3 Objetivos</b> .....	39
<b>2.4 Hipótesis</b> .....	40
<b>3 MATERIALES Y MÉTODO</b> .....	41
<b>3.1 Sujetos</b> .....	41
3.1.1 <i>Nacimiento y manejo de la cría</i> .....	41
<b>3.2 Fármacos</b> .....	42
3.2.1 <i>Fármacos para cirugía</i> .....	42
3.2.2 <i>Fármacos para registro EEG</i> .....	43

3.2.3 <i>Fármacos para Western Blot</i> .....	43
<b>3.3 Privación de cuidado materno (PCM)</b> .....	46
<b>3.4 Cirugía estereotáxica</b> .....	47
<b>3.5 Registros electroencefalográficos (EEG)</b> .....	48
3.5.1 <i>Grupos para el registro EEG</i> .....	50
3.5.2 <i>Dosis y administración de fármacos</i> .....	50
<b>3.6 Western Blot</b> .....	52
<b>3.7 Análisis estadísticos</b> .....	53
3.7.1 <i>Datos de registro EEG</i> .....	53
3.7.2 <i>Datos de Western BLOT</i> .....	54
<b>4. RESULTADOS</b> .....	55
<b>4.1 Tiempos totales: Vigilia</b> .....	55
<b>4.2 Tiempos totales: SOL</b> .....	61
<b>4.3 Tiempos totales: MOR</b> .....	65
<b>4.4 Latencias</b> .....	69
<b>4.5 Transiciones</b> .....	70
<b>4.6 Número de episodios</b> .....	71
<b>4.7 Duración promedio de episodios</b> .....	73
<b>4.8 Resultados de Western Blot</b> .....	76
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	79
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	89
<b>7. ANEXO 1</b> .....	90
<b>8. REFERENCIAS</b> .....	98

## ABREVIATURAS

<b>2-AG</b>	2-araquidonil-glicerol
<b>ACTH</b>	Hormona liberadora de adrenocorticotropina
<b>AM-251</b>	Antagonista canabinérgico
<b>ANA</b>	Anandamida
<b>CB1</b>	Receptor a canabinoides 1
<b>CB2</b>	Receptor a canabinoides 2
<b>CKT</b>	Coctel
<b>CPF</b>	Corteza prefrontal
<b>CRH</b>	Hormona liberadora de corticotropina
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DPN</b>	Día postnatal
<b>EEG</b>	Electroencefalograma
<b>EMG</b>	Electromiograma
<b>FAAH</b>	Amido-hidrolasa de ácidos grasos
<b>GR</b>	Receptor a glucocorticoides
<b>HIP</b>	Hipocampo
<b>HPA</b>	Hipófisis-pituitaria-adrenal
<b>HRS</b>	Horas
<b>IP</b>	Intraperitoneal
<b>MAGL</b>	Monoacilglicerol-lipasa
<b>MD</b>	Privación maternal
<b>NAc</b>	Núcleo accumbens
<b>NPCM</b>	No privación de cuidado maternal
<b>NS</b>	No separada (sin PCM)
<b>OLE</b>	Oleamida; agonista canabinoide
<b>PCM</b>	Privación de cuidado maternal
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>S</b>	Separada (con pcm)
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>SeC</b>	Sistema canabinoide
<b>MOR</b>	Sueño de movimientos oculares rápidos
<b>SOL</b>	Sueño de ondas lentas
<b>THC</b>	9 $\Delta$ -tetrahydrocannabinol
<b>TRIS</b>	Tris(hidroximetil)aminometano
<b>VEH</b>	Vehículo
<b>WB</b>	Western Blot

## ***RESUMEN***

Diversos factores ambientales durante el período neonatal juegan un papel fundamental en el establecimiento de características neurobiológicas de los individuos. Por ejemplo; el estrés durante las etapas tempranas de la vida produce alteraciones en variables neurofisiológicas y en el comportamiento de animales adultos. El ciclo sueño-vigilia es uno de los procesos fisiológicos que muestra cambios significativos inducidos por el estrés temprano. Uno de los sistemas que interviene en la regulación de tal proceso es el sistema canabinoide (SeC).

Este estudio tuvo por objetivos; a) mostrar los cambios en el patrón sueño-vigilia en animales que fueron sometidos a privación de cuidado maternal (PCM) b) evaluar los efectos de la oleamida (OLE), canabinoide endógeno, y del AM-251, antagonista de los receptores canabinoides tipo 1 (CB1), sobre el ciclo sueño-vigilia de estos animales y c) determinar las concentraciones del CB1 en Corteza Prefrontal (CPF), Núcleo Accumbens (NaC) e Hipocampo (HIP) de los animales con PCM.

Un grupo de ratas Wistar fue separado de su madre desde el día postnatal 2 (DPN2) hasta DPN15 por 3 horas diarias, mientras que a otro grupo se le mantuvo todo el tiempo con la madre. Al final de este periodo, todas las crías expuestas a la PCM se mantuvieron con la madre hasta el DPN21. Una vez que las crías alcanzaron los 250 g de peso; éstas fueron sometidas a una cirugía estereotáxica estándar para un registro electroencefalográfico (EEG). Después de su recuperación, las ratas recibieron una administración sistémica de OLE, vehículo, AM-251 o una combinación de OLE/AM-251 y se sometieron a un registro EEG durante 24 horas. También se incorporó un grupo con PCM para evaluar el CB1 en CPF, NAc e HIP mediante la técnica de Western Blot (WB).

Los resultados muestran que la PCM induce cambios en los patrones de sueño, disminuyendo el tiempo total de sueño MOR y aumentando la Vigilia. También muestran que la activación del SeC aumenta la cantidad de sueño en ratas con PCM. Los grupos con PCM mostraron una reducción de los receptores CB1 en CPF e HIP y un aumento en el NAc.

Se concluye de este estudio que la PCM altera los patrones de sueño y que alteraciones en el SeC pueden subyacer a dichas alteraciones.

# 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1 Modelo de Privación de Cuidado Maternal (PCM)

Las experiencias tempranas de vida son decisivas en la manera en que nos comportamos en la vida adulta. Estas experiencias pueden modular los patrones fisiológicos y conductuales en la vida de un individuo adulto (Ladd *et al.* 2000; Lehmann and Feldon, 2000). La presencia de eventos estresantes en la vida temprana de un sujeto son reportados con mayor frecuencia en pacientes que padecen desordenes psiquiátricos, (Dozier and Peloso, 2006; Heim and Nemeroff, 1999; Heim and Nemeroff, 2001; Rapee, 1997). Múltiples estudios experimentales muestran que la relación entre experiencias aversivas neonatales, y las alteraciones a largo plazo en la neurobiología, fisiología y comportamiento de los animales adultos son muy frecuentes (Gutman and Nemeroff, 2002; Pryce *et al.* 2001; Pryce *et al.* 2005; Slotten *et al.* 2006). La relevancia de estas observaciones ha generado todo un campo experimental que trata de explicar la conducta de los animales adultos en función de su desarrollo en las primeras etapas de la vida.

Con el fin de estudiar el efecto que las manipulaciones afectivas en la vida temprana de un individuo ejercen sobre la vida adulta del mismo; se han creado modelos experimentales en animales donde se involucra la manipulación/alteración de la relación madre-hijo. Estos modelos hacen énfasis en la importancia del ambiente temprano y su posible relación con el desarrollo de alteraciones fisiológicas (Bremne and Vermetten, 2001a; Milde *et al.* 2004; Slotten *et al.* 2006), alteraciones cognitivas (Aisa *et al.* 2009a; Aisa *et al.* 2009b; Kosten *et al.* 2007), conductuales (Advani *et al.* 2007; Colorado *et al.* 2006; Daniels *et al.* 2004) e inclusive psicopatologías (Caspi *et al.* 2003; Coplan *et al.* 1996; Heim and Nemeroff, 2001) a lo largo de la vida. Por ejemplo, existe una relación directa entre los eventos adversos en la vida temprana de un

individuo con el riesgo de padecer psicopatologías en la vida adulta, del tipo de depresión, esquizofrenia o trastornos de ansiedad (McEwen, 2003; Nemeroff CB, 2004; Nemeroff, 2004; Parker, 1983; Repetti *et al.* 2002).

Los modelos que utilizan la manipulación de la relación madre-hijo son descritos de muchas maneras (modelo de separación maternal, modelo de privación del cuidado maternal, modelo de manipulación temprana, modelo de estrés postnatal, modelo de estrés neonatal) y divergen en su método (duración, frecuencia y calidad de la manipulación de la relación madre-hijo) (Meaney, 2001; Pryce *et al.* 2005). Así, se ha señalado que dependiendo de las divergencias en el método también se encuentran diferencias en los resultados (Gutman and Nemeroff, 2002; Lehmann *et al.* 2002; Lehmann and Feldon, 2000; Levine *et al.* 1991; Mintz *et al.* 2005; Pryce *et al.* 2002; Pryce and Feldon, 2003; Suchecki and Tufik, 1997; Zimmerberg and Shartrand, 1992). Estos modelos básicamente actúan sobre la relación madre-hijo, limitando el tiempo que las crías permanecen bajo el cuidado de su madre.

Uno de estos modelos, el cual fue empleado en el presente estudio, fue diseñado por Plosky & Meaney en 1993 (Plotsky and Meaney, 1993). En este modelo se separan a las crías de su respectiva madre durante tres horas diarias desde el día postnatal 2 (DPN2) hasta el DPN15. Anteriormente, muchos grupos de investigación han utilizado este modelo para estudiar el efecto de la privación de cuidado maternal en la vida adulta (Biagini *et al.* 1998; Caldji *et al.* 2000; Daniels *et al.* 2004; Kalinichev *et al.* 2002; Wigger and Neumann, 1999).

La relación existente entre la calidad del ambiente temprano y la salud de la vida adulta pareciera estar mediada por influencias parentales en el desarrollo de sistemas neurales que modulan la respuesta conductual y endocrina al estrés (Francis and Meaney, 1999; Heim *et al.* 2000; Heim *et al.* 2002; Heim and Nemeroff, 2002). En este sentido, se ha descrito que el efecto inmediato ante un estímulo percibido como estresante es el incremento del estado de alerta y la vigilia (Singareddy and Balon, 2002). Una característica de estos modelos consiste en la modificación de la relación madre-hijo lo cual genera cierta vulnerabilidad para desarrollar patologías, una consecuencia que se postula podría estar mediada por el efecto del cuidado maternal en el desarrollo de diferencias individuales frente al estrés (Dozier and Peloso, 2006; Parker, 1983; Rapee, 1997).

La conclusión más contundente de estos modelos es que las experiencias tempranas de la vida (el cuidado maternal, el ambiente adverso temprano) influyen directamente sobre el desarrollo de sistemas cortico-límbicos que regulan las respuestas endocrinas y emocionales ante el estrés (Caldji *et al.* 1998; Caldji *et al.* 2003; Champagne and Meaney, 2006; Francis *et al.* 1999b; Heim *et al.* 2000; Heim *et al.* 2002; Liu *et al.* 1997; Toki *et al.* 2007; Weaver *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2005) y por lo tanto, si este ambiente es aversivo, las consecuencias serán negativas y a largo plazo.

En los animales adultos la exposición a un estrés intenso tiene efectos negativos en la estructura y función cerebral. Las consecuencias de éste pueden ser manifestadas inmediatamente después del estrés (McEwen, 1999) o como un déficit, vulnerabilidad o patología en la vida posterior (McEwen, 2002). Además se cree que las experiencias estresantes

están muy asociadas al desarrollo de alteraciones fisiológicas y psicológicas (Heim and Nemeroff, 1999; Mazure *et al.* 1995); lo que sugiere que el modelo de privación de cuidado maternal repercute en animales adultos provocando alteraciones conductuales, endocrinas y fisiológicas como consecuencia de una alta reactividad ante el estrés (Aisa *et al.* 2007; Anisman *et al.* 1998; Ladd *et al.* 2000; Lehmann and Feldon, 2000; Ploj *et al.* 2003).

### 1.1.1 Estrés y el Modelo de Privación de Cuidado Maternal (PCM)

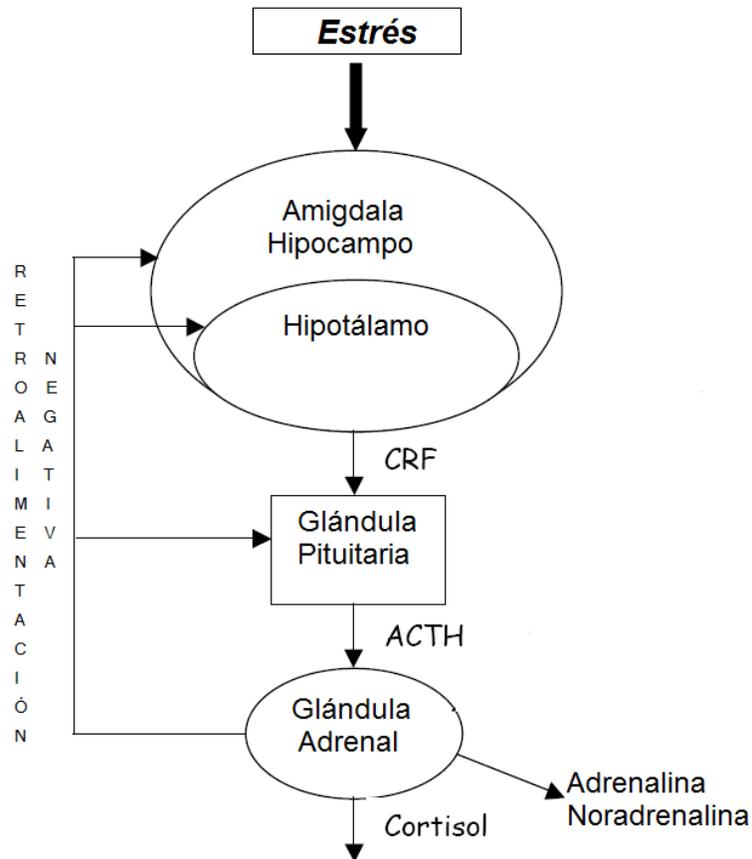
El estrés constituye un estado en que la homeostasis, procesos que mantienen la constancia del medio interno mediante un equilibrio fisiológico, está siendo amenazada por situaciones o estímulos internos o externos (estresores). Cuando un organismo está bajo un estado de estrés, la homeostasis se recupera por un repertorio extenso de respuestas adaptativas tanto fisiológicas como conductuales (Chrousos *et al.*, 1988; 1996). Cuando un estresor (psíquico o físico) excede un umbral temporal y un umbral de magnitud, los sistemas adaptativos homeostáticos activan una serie de respuestas compensadoras que corresponden a la magnitud del estresor. Los sistemas del estrés coordinan todos estos procesos (Chrousos and Gold, 1992).

Como se muestra en la Figura 1, en el sistema nervioso central (SNC) la respuesta al estrés incluye la facilitación de vías neurales que desencadenan funciones adaptativas como el estado de vigilia, el alertamiento y la atención enfocada. También se inhiben vías neurales que desencadenan funciones no adaptativas, como el comer, el dormir, etc. (Charmandari *et al.* 2005).

<b>Funciones centrales y periféricas de la respuesta al estrés</b>	
<b>Funciones del Sistema Nervioso Central</b>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Facilitación del estado de vigilia, de la cognición, la atención y la agresión.</li> <li>▪ Inhibición de funciones vegetativas (reproducción, alimentación, crecimiento)</li> <li>▪ Activación de hazas de retroalimentación reguladoras.</li> </ul>
<b>Funciones Periféricas</b>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incremento de la oxigenación</li> <li>▪ Nutrición del cerebro, del corazón y músculos</li> <li>▪ Incremento en el tono cardiovascular y respiratorio</li> <li>▪ Incremento del metabolismo (aumenta el catabolismo y se inhibe la reproducción y el crecimiento)</li> <li>▪ Incremento de la destoxificación de productos metabólicos y sustancias extrañas al organismo.</li> <li>▪ Activación de hazas de retroalimentación regulatoria (incluye inmunosupresión)</li> </ul>

**Fig. 1: Funciones centrales y periféricas de la respuesta al estrés** .Tomado y modificado de (Chrousos, 2009).

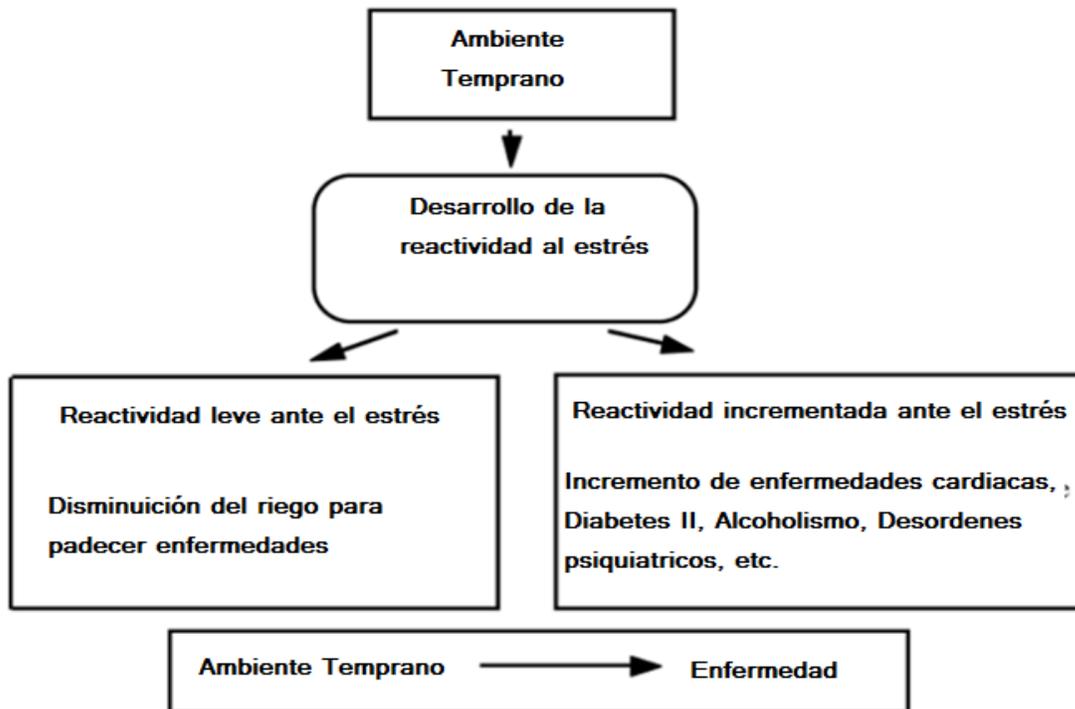
Quizá el componente más importante del organismo que regula la respuesta ante el estrés es el eje hipotálamo-pituitaria-adrenales (HPA). Este sistema es activado cuando el organismo percibe cambios en el ambiente que pueden parecerle amenazantes. Así, el hipotálamo se activa secretando la hormona liberadora de corticotropina (CRF) hacia la sangre y éste estimula a la pituitaria para que libere la hormona adrenocorticotropina (ACTH). La ACTH llega a la circulación y viaja a las glándulas adrenales donde estimula y libera el cortisol en la sangre. El grado de secreción del cortisol se regula por una vía de retroalimentación negativa y bloquea al sistema, manteniendo a un nivel óptimo la propia concentración de cortisol (Fig. 2) (Shea *et al.* 2005).



**Fig. 2: Eje HPA.** En respuesta al estrés, el hipotálamo libera corticoesterona (CRF) y ésta estimula la hormona adrenocorticotropa (ACTH) que se libera en la glándula pituitaria. La ACTH afecta las glándulas adrenales y éstas liberan cortisol. La inhibición de la activación de este eje HPA ocurre a través de una retroalimentación negativa con base en distintos niveles. La adrenalina y la noradrenalina se liberan de las glándulas adrenales en respuesta al estrés. Figura tomada y modificada de (Marmendal *et al.* 2004).

En los estudios de privación de cuidado maternal en ratas (separación maternal prolongada) se observaron trastornos del eje HPA que provocaron un incremento en la secreción de CRH, ACTH y corticoesterona, tanto en condiciones basales como en situaciones de estrés (Biagini *et al.* 1998; Daniels *et al.* 2004; Huot *et al.* 2001; Kalinichev *et al.* 2002; Nemeroff, 1996; Plotsky *et al.* 2005). También en estos animales existe una menor inhibición del eje HPA (Ladd *et al.* 2004), por lo que muestran una alta reactividad ante el estrés (Aisa *et al.* 2007; Anisman *et al.* 1998; Ladd *et al.* 2000; Lehmann and Feldon, 2000; Ploj *et al.* 2003).

Las alteraciones encontradas en el eje HPA de estos animales, sugieren que estos sujetos padecen un incremento en la respuesta endocrina y conductual ante el estrés (Ladd *et al.* 1996; Plotsky and Meaney, 1993), efectos que persisten a lo largo de la vida del animal (Meaney *et al.* 1988) y que se asocian con alteraciones conductuales y de salud (Francis *et al.* 1999a). Se especula que la causa del incremento en la reactividad al estrés se debe a las experiencias tempranas de la vida, las cuales sensibilizan circuitos neuronales específicos y como consecuencia, incrementan la vulnerabilidad para padecimientos fisiológicos y psicológicos (Anisman *et al.* 1998; Heim and Nemeroff, 2001). Tal como se muestra en la Figura 3.

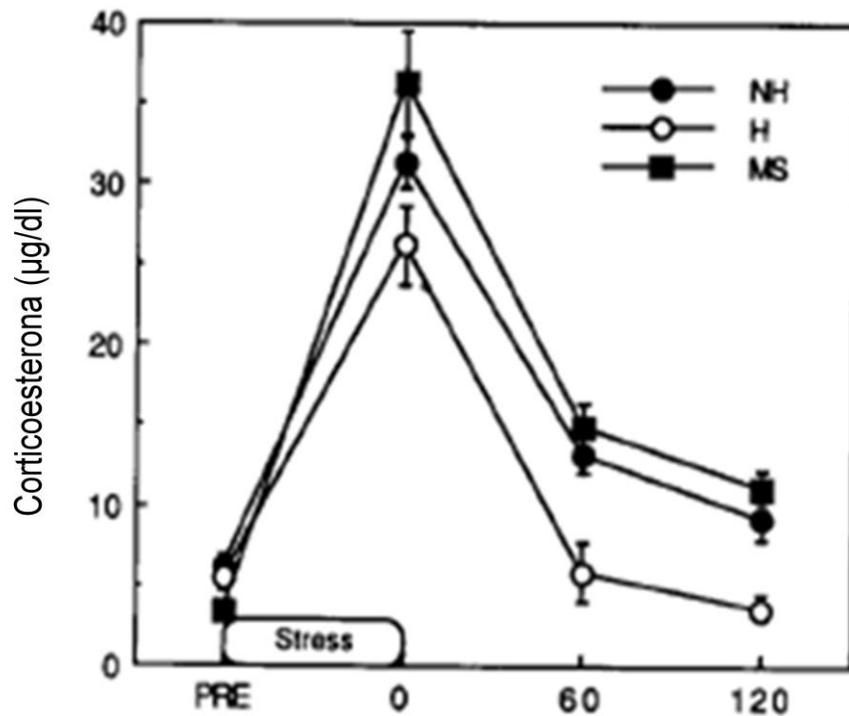


**Fig. 3: Modelo de estrés temprano.** Relación Causa-Efecto del ambiente temprano. Tomado y modificado de (Francis and Meaney, 1999).

Estas sugerencias son apoyadas por estudios que muestran los efecto contrastantes, entre dos modelos experimentales, la manipulación excesiva de las crías y la privación de cuidado

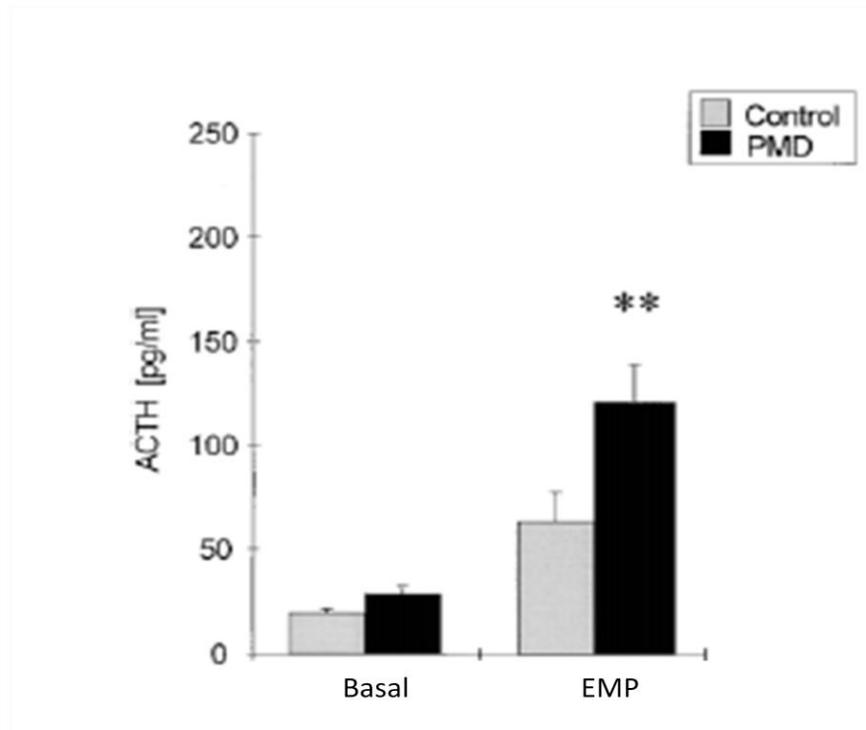
maternal (PCM) (Anisman *et al.* 1998; Ladd *et al.* 2000; Lehmann and Feldon, 2000; Newport *et al.* 2002; Pryce and Feldon, 2003).

Otros estudios como los de Plotsky *et al.* (1993), muestran que la PCM durante 3 horas diarias los primeros 15 días de vida provoca un incremento en los niveles de CRF, y un aumento significativo de la corticoesterona en plasma después de un periodo de estrés (Fig. 4) (Plotsky and Meaney, 1993).



**Fig. 4: Efecto de la PCM y de la manipulación temprana sobre los niveles de corticoesterona.** Se muestra el nivel de corticoesterona en plasma de ratas antes (PRE) y después (0, 60 y 120 min) de haber sido sometidas a 20 min de estrés por inmovilización. NH= no manipuladas. H: Manipuladas. MS: PCM por 3 hrs. Tomada y modificada de de (Plotsky and Meaney, 1993).

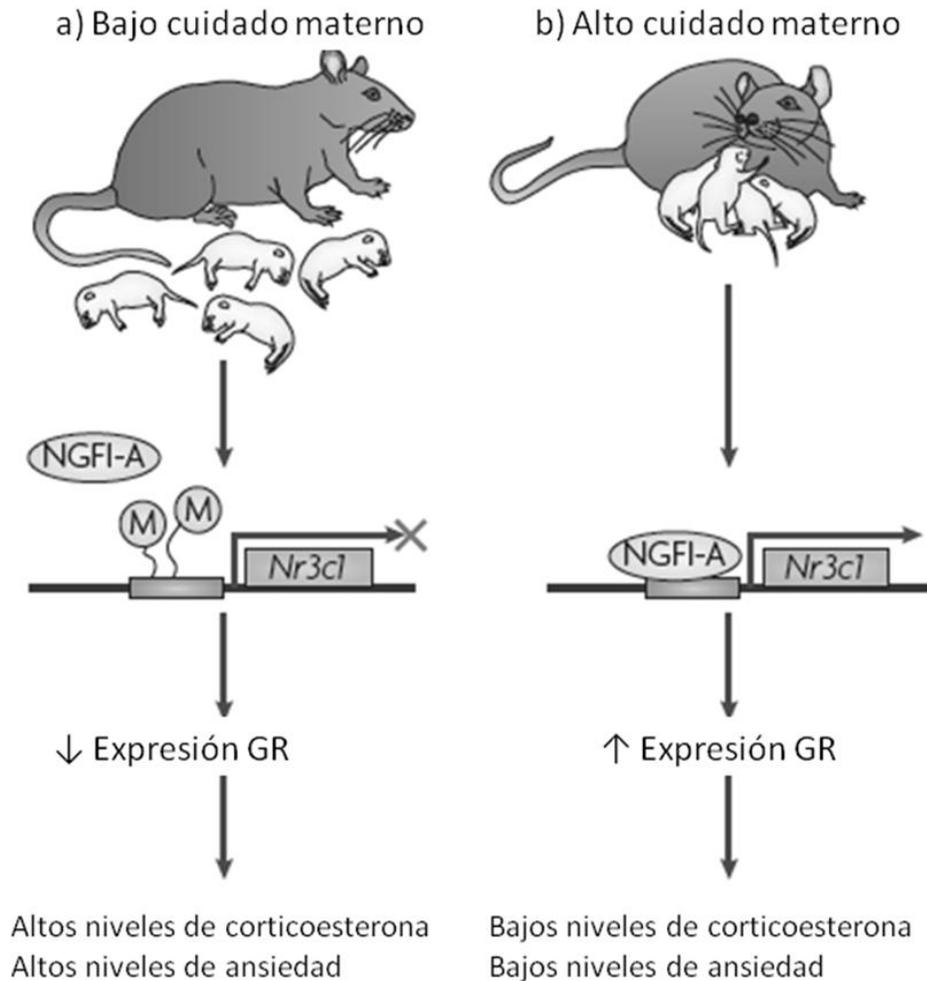
Wigger et al. (1999) mostraron que las ratas con PCM tienen una respuesta elevada de ACTH tras un periodo de estrés (Fig. 5). (Wigger and Neumann, 1999).



**Fig. 5: Efecto de la PCM en los niveles de ACTH en sangre.** Se muestran las concentraciones de ACTH en ratas sometidas a PCM. Se observan dos mediciones, una bajo condiciones basales y otra 5 min después de la exposición al laberinto de brazos abiertos elevado (EPM, por sus siglas en inglés). PMD= privación de cuidado maternal. Tomada y modificada de Wigger, et al., 1999.

Los trabajos de Adriana Feder et al. (2009), los cuales se relacionan con los aspectos neurobiológicos y epigenéticos del estrés, han mostrado que el cuidado materno en la vida temprana resulta en diferencias significativas sobre respuestas al estrés. Por ejemplo; los sujetos con poco cuidado maternal muestran niveles bajos del NGFI-A (factor de crecimiento neural tipo A) en el hipocampo, ocasionando un incremento de la metilación del gen promotor para el receptor a glucocorticoides (GR) y esto provoca una expresión menor del GR. Al existir menos

GR, se deteriora el sistema de retroalimentación negativa de regulación de los glucocorticoides y la concentración de corticoesterona en plasma se eleva. (Fig. 6)



**Fig.6: Mecanismos epigenéticos de la respuesta al estrés.** Se observa como el bajo cuidado maternal afecta los niveles del factor de crecimiento neural tipo A, aumentando la metilación (M) del gen promotor para GR (Nr3C1), disminuyendo la expresión de GR y provocando altos niveles de corticoesterona y alta ansiedad. Tomada y modificada de; Feder, et al., 2009.

Estos resultados son indicativos de la importancia de la manipulación en las primeras etapas de la vida sobre el desarrollo de los sistemas homeostáticos de los individuos.

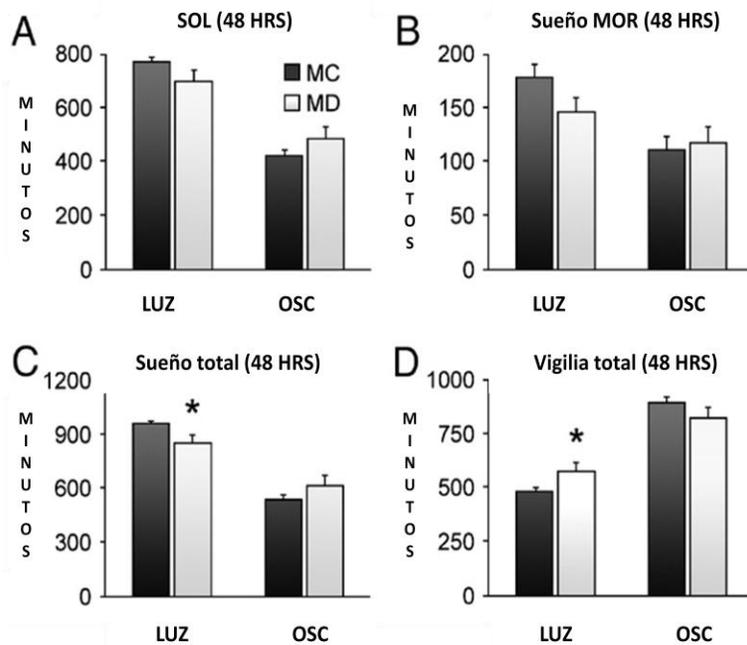
### 1.1.2 Sueño y el Modelo de privación de cuidado maternal

Uno de los procesos fisiológicos y conductuales que se ven modificados por la PCM en la infancia, es la modulación del estado vigilia-sueño. La relación entre estrés y el ciclo sueño-vigilia ha sido estudiada desde hace muchos años. En general el estrés agudo reduce el tiempo de sueño (Tang *et al.* 2005). Efecto similar al que provoca el estrés inducido en periodos más largos, ya que incrementan el tiempo total de vigilia (Papale *et al.* 2005). Los mecanismos por los cuales la PCM induce las alteraciones neurofisiológicas referidas, son desconocidos. Probablemente estos efectos sean consecuencia de la alteración en varios de los neurotransmisores y neuromoduladores que fisiológicamente controla el desarrollo del ciclo vigilia-sueño.

El sueño constituye un fenómeno biológico que puede ser definido en función de ciertos criterios conductuales. Estos criterios constan de: posturas estereotipadas o específicas de la especie, un mantenimiento de quietud conductual, una elevación del umbral de excitación y una reversibilidad relativamente fácil mediante estimulación (Flanigan, Jr. *et al.* 1973; Fuller *et al.* 2006). Aunque muchos de los mecanismos implicados en el sueño son aún desconocidos existen múltiples teorías que proponen la participación de muchos núcleos, vías neuronales y sistemas de neurotransmisores con el fin de explicar la regulación del ciclo sueño-vigilia. La participación de neurotransmisores en la regulación del sueño, fue puesta en evidencia al comienzo del siglo pasado, cuando Pieròn introduce el concepto y la evidencia experimental de la existencia de un factor neuroquímico que se acumula en el cerebro durante la vigilia y eventualmente induce el sueño (Pieròn *et al.*, 1913). Sin embargo; no fue hasta los años 60`s, cuando con técnicas más

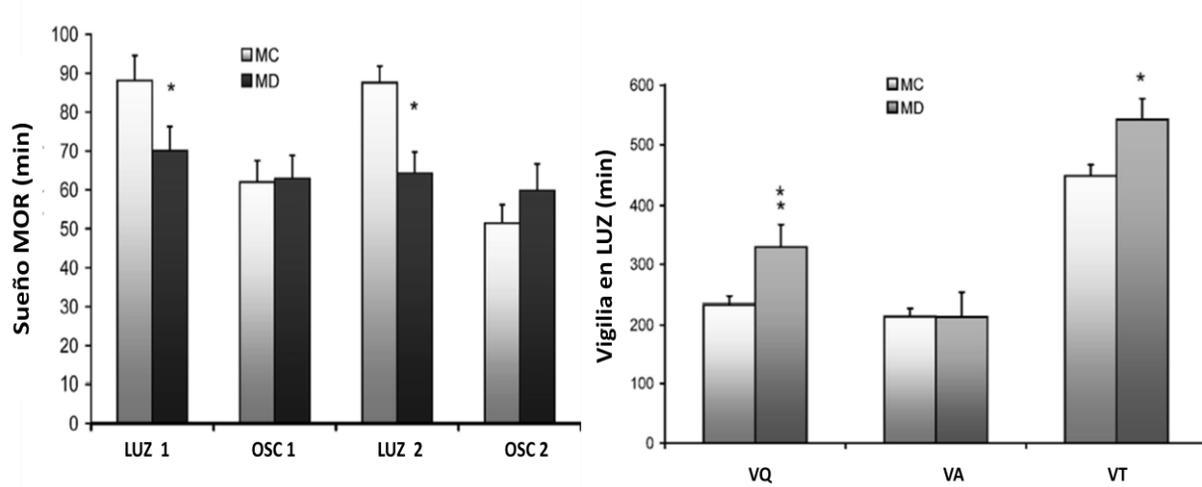
avanzadas, Jouvet establece una relación de neurotransmisores y sistemas neuronales específicos que generan y mantienen el sueño (Jouvet, 1969). Posteriormente, se ha descrito además, la implicación de hormonas y péptidos en la modulación del ciclo sueño-vigilia (Adrien *et al.* 1991; Ehlers *et al.* 1986; Obal, Jr., 1986; Obal, Jr. *et al.* 1986; Prospero-Garcia *et al.* 1986).

En relación con los estudios experimentales y el modelo de privación de cuidado maternal Pingfu Feng *et al.* (2007) han estudiado la implicación de la PCM y el sueño. En un estudio realizado por dicho grupo en el que emplearon el modelo de PCM durante 6 horas por 15 días consecutivos, encontraron que las ratas que fueron sometidas a la PCM mostraron un decremento en el tiempo total de sueño durante la fase de luz, la cual corresponde a la noche en el humano, sin diferencia alguna entre sueño de movimientos oculares rápidos (MOR) o sueño de ondas lentas (SOL) (Fig. 7) (Feng *et al.* 2007b).



**Fig. 7: Efecto de la PCM sobre el tiempo total de sueño y de vigilia.** Se muestra un decremento en el tiempo total de sueño durante la fase de luz en un registro de 48 hrs. No hay diferencias significativas entre el tiempo transcurrido en SOL o sueño MOR. MC= sin PCM. MD= con PCM. Tomado y modificado de Pingfu Feng, *et al.*, 2007.

A nivel molecular, la PCM incrementó la concentración de CRH hipotalámica y de la orexina A (una neurohormona excitadora cerebral que promueve la vigilia) (Jones, 2005), así como el receptor 1 a esta orexina (OX1R). El grupo de Feng propone que el estrés tiene impacto en la regulación de la vigilia tanto por la CRH como por el sistema orexinérgico (Feng *et al.* 2007a). Este estudio muestra que en las ratas con PCM existe una hiperactivación neurobiológica del sueño, típica del insomnio en humanos. (Feng *et al.* 2007b). En otro estudio más reciente del mismo grupo de Feng, además del aumento en la vigilia durante la fase de luz, la disminución del sueño es específica para el sueño MOR (Fig. 8) (Feng *et al.* 2011).



**Fig. 8: Efecto de la PCM sobre el ciclo sueño-vigilia.** Se observa un decremento en el tiempo total de sueño MOR durante la fase de luz y un incremento del tiempo total de vigilia quieta (VQ) durante la misma fase. VQ= vigilia quieta. VT= vigilia total. MC= sin PCM. MD= con PCM. Tomado y modificada de Feng, *et al.*, 2011.

Existen múltiples factores que pueden modificar los patrones de sueño de los individuos, quizá ninguno sea tan contundente como el estrés. Este proceso al activar al eje HPA estimula el estado de alerta y suprime el sueño (Chrousos, 2007). Existen múltiples observaciones sobre la relación estrés / ciclo sueño-vigilia (Friess *et al.* 1995). Por ejemplo; los pacientes con niveles altos de cortisol duermen menos y presentan más despertares durante la noche (Born and Fehm,

1998). La administración de glucocorticoides induce una notable reducción de sueño MOR (Born *et al.* 1987; Fehm *et al.* 1986). También se ha encontrado que en gatos (Koranyi *et al.* 1971), conejos (Ono *et al.* 1969) y ratas (Cohen *et al.* 1970) al inyectar adrenocorticotropina se suprime el sueño MOR y se incrementa la vigilia. Además, muchos estudios revelan que una situación estresante puede alterar de manera importante los patrones de sueño, siendo el sueño MOR el principal afectado por la activación del eje HPA (Adrien *et al.* 1991; Bonnet *et al.* 1997; Bouyer *et al.* 1998; Rampin *et al.* 1991; Vazquez-Palacios and Velazquez-Moctezuma, 2000). En resumen, los resultados de estos estudios muestran que el estrés disminuye el sueño y como consecuencia aumentan la vigilia y el estado de alerta.

Los mecanismos por los cuales la PCM induce las alteraciones neurofisiológicas referidas, son desconocidos. Probablemente estos efectos sean consecuencia de la alteración en varios de los neurotransmisores y neuromoduladores que controlan el desarrollo del ciclo vigilia-sueño. Varios estudios (Genest *et al.* 2007; Morrison *et al.* 2003; Pawlyk *et al.* 2008; Tiba *et al.* 2004) han analizado la participación de sistemas gabaérgicos o dopaminérgicos en los patrones del ciclo vigilia-sueño de estos sujetos y han mostrado como se pueden modificar por la administración de fármacos de esta índole.

Dentro del conjunto de sustancias químicas cerebrales que de alguna forma modulan algunos de los aspectos del ritmo vigilia-sueño, se encuentran los endocannabinoides (eCBs), los cuales constituyen sustancias neuromoduladoras producidas por el cerebro con efectos muy similares a los cannabinoides provenientes de la planta de la marihuana. Este sistema se describirá a continuación por ser objetivo de estudio en esta tesis.

## 1.2 Sistema Canabinoide (SeC)

La planta de marihuana, *Cannabis sativa* (Figura 9), originaria de Asia, ha sido utilizada por el hombre desde la antigüedad. Ya es mencionada desde el año 2737 a.C. en un tratado atribuido al emperador Shen-nung (China) y en las tabletas cuneiformes de la época de Asurbanipal, 650 a.C. Herodoto describió el efecto euforizante de los baños de vapor de los escitas que la usaban para aliviar el dolor familiar en los ritos funerarios. Los relatos de Marco Polo y las Mil y una noches cuentan que era cultivada para obtener el cáñamo y los efectos psicoactivos en Asia y Oriente. En la mitología hindú, en el *Raja Valabha* de los antiguos Vedas, se menciona: "Los Dioses se apiadaron de los hombres y les regalaron la ganja (cannabis) para que alcanzaran la inspiración, perdieran el miedo y conservaran el deseo sexual".



**Figura 9: Cannabis Sativa.**

Hoy en día, la marihuana es una de las drogas de abuso de consumo más extendido en el mundo. Sus efectos biológicos se deben a un conjunto de compuestos presentes en la resina secretada por las hojas y brotes florecidos de la planta, la que produce aproximadamente

cuatrocientos compuestos químicos, de los cuales unos sesenta se consideran dentro del grupo de los cannabinoides (Grotenhermen, 2003; , 2004; , 2005).

La Cannabis sativa ha sido utilizada con fines terapéuticos, religiosos y recreativos; la popularidad de la marihuana como droga recreativa se debe a la capacidad que esta posee para alterar la sensopercepción (Pacher *et al.* 2006), además de ser relajante muscular, aumenta el apetito, tiene un efecto de analgesia y facilita el deseo sexual (ver Prospéro-García, et al., 2004).

En 1964 se identificó el principal componente psicoactivo de la marihuana el cual es el  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC) (Mechoulam and Gaoni, 1967). En 1988 se caracterizó al receptor del THC (Devane *et al.* 1988) y dos años después se clonó dicho receptor, al que se denominó receptor a cannabinoides, 1 (CB1). Esto dio origen a múltiples experimentos que trataron de identificar a las sustancias endógenas que fuesen los ligandos fisiológicos de dichos receptores a estos compuestos se le llamó endocannabinoides (eCBs) (Matsuda *et al.* 1990).

### 1.2.1 Canabinoides

Los cannabinoides son sustancias que tienen una estructura carbocíclica de 21 carbonos y están formados generalmente por tres anillos, ciclohexano, tetrahidropirano y benceno. Existen varias clasificaciones de los cannabinoides, en este trabajo se adopta la que se basa en el origen de los cannabinoides: A) Los fitocannabinoides, grupo de compuestos terpenoides que se producen como metabolitos secundarios en el Cannabis sativa B) Los cannabinoides endógenos o eCBs que se producen naturalmente en el sistema nervioso e inmune de los animales y seres humanos y C)

Los cannabinoides sintéticos, grupo de sustancias de variada estructura química que se acoplan a los receptores cannabinoides (Grotenhermen, 2005).

### 1.2.1.1 Fitocannabinoides

Los fitocannabinoides, pertenecen al grupo de los cannabinoides clásicos, son compuestos formados por unidades de 5-carbonos, ensambladas y modificadas de diversas maneras, siempre basadas en el esqueleto del isopentano. Se producen como metabolitos secundarios en la *Cannabis sativa* son casi insolubles en agua pero solubles en lípidos, alcoholes, y otros solventes no polares. El principal cannabinoide de la planta es, el THC (Fig. 10) que es el cannabinoide con mayor potencia psicoactiva (Mechoulam and Gaoni, 1967). Además existe el  $\Delta^8$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^8$ -THC) el cual tiene un perfil farmacológico muy parecido al del  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol aunque sus efectos son más débiles y su concentración es muy pequeña (Mechoulam *et al.* 1994). El canabidiol (CBD), cannabinol (CBN), canabicromeno (CBC), canabicitrol (CBL), canabigerol (CBG), monometiléter del canabigerol (CBGM), canabielsoina (CBE), canabinodiol (CBND), canabitriol (CBT), dehidrocannabinofurano y canabicitrano, que aparecen en cantidades diferentes según la variedad de *Cannabis sativa* valorada (Condie *et al.* 1996; Hampson *et al.* 1998; Zuardi *et al.* 1982).

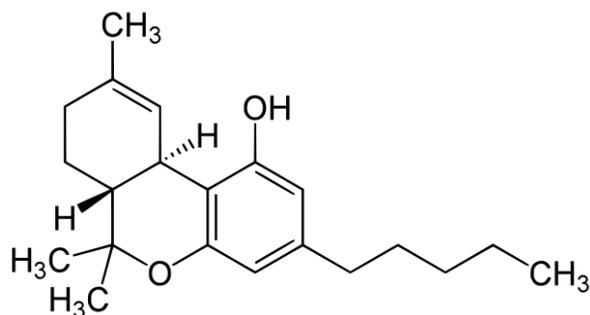
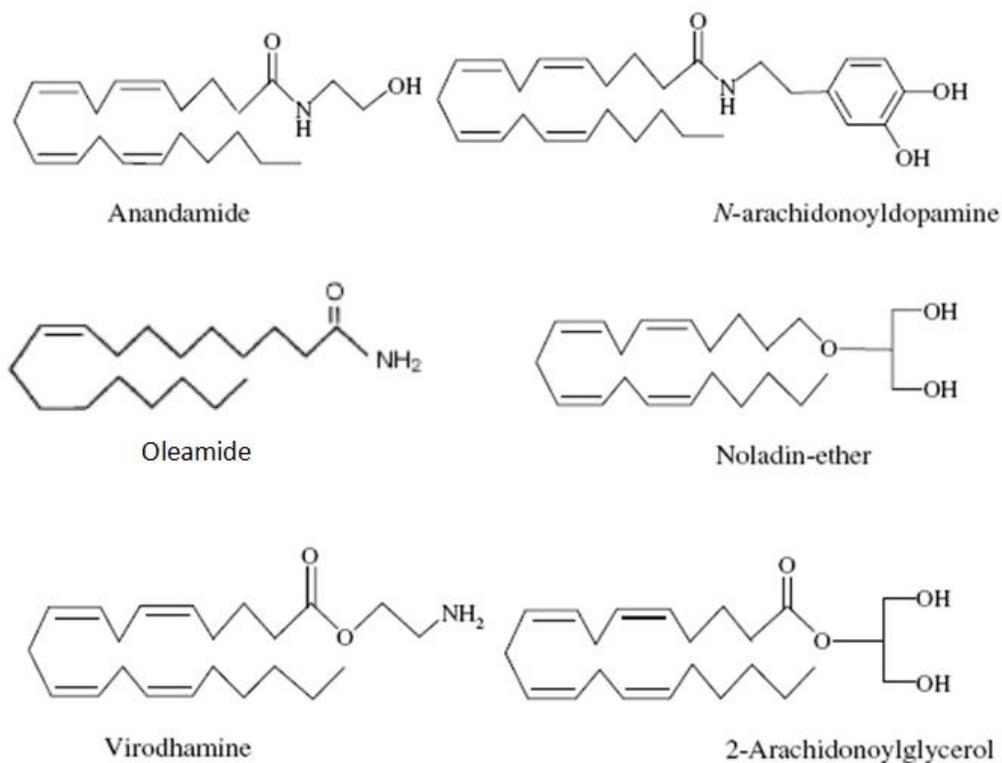


Fig.10: Estructura química del THC

### 1.2.1.2 Canabinoides endógenos o eCBs

A partir del descubrimiento de receptores a canabinoides y de la disponibilidad de canabinomiméticos (moléculas que se unen al receptor), se comenzó la identificación de una familia de transmisores lípidos que funcionan como ligandos del receptor CB1. Estos, se producen naturalmente por los mamíferos y por ende son llamados eCBs (Di, V and Fontana, 1995). La mayoría de los eCBs son derivados del ácido araquidónico, un lípido que forma parte de la membrana celular y que combinado con una molécula de etanolamida o de glicerol forma el eCB.

El primer eCB que se identificó fue la Anandamida (*ananda*=“bendición interna”) (Devane *et al.* 1992). Dicha sustancia es capaz no sólo de unirse de manera selectiva a los receptores canabinoides sino que, además, media muchos de los efectos típicos producidos por los canabinoides (Pertwee *et al.* 1995). Además de la anandamida (ANA), los eCBs descritos en la actualidad son: la (N-araquidonil-etanolamida, AEA) (Devane *et al.* 1992), el 2-araquidonil-glicerol (2-AG) (Mechoulam *et al.* 1995), la oleamida (OLE) (Cravatt *et al.* 1995), el éter del 2-araquidonil-glicerol (Noladin-éter) (Hanus *et al.* 2001), el O-araquidoniletanolamina (Virodamina) (Porter *et al.* 2002) y la N-araquidonil-dopamina (NADA) (Bisogno *et al.* 2005). Todas estas moléculas se encuentran en el SNC, en el plasma y en los tejidos periféricos. Las propiedades farmacológicas de estos compuestos son muy similares a la de los canabinoides sintéticos y fitocannabinoides (Bisogno *et al.* 2005). Tal como se muestra en la Fig. 11.



**Fig. 11: Estructura química de los principales endocannabinoides.** Tomada y modificada de (Cravatt *et al.* 1995; De *et al.* 2009; De and Di, V, 2009)

La anandamida y el 2-araquidonilglicerol, son los dos eCBs mejor caracterizados, tienen una estructura química muy diferente a la del  $\Delta^9$ -THC y carecen de sus propiedades psicotrópicas (Patricelli and Cravatt, 2000; Pertwee and Ross, 2002).

### 1.2.1.3 Canabinoides sintéticos

Constituye un grupo de sustancias que están relacionadas estructuralmente al TCH y que se acoplan a los receptores a cannabinoides. Estos son derivados de las sucesivas modificaciones de la estructura de los cannabinoides, evitando así los efectos psicotrópicos. Por ejemplo; en relación con los efectos analgésicos de los cannabinoides se diseñaron análogos sintéticos como el levonantradol (Stuart-Harris *et al.* 1983) y el CP 55,940 (Qureshi *et al.* 1998). Otros

canabinoides sintéticos con propiedades terapéuticas son, la nabilona y el naboctate (Saxena, 2009). El primero, posee un efecto antiemético mientras que para el segundo se han descrito efectos sobre la presión intraocular. El 11-hidroxi-  $\Delta^8$ -THC-DMH (HU-210) es el canabinoide sintético más potente de los actualmente conocidos. Su potencia es de 100 a 800 veces mayor que la del THC y parece poseer efectos importantes en el control de glaucoma (Tomida *et al.* 2006).

#### 1.2.1.4 Biosíntesis, difusión y eliminación

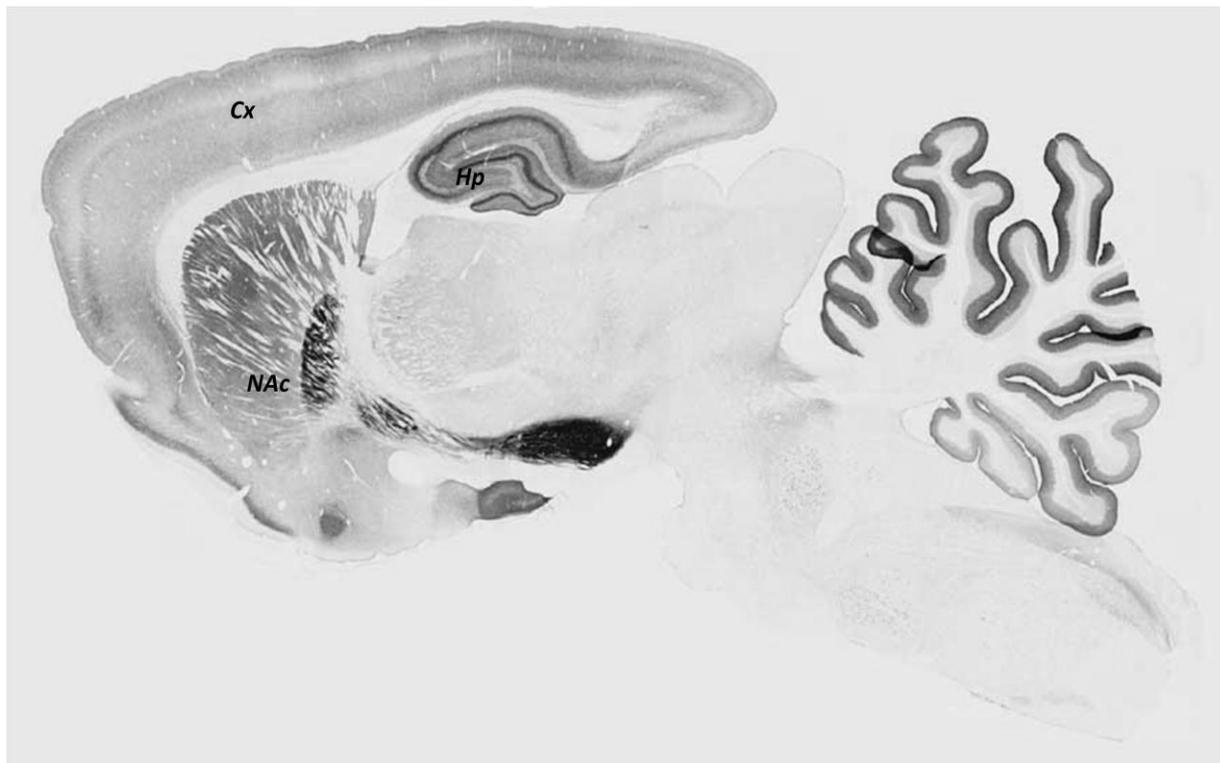
Los eCBs se sintetizan en la mayoría de células pero no son almacenados como lo hacen la mayoría de neuromoduladores sino que son generadas a partir de sus precursores lipídicos de la membrana y liberados “a demanda” (solo cuando es necesario) (Kim *et al.* 2002; Varma *et al.* 2001). Además, son considerados mensajeros retrógrados, es decir, se sintetizan en la postsinápsis y ejercen su acción en la presinápsis (Maejima *et al.* 2001). Dependiendo del circuito neuronal, los eCBs pueden activar o inhibir la neurotransmisión (Wilson and Nicoll, 2002). Estos compuestos pueden difundir a través de las membranas celulares ya que son lipofílicos. Para que su difusión sea rápida, selectiva y regulada, necesita de un mecanismo que sea capaz de reducir rápidamente su concentración intracelular (Bisogno *et al.* 2005). Por ejemplo, la ANA es capturada por un transportador de membrana (AMT). Su captura celular es saturable, termodependiente y sensible a inhibidores sintéticos (Di, V *et al.* 1994). Una vez ocurrida su liberación y difusión los eCBs son rápidamente desactivados mediante recaptación celular y metabolismo. La degradación de estos compuestos se realiza por dos sistemas enzimáticos específicos; por la hidrolasa de ácidos grasos amidados (FAAH) y la monoacilglicerol-lipasa (MAGL). La FAAH es la enzima que se ha identificado como la

responsable de la hidrólisis de ANA, OLE y en algunos casos del 2-AG, el ácido araquidónico y glicerol (Cravatt *et al.* 1996). La principal enzima responsable de la degradación del 2-AG es la MAGL, enzima perteneciente a la familia serina-hidrolasa (Dinh *et al.* 2002).

### 1.2.2 Receptores a Canabinoides (CB1 y CB2)

Desde los años 70 se sugería la existencia de un sitio de unión específico para canabinoides que sería el responsable de los efectos mediados por el THC, principal agente psicoactivo de la marihuana y el hachís. Inicialmente se sugirió que el THC y demás agonistas canabinoides ejercían sus acciones debido a una interacción directa con la membrana celular, como se describió para el caso de los anestésicos generales (Paton and Pertwee, 1972), gracias a su naturaleza altamente lipofílica (Hillard *et al.* 1985). Sin embargo, ahora se reconoce que el efecto es debido a una interacción con receptores altamente específicos a estas sustancias. A la fecha se han identificado dos tipos de receptores canabinoides, los CB1 y los CB2. Estos receptores son proteínas de siete dominios transmembranales y pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (receptores metabotrópicos). El CB2 presenta una homología del 44% con el CB1 y el 68% de identidad en sus dominios transmembranales (Bisogno *et al.* 2005).

En el año 1988 se caracterizó el primer receptor CB1. Es el receptor más abundante en el cerebro de los mamíferos, se localiza principalmente en las terminales de las neuronas del cerebro, pero principalmente en el cerebelo el hipocampo, el núcleo estriado, el globo pálido y la sustancia negra (Fig. 12) (Martinez-Vargas *et al.* 2003); aunque también está presente en concentraciones menores en tejidos periféricos (Devane *et al.* 1988; Howlett *et al.* 1990).



**Fig.12: Distribución de los receptores CB1 en el cerebro de rata.** Las zonas más oscuras indican mayor cantidad del receptor CB1. (Martinez-Vargas M. et al. 2003).

El CB2 se encontró en órganos linfoides y en células microgliales (Piomelli, 2003), también en células no parenquimáticas del hígado cirrótico, en el páncreas endocrino, en el hueso (Pacher *et al.* 2006), en el cerebelo y el tallo cerebral (Van Sickle *et al.* 2005). Los eCBs; también muestran afinidad por los receptores vaniloides, presentes en las fibras C que están especializadas en conducir el dolor (Bisogno *et al.* 2005).

#### *1.2.2.1 Mecanismos de transducción de los cannabinoides*

Se han planteado varios mecanismos de transducción para los cannabinoides;

1.- A través de su acoplamiento a la membrana que activa a una proteína G da lugar a una inhibición de la adenilato ciclasa, lo que impide la conversión del ATP a AMP cíclico y por consiguiente se altera la biofísica de la membrana. Parece ser que los cannabinoides también pueden mediar su señal a través de proteínas Gs (Bonhaus *et al.* 1998; Childers and Deadwyler, 1996).

2.- Activación de canales iónicos, el receptor CB1 no así el CB2 puede activar o inhibir canales iónicos, particularmente de  $\text{Ca}^{++}$  y de  $\text{K}^+$ . La inhibición de los canales de  $\text{Ca}^{++}$  pre sinápticos modularía la liberación del neurotransmisor de la terminal sináptica (Schlicker and Kathmann, 2001). Los canales de  $\text{K}^+$  aumenta su conductancia como respuesta a los cannabinoides, respuesta mediada por proteínas G sobre los canales de  $\text{K}^+$  tipo A. (Mackie *et al.* 1995; Schweitzer, 2000).

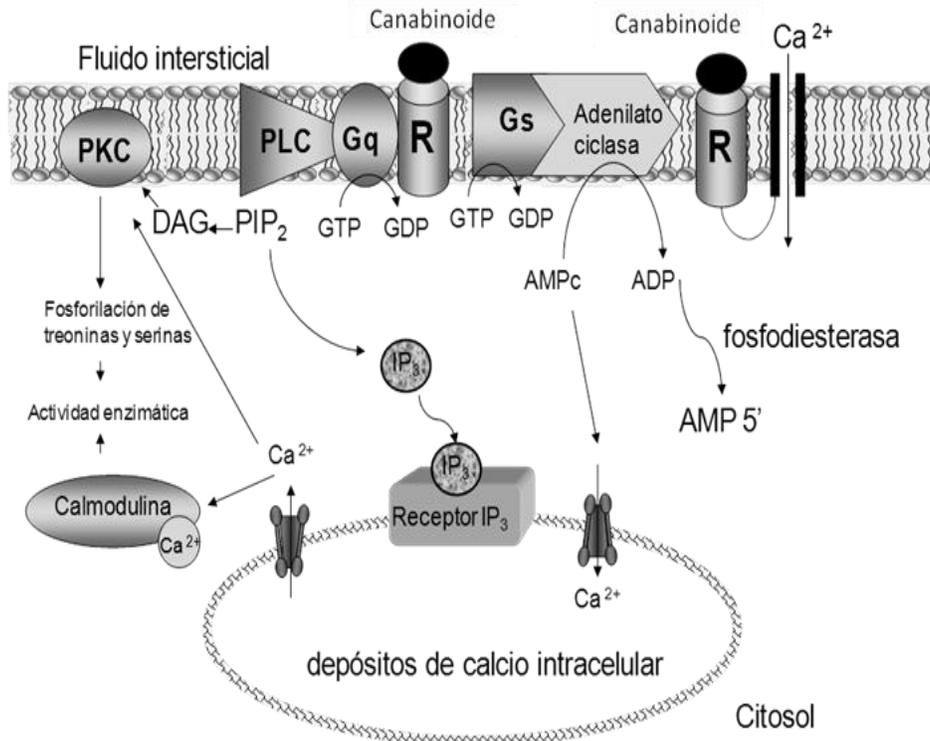
3.- El SeC puede movilizar ácido araquidónico, a través de proteínas G o bien a través de la fosfolipasa A2 o de la fosfolipasa D. Este ácido desencadenaría toda una cascada de reacciones como la formación de tromboxanos, prostaglandina E2, activación de enzimas, canales iónicos, receptores, etc. (Burstein *et al.* 1994).

4.- Tanto el receptor CB1 como el CB2 pueden actuar sobre diferentes tipos de kinasas activadas por mitógenos (MAPK, tipos p38/42/44), presumiblemente a través de las subunidades  $\beta\gamma$  de la proteína G (Hagemann and Blank, 2001). El receptor CB puede activar también la vía de las kinasas PKB/Akt. Se ha descrito que estas vías de transducción ejercerían un control sobre el crecimiento, la supervivencia y la transformación maligna de las células (Gomez del *et al.* 2000).

5.- Independientemente de las proteínas G, el CB puede también acoplarse a una esfingomielinasa, esta enzima rompería la esfingomielina formando ceramida lo que pudiera resultar en el incremento en la síntesis de ciclooxigenasa (COX-2) a través de la acción canabinoide (Guzman *et al.* 2001).

6.- Los cannabinoides también pueden aumentar la expresión óxido nítrico (ON) a través de la activación de la óxido nítrico sintasa constitutiva (cNOS). El ON formado podría actuar como neurotransmisor retrógrado, produciendo relajación de la musculatura lisa de los vasos sanguíneos, en la plasticidad sináptica o en la morfogénesis neuronal. También se ha visto que los cannabinoides pueden atenuar la inducción de iNOS (subtipo inducible de la NOS) ejercida por estímulos inflamatorios, lo que podría atribuir un papel antiinflamatorio a estas sustancias. A este respecto se ha demostrado que la anandamida inhibe la producción de ON inducido por citoquinas (Fimiani *et al.* 1999; Stefano, 2000).

Finalmente, todas las vías descritas anteriormente pueden tener como resultado terminal la modulación de diferentes factores de transcripción y por lo tanto, la expresión/inhibición de determinados genes. Se sabe que los agonistas cannabinoides en su unión a los receptores CB1 y CB2 pueden controlar la expresión de algunos genes como Krox-24, Krox-20 y Jun-B por una vía independiente de AC quizá mediada por fosforilación de la ruta de las MAPK. Otros factores de transcripción que pueden ser modulados por la acción de las kinasas son: CREB /ATF, Fos y NFκB (Kaminski, 1998).



**Fig. 13: Mecanismos de transducción.** Se esquematizan dos de los mecanismos que utilizan los endocannabinoides para modular las respuestas de sus células blanco. Si la proteína G es inhibidora (Gi) entonces habrá una inhibición en la formación del AMPc. Los canales de calcio también podrían ser de K<sup>+</sup>. Figura adoptada con permiso de los autores (Prieto-Gómez, et al, 2005).

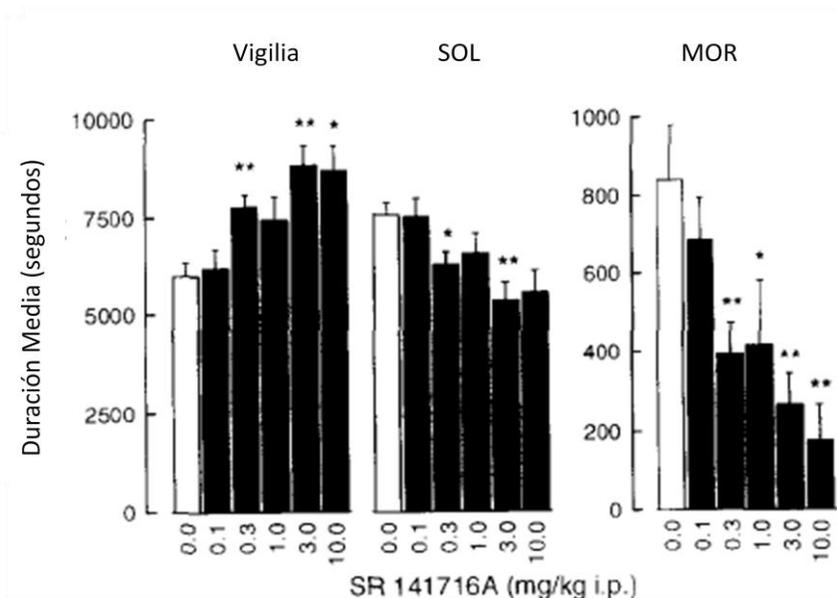
### 1.2.3 Funciones del sistema canabinoide

El SeC desempeña un papel modulador en diferentes procesos fisiológicos, principalmente en el cerebro (Di, V *et al.* 1998; Fernandez-Ruiz *et al.* 2000; Fernandez-Ruiz *et al.* 2002; Parolaro, 1999; Piomelli *et al.* 2000), en el sistema inmune (Parolaro, 1999) y el cardiovascular (Hillard, 2000). Aun cuando existen controversias, se estima que los eCBs también modulan el metabolismo energético y el sistema endocrino (Wenger *et al.* 1999). En el cerebro, los eCBs participan en la regulación de la actividad motora (Fernandez-Ruiz *et al.* 2002; Romero *et al.* 2002), en el aprendizaje y la memoria (Hampson and Deadwyler, 1999), en

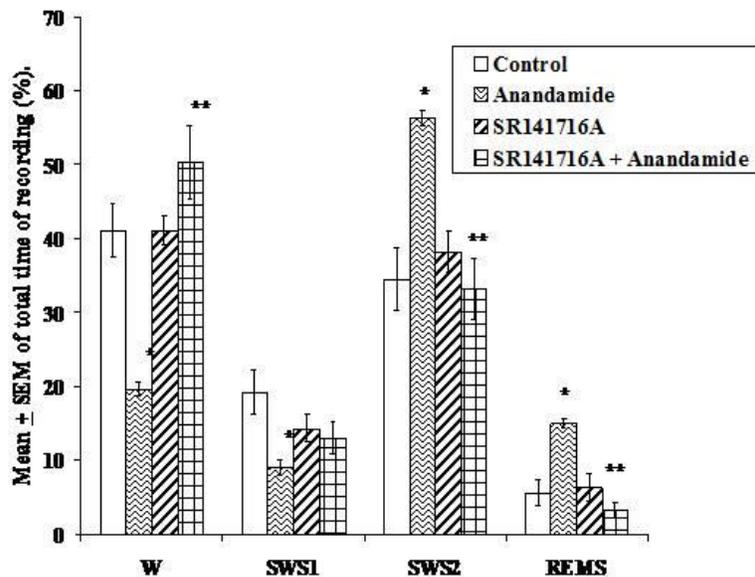
la nocicepción (Walker *et al.* 1999), así como desempeñan un papel notable durante el desarrollo cerebral (Fernandez-Ruiz *et al.* 2000) y en el ciclo sueño-vigilia (Cravatt *et al.* 1995; Murillo-rodriguez *et al.* 2001; Santucci *et al.* 1996).

### 1.2.3.1 Sueño y endocannabinoides

Algunos estudios muestran que la marihuana y el THC afectan los patrones del sueño tanto en humanos como en animales (Pacher *et al.* 2006). Por ejemplo; Santucci *et al.* (1996) mostraron que el bloqueo del CB1 con antagonistas cannabinoides (SR141716A) incrementa la vigilia a expensas de SOL y MOR (Santucci *et al.* 1996) (Fig. 14), mientras que la ANA, agonista del sistema canabinoide, incrementa el sueño MOR en ratas (Murillo-rodriguez *et al.* 2001) (Fig. 15). Este efecto puede ser bloqueado por la administración previa de antagonistas cannabinoides (Murillo-rodriguez *et al.* 2003).



**Fig.14: Efecto de la administración sistémica (IP) del SR141716A (antagonista canabinoide) sobre el ciclo-sueño vigilia.** Se observa que la administración del SR141716A aumenta la Vigilia con las dosis de .3, 3 y 10 mg/kg. Mientras que las dosis de .3, 1, 3 y 10 mg/kg disminuyen tanto el SOL como el sueño MOR. Tomada de Santucci, *et al.*, 1996.



**Fig. 15: Efecto de la administración intraventricular (IV) de ANA y SR141716A (antagonista canabinoide) sobre el ciclo-sueño vigilia.** Se observa que la ANA aumenta el SOL2 y el sueño MOR mientras que disminuye la Vigilia y el SOL1. Así, la administración del SR141716A tiene el efecto contrario. Tomada y modificada de Murillo-Rodríguez , et al., 2003.

### 1.2.3.2 Oleamida

La oleamida (OLE) fue identificada por primera vez por el grupo de Lerner en 1995 en el líquido cefalorraquídeo de gatos privados de sueño (Cravatt *et al.* 1995). Este eCB, tiene la capacidad de asociarse a receptores serotoninérgicos (5HT1, 5HT2A,C y 5HT7) y puede modular a los receptores ionotrópicos inhibidores como GABAA (Mendelson and Basile, 2001).

La OLE es considerada principalmente como un eCB puesto que se une y activa al CB1 (Leggett *et al.* 2004) logrando producir analgesia, hip locomoción, decremento en la temperatura corporal e induce sueño (Martinez-Gonzalez *et al.* 2004). Este eCB también es degradada por la hidrolasa de los ácidos grasos amidados (Cravatt and Lichtman, 2002).

Se describió que la OLE tiene efectos en la conducta; aprendizaje y memoria, dolor (Akanmu *et al.* 2007; Martinez-Gonzalez *et al.* 2004; Murillo-rodriguez *et al.* 2001; Varvel *et al.* 2007) y sueño (Basile *et al.* 1999; Cravatt *et al.* 1995; Mendelson and Basile, 1999)

Respecto al sueño, se mostró que la administración sistémica (IP) de OLE en ratas, incrementa la somnolencia y el tiempo total de sueño (Cravatt and Lichtman, 2002) este efecto se puede bloquear con un antagonista del CB1 (SR141716) (Mendelson and Basile, 1999).

**Tabla 1. Efecto de la IP de OLE sobre el ciclo sueño- vigilia.** Se muestra un aumento significativo en el tiempo total de sueño tras la administración de 10 mg/kg de OLE. Se muestra que dicha diferencia es específica para el SOL. Tomada y modificada de Mendelson, et al.

Parámetro	Tratamiento	Valor (min)	p <
Latencia para sueño	Vehículo	17.3 ± 2.1	.01
	OLE (10 mg/kg)	6.6 ± 1.2	
Tiempo total de sueño (min)	Vehículo	64.0 ± 4.1	.01
	OLE (10 mg/kg)	82.6 ± 3.9	
Tiempo en MOR (min)	Vehículo	3.9 ± 1.4	No significativo
	OLE (10 mg/kg)	3.6 ± 1.6	
Tiempo en SOL (min)	Vehículo	60.2 ± 3.7	.01
	OLE (10 mg/kg)	78.7 ± 4.2	
Despertar después del primer episodio de sueño	Vehículo	35.9 ± 2.4	No significativo
	OLE (10 mg/kg)	31.0 ± 3.4	
Latencia para sueño MOR	Vehículo	64.7 ± 9.2	No significativo
	OLE (10 mg/kg)	66.7 ± 18.8	

Se sugiere entonces que las alteraciones de sueño provocadas por el estrés, son mediadas en parte por la alteración del SeC; aunque aún se desconoce si este sistema está involucrado en

las alteraciones de sueño que presentan los individuos que padecieron privación de cuidados maternos en las primeras etapas de vida.

En estas circunstancias y debido al papel tan importante que los eCBs ejercen sobre el ciclo sueño-vigilia, resulta muy interesante analizar la participación de este sistema de neuromoduladores sobre los cambios inducidos por la PCM sobre dicho ciclo. El cumplir con este objetivo, nos proveerá de un marco de referencia más significativo que explicaría el efecto del estrés temprano sobre las alteraciones neurofisiológico que presentan los animales sometidos al estrés en etapas tempranas de su vida.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En resumen, la PCM es un modelo que al provocar un estrés significativo durante las primeras etapas de la vida, induce alteraciones importantes en la neurofisiología y conducta del individuo. Aún cuando se desconocen con exactitud los mecanismos que ocasionan dichas alteraciones, es muy posible que los factores subyacentes a estas alteraciones, sean cambios significativos en los sistemas de neurotransmisores y neuromoduladores cerebrales. Aunque han sido varios los sistemas cerebrales analizados en este modelo, aún se desconoce la participación del SeC sobre las alteraciones en el ciclo sueño-vigilia que provoca este modelo experimental. Por lo tanto, resulta interesante investigar de qué manera la manipulación del SeC modifica las alteraciones que se presentan en el ciclo sueño-vigilia en este modelo experimental. A su vez, esto nos permitirá definir los cambios que la PCM, es decir del estrés en las primeras etapas de vida, provoca sobre el SeC.

### **2.1 Pregunta de investigación**

¿La PCM a edad temprana en la rata ocasiona alteraciones de largo plazo en el sueño?;  
¿Estas alteraciones pueden ser modificadas por la activación del SeC?, Además ¿En el SeC se muestran modificaciones inducidas por la PCM?

## 2.2 Justificación

Se ha descrito que algunos procesos adversos presentes en las etapas tempranas en la vida de un individuo, como el maltrato, la pérdida de los padres, un padre depresivo o adicto, los conflictos familiares y la violencia entre otros, son factores de riesgo para diversas enfermedades (Bremne and Vermetten, 2001b; Heim and Nemeroff, 2001; Shea *et al.* 2005; Teicher *et al.* 2006). En los modelos animales de PCM, como el que se utilizó en este estudio, se muestran efectos crónicos en la neurobiología, fisiología y conducta en los animales adultos, teniendo así similitudes muy particulares con enfermedades relacionadas con el estrés en humanos (Pryce *et al.* 2005). También se ha documentado que la respuesta al estrés y el desempeño cognitivo parecieran estar programados por diferentes niveles de cuidado maternal (Liu *et al.* 1997). Esto sugiere la importancia del cuidado maternal durante la infancia y muestra que el cuidado maternal influye en el desarrollo normal del individuo. Los resultados de múltiples estudios, también muestran que el estrés tiene un impacto directo en el ciclo sueño-vigilia (Pawlyk *et al.* 2008) y que los eCBs juegan una función importante en dicho ciclo. Sin embargo, aún no son claros los mecanismos empleados por este tipo de estrés, para provocar los cambios en el patrón de sueño, ni el papel que juegan los mecanismos del SeC en la génesis de esta alteración.

## **2.3 Objetivos**

### *2.3.1 Objetivo general*

Determinar los cambios en el ciclo sueño-vigila inducidos por la PCM y describir si la activación y/o inhibición del SeC interfiere sobre dichas alteraciones. Además, determinar si este procedimiento experimental provoca cambios en el SeC de ciertas estructuras cerebrales.

### *2.3.2 Objetivos particulares*

- 1.-** Determinar el patrón de sueño en ratas en edad adulta sometidas a PCM.
- 2.-** Determinar si la administración IP de OLE, agonista canabinoide, o de AM-251, antagonista canabinoide, modifican los patrones de sueño mostrados por las ratas controles en edad adulta.
- 3.-** Determinar si la administración IP de OLE o de AM-251, modifica los patrones de sueño mostrados por las ratas en edad adulta crecidas con PCM.
- 4.-** Determinar si la administración IP de OLE y del AM-251, en conjunto, evita la modificación de los patrones de sueño mostrados por las ratas controles en edad adulta
- 5.-** Determinar si la administración IP de OLE y del AM-251, en conjunto, evita la modificación de los patrones de sueño mostrados por las ratas en edad adulta sometidas a PCM.
- 6.-** Determinar cómo se encuentran la concentración de receptores CB1 en la Corteza CPF, en el NAc y en el HIP en las ratas con PCM en comparación con las ratas controles. troles en edad adulta.

## 2.4 Hipótesis

*Los antecedentes del presente estudio sustentan las presentes hipótesis: Los cambios en el sistema canabinoide subyacen a las alteraciones del ciclo sueño-vigilia de ratas sometidas a la privación de cuidado maternal.*

**Hipótesis 1:** La PCM en ratas en edad temprana provoca alteraciones en el ciclo sueño-vigilia.

**Hipótesis 2:** La OLE, agonista canabinoide, y el AM-251, antagonista canabinoide, modifican los patrones de sueño mostrados por las ratas controles en edad adulta.

**Hipótesis 3:** La OLE, agonista canabinoide, y el AM-251, antagonista canabinoide, modifica los patrones de sueño mostrados en las ratas en edad adulta crecidas con PCM.

**Hipótesis 4:** El AM251 previene los efectos de OLE sobre los patrones de sueño mostrados por las ratas controles edad adulta.

**Hipótesis 5:** El AM251 previene los efectos de OLE sobre los patrones de sueño mostrados por las ratas en edad adulta crecidas con PCM.

**Hipótesis 6:** El SeC se ve alterado en la CPF, en el NAc y en el HIP en las ratas en edad adulta con PCM en comparación a las ratas controles en edad adulta.

### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Sujetos

Se utilizaron 95 ratas macho de la cepa Wistar pesando entre 250 y 350 g al inicio de la cirugía y de la obtención de muestras para la técnica analítica de Western Blot (WB), sin embargo, todas las ratas fueron parte del experimento desde su día de nacimiento. Todos los animales fueron colocados en cajas jumbo de policarbonato después de haber sido destetadas y en cajas individuales de policarbonato después de la cirugía. Se mantuvieron en un bioterio de laboratorio y mantenidas en condiciones estándar; ciclo luz/oscuridad de 12 hrs (luces encendidas a las 8:00 hrs, luces apagadas a las 20:00 hrs), temperatura constante ( $23\pm 1^\circ\text{C}$ ) y humedad relativa de 52%. A excepción del tiempo que pasaron las ratas separadas de su madre (durante la PCM los primeros 15 días de vida) y el tiempo de cirugías, todos los animales tuvieron libre acceso a alimento (*Laboratory Rat Chow*) y agua potable.

Todos los individuos fueron manipulados bajo los criterios del Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

##### 3.1.1 Nacimiento y manejo de la Cría

Se obtuvieron ratas preñadas del bioterio de la Facultad de Medicina. Se colocaron en un nuevo bioterio aproximadamente 3 días antes de parir. Las ratas preñadas se colocaron en cajas individuales en el bioterio con las condiciones estándar previamente mencionadas. Comida y agua se les proporcionó *ad libitum*. Se emplearon todas las crías machos desde el día de nacimiento, día postnatal 0 (DPN 0), hasta los 3 y medio meses de edad aproximadamente.

Todos los machos se mantuvieron con su madre, siendo divididos en 2 grupos, grupo control y grupo experimental. El grupo experimental se separó de la madre por 3 horas diarias durante 15 días (11:00 am-2:00 pm). Todos los machos del grupo experimental se mantuvieron juntos en contenedores pequeños dentro del bioterio para mantener una temperatura constante. Las crías se destetaron de la madre en el DPN 21 y se mantuvieron en cajas jumbo hasta los 2 meses o hasta que alcanzaron los 250 g de peso corporal. Posteriormente se sometieron a cirugía y de ahí en adelante se mantuvieron en cajas individuales. Todos los animales del experimento se mantuvieron en el bioterio con las condiciones antes descritas. Comida y agua se les proporciono *ad libitum*.

## **3.2 Fármacos**

### 3.2.1 Fármacos para cirugía

- Solución salina (0.9%): solución que contiene Cloruro de sodio.
- Ketamina: Droga disociativa con potencial alucinógeno, derivada de la fenciclidina, utilizada originalmente en medicina por sus propiedades analgésicas y sobre todo, anestésicas. Se clasifica como un antagonista del receptor NMDA. Se utiliza principalmente para la inducción y mantenimiento de la anestesia general, usualmente en combinación con un sedante.
- Maleato de Acepromacina: Se utiliza con frecuencia en los animales como sedante y antiemético . Su valor principal está en tranquilizar y calmar a los animales inquietos.

- Hidrocloruro de Xilacina: Potente sedante, miorrelajante y analgésico no narcótico. La actividad sedante y analgésica se relaciona con una depresión del sistema nervioso central. El efecto relajante muscular está basado en la inhibición de la transmisión intraneural de los impulsos en el sistema nervioso central.

### 3.2.2 Fármacos para experimento del registro electroencefalográfico

- Dimetilsulfóxido (DMSO) al 100% (*Sigma-Aldrich Química, S.A. de C.V.*). Es un líquido orgánico sin color que contiene sulfuro, usado como disolvente orgánico industrial a partir de 1940, como criopreservante a partir de 1961 y como un medicamento (reduce el dolor y la inflamación).
- Oleamida (OLE) (*Tocris Bioscience, Ellisville Missouri, USA*). Lípido endógeno que posee diversos efectos biológicos como la inducción del sueño y la supresión inmunológica. Agonista de los receptores CB1. Es también un potenciador de la actividad serotoninérgica por la activación directa en los receptores 5HT-2A y 5HT-2C.
- AM-251 (*Tocris Bioscience, Ellisville Missouri, USA*). Antagonista inverso de los receptores canabinoides CB1.

### 3.2.3 Fármacos para Western Blot

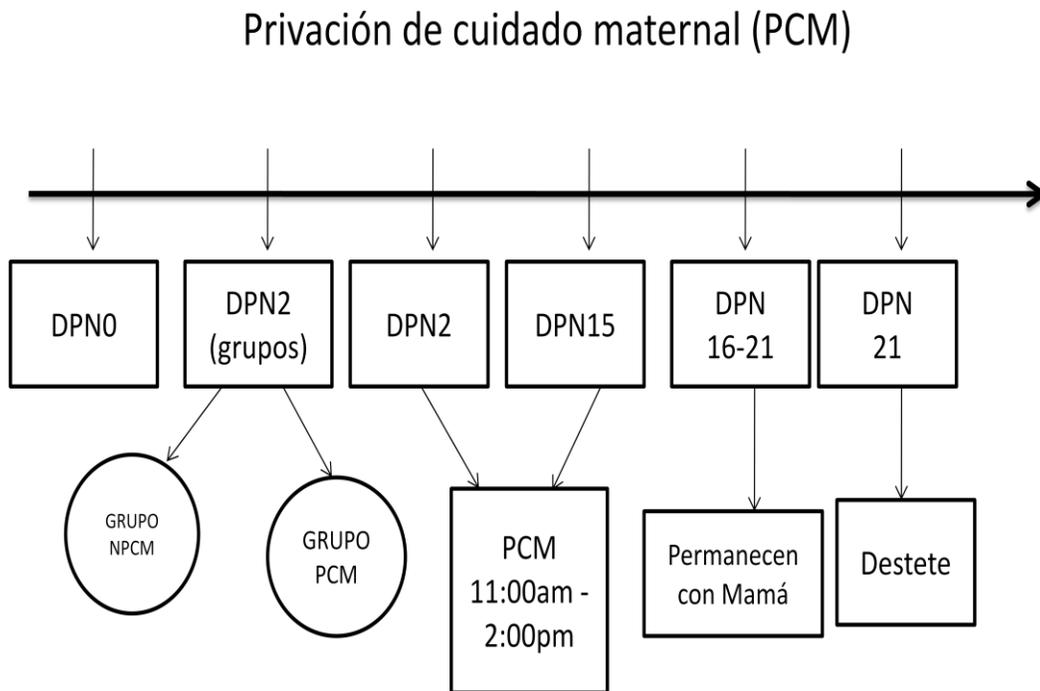
- Sucrosa
- 1mM EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). (*Bio-Rad, Hercules, CA*).

- Buffer Tris•HCl [pH 7.6], (tris(hidroximetil)aminometano). Se utiliza en particular para preparar disoluciones tampón (que mantienen un equilibrio ácido-base) por lo tanto, mantiene estable el pH.
- 10mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo, PMSF por sus siglas en inglés). (*Bio-Rad, Hercules, CA*). Es un inhibidor de proteasas de serina que preserva a las proteínas celulares de su digestión por proteasas.
- Coctel inhibidor completo de proteasa mini [1 tableta/ 50 ml]. (*Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland*).
- Ensayo a proteína Bio-Rad DC (*Bio-Rad, Hercules, CA*).
- Glicina (ácido aminoacético); es utilizado como fuente de iones de arrastre.
- Acrilamida (*Bio-Rad, Hercules, CA*). en presencia de un sistema generador de radicales libres, los monómeros de acrilamida se activan para formar polímeros de cadena larga.
- Bisacrilamida (*Bio-Rad, Hercules, CA*). polimeriza conjuntamente con la acrilamida pero establece puentes entre las cadenas lineales de poliacrilamida, y así evita el deslizamiento de éstas y conduce a la formación del gel.
- Dodecilsulfato sódico (SDS). (*Bio-Rad, Hercules, CA*). Desnaturaliza proteínas en sus polipéptidos individuales.
- Persulfato amónico (APS). (*Bio-Rad, Hercules, CA*). Iniciador de la reacción de polimerización que finalmente forma el gel.
- TEMED, acrónimo de (N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina). (*Bio-Rad, Hercules, CA*). Se trata de otro iniciador (propagador) de la polimerización para la formación del gel.

- Marcador de peso molecular (*Bio-Rad, Hercules, CA*). (Marcadores preteñidos Precision Plus Protein™ Standards)
- Buffer de Leam (*Bio-Rad, Hercules, CA*).
- 2-Mercaptoethanol (*Bio-Rad, Hercules, CA*). Algunas proteínas pueden ser desnaturalizadas por 2-mercaptoetanol por medio de su habilidad para separar puentes disulfuro.
- DDT (*Bio-Rad, Hercules, CA*).
- Buffer TBS-T. (Buffer Tris Salino con Tween-20).
- Tween 20 (*Sigma-Aldrich Química, S.A. de C.V.*).
- Metanol (*Sigma-Aldrich Química, S.A. de C.V.*).
- Buffer de Towbin.
- Blotting Grade Blocker (Non-fat Dry Milk) (*Bio-Rad, Hercules, CA*).
- Anticuerpo primario; de conejo para anti CB1 (1:500, Cayman)
- Anticuerpo secundario; de burro anticonejo IgG acoplado a peroxidasa de rábano (1:10,000; *Santa Cruz Biotechnology*).
- Agentes de detección (*Amersham Biosciences*).
- Revelador (*Kodak*).
- Fijador (*Kodak*).
- Anticuerpo primario: Actina (1-19) R (*Santa Cruz Biotechnology*).
- Anticuerpo secundario: de burro anticonejo IgG acoplado a peroxidasa de rábano (*Santa Cruz Biotechnology*).

### 3.2 Privación de cuidado maternal (PCM)

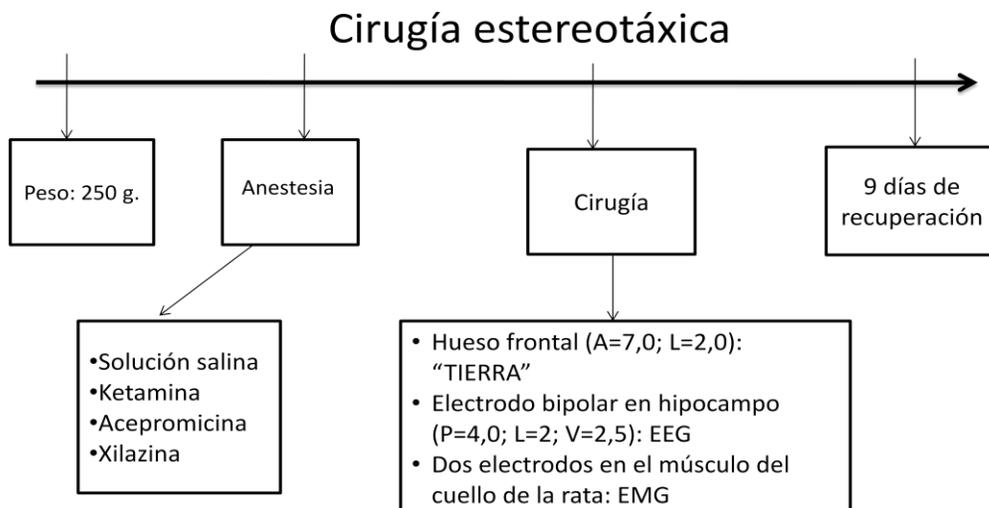
La PMC se realizó desde el DPN2 hasta el DPN15. Del DPN0 al DPN2 todas las crías se mantuvieron con la mamá. En el DPN2 los machos se separaron en 2 grupos, el grupo control y el experimental. A partir del DPN2 y hasta el DPN15 los machos del grupo experimental fueron separados de la madre durante 3 hrs diarias (11:00 am-2:00 pm) y los machos del grupo control permanecieron con la madre. Todos los machos del grupo experimental se mantuvieron juntos en contenedores pequeños dentro del bioterio para mantener una temperatura constante. A partir del DPN16 y hasta el DPN21 todas las crías permanecieron con la madre. En el DPN21 se destetaron, separándolos de la madre permanentemente en una caja jumbo hasta que pesaron 250g y entonces, fueron colocados en cajas individuales después de someterlos a la cirugía estereotáxica para la implantación de electrodos para EEG.



**Fig. 16: Método esquematizado para el modelo de privación de cuidado maternal (PCM).** DPN= Día postnatal. PCM = privación de cuidado maternal.

### 3.3 Cirugía esterotáxica

Una vez que las ratas alcanzaron los 250 g de peso, tanto el grupo experimental como el grupo control, fueron sometidos a una cirugía estereotáxica estándar para registro de EEG. Bajo la administración IP de .8 ml  $\pm$  .2 de anestesia (mezcla de; solución salina 60%, Ketamina (66mg/kg) 25%, Maleato de Acepromicina (1.3 mg/kg) 10% e Hidrocloruro de Xilazina (.26 mg/kg) 5%), los sujetos fueron sometidos a una cirugía estereotáxica para la implantación a profundidad de un electrodo bipolar de acero inoxidable dirigido al HIP derecho (P=4,0; L=2; V=2,5) (Paxinos *et al.* 1980) para su registro EEG. Además, dos tornillos de acero inoxidable y dos electrodos de acero inoxidable unidos a ellos fueron colocados en el hueso frontal del cráneo. Estos fueron utilizados como “tierra”. Dos electrodos de acero inoxidable más fueron implantados en la nuca del animal para registrar el electromiograma (EMG). Todos los electrodos fueron implantados y fijados en el cráneo del animal con acrílico dental. Después de la cirugía se permitió a los animales recuperarse por 9 días antes de someterlos al registro EEG.



**Fig. 17: Método esquematizado de la cirugía para los registros EEG.**

### 3.4 Registros Electroencefalográficos (EEG)

Para observar los cambios en el ciclo sueño-vigilia de los animales con PMC y sin PMC, así como la modificación en dicho ciclo por los fármacos utilizados, los animales fueron sometidos a 24 horas de registro en cámaras especiales de polisomnografía. Los registros se realizaron en una habitación sonoamortiguada, con cámara de registro individuales. La señal se registró a través de un polígrafo GRASS MODELO 7, que manda la señal a una computadora y la almacena en el software ICELUS. Inicialmente, los animales se sometieron a 24 horas de habituación dentro de las cámaras de registro. Posteriormente, se administró a las ratas con el fármaco correspondiente al grupo al que pertenecían e inmediatamente después de la administración IP se inició el registro por 24 horas.

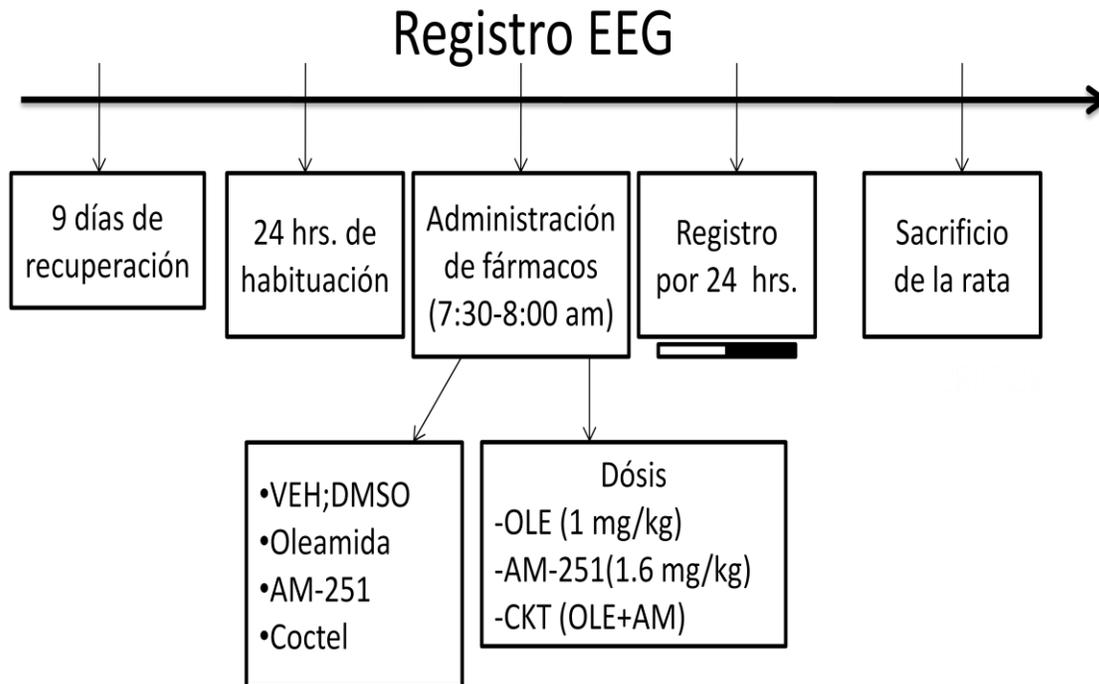


Fig. 18: Método esquematizado del registro electroencefalográfico.

La ventana de filtros para el registro de EEG fue de 1HZ y 30 HZ para bajas y altas frecuencias, respectivamente; mientras que para EMG fueron de 30 y 100 HZ, también para bajas y altas frecuencias. Los registros completos se calificaron visualmente en épocas de 10 segundos. Para calificar la totalidad de los registros se tomaron en cuenta 3 estados: A) Vigilia (actividad rápida del EEG y mucha actividad de EMG), B) SOL (actividad lenta de gran amplitud de EEG y poca actividad del EMG), Y C) sueño MOR (actividad rápida EEG y nula actividad del EMG).

Por otra parte también se consideró la arquitectura “fina” del ciclo sueño-vigilia. Se consideraron estos parámetros:

- Latencia a SOL (tiempo que la rata tardó en caer en SOL desde el comienzo del registro).
- Latencia a MOR (tiempo que la rata tardó en caer en MOR desde el comienzo del registro).
- Transiciones (el número de cambios entre estados [vigilia, SOL, MOR] durante las 24 hrs, dividido en 12 hrs; fase de luz y de oscuridad).
- Número de episodios para cada estado (el número total de eventos que la rata tuvo en cada estado).
- Duración promedio del episodio (el tiempo promedio que duró la rata en algún estado [vigilia, SOL, MOR])

### 3.4.1 Grupos para el registro EEG

Se hicieron 8 grupos en función del tratamiento farmacológico. Estos grupos fueron sometidos a uno de las dos condiciones posibles; PCM y sin PCM y a uno de cuatro tratamientos posibles; VEH (DMSO), OLE (Oleamida), AM-251 (antagonista de receptores CB1) y coctel (CKT, una aplicación con ambos fármacos). En la siguiente tabla (Tabla. 2) se muestra la descripción de los grupos de acuerdo a las condiciones experimentales. En cada caso se señala el tamaño de la muestra.

**Tabla. 2: Grupos utilizados para el registro EEG.** Se muestra el número de ratas para cada grupo, la condición a la que pertenecen y el tratamiento administrado. PCM= Privación de cuidado maternal. NPCM= sin privación de cuidado maternal. VEH= vehículo. CKT=coctel.

GRUPO	# de sujetos	CONDICION	TRATAMIENTO
VEH- NPCM	9 ratas	PCM	Vehículo (DMSO)
VEH-PCM	9 ratas	NPCM	Vehículo (DMSO)
OLE-NPCM	10 ratas	PCM	Agonista CB1 (OLE)
OLE-PCM	10 ratas	NPCM	Agonista CB1 (OLE)
AM-NPCM	10 ratas	PCM	Antagonista CB1 (AM-251)
AM-PCM	9 ratas	NPCM	Antagonista CB1 (AM-251)
CKT-NPCM	9 ratas	PCM	Coctel (OLE + AM-251)
CKT-PCM	9 ratas	NPCM	Coctel (OLE + AM-251)

### 3.4.2 Dosis y administración de fármacos.

Las soluciones que se utilizaron fueron las siguientes:

- Vehículo; DMSO al 100 % en un volumen de 1 ml/kg
- OLE; 1 mg/kg disuelto en un volumen de 1 ml de DMSO

- AM-251; 1.6 mg/kg disuelto en un volumen de 1 ml de DMSO
- Coctel: OLE 1m/kg disuelto en un volumen de .5ml de DMSO + AM-251 1.6 mg/kg en un volumen de .5 ml de DMSO.

Se emplearon dichas dosis por antecedentes directos de trabajos realizados en nuestro laboratorio y fuera de él. Se determinó a través de curvas dosis respuestas que el mayor efecto se muestra en las dosis de OLE de 1mg/kg y de AM-251 de 1.6 mg/kg (Cravatt *et al.* 1995; Herrera-Solis *et al.* 2010).

Las administraciones se llevaron a cabo de manera IP entre 7:30 y 8:00 am. Se administró a la rata el fármaco correspondiente al grupo al que pertenecía e inmediatamente después de la administración se colocó en la cámara sonoamortiguada y se inició el registro de 24 horas comenzando éste en la fase de luz.

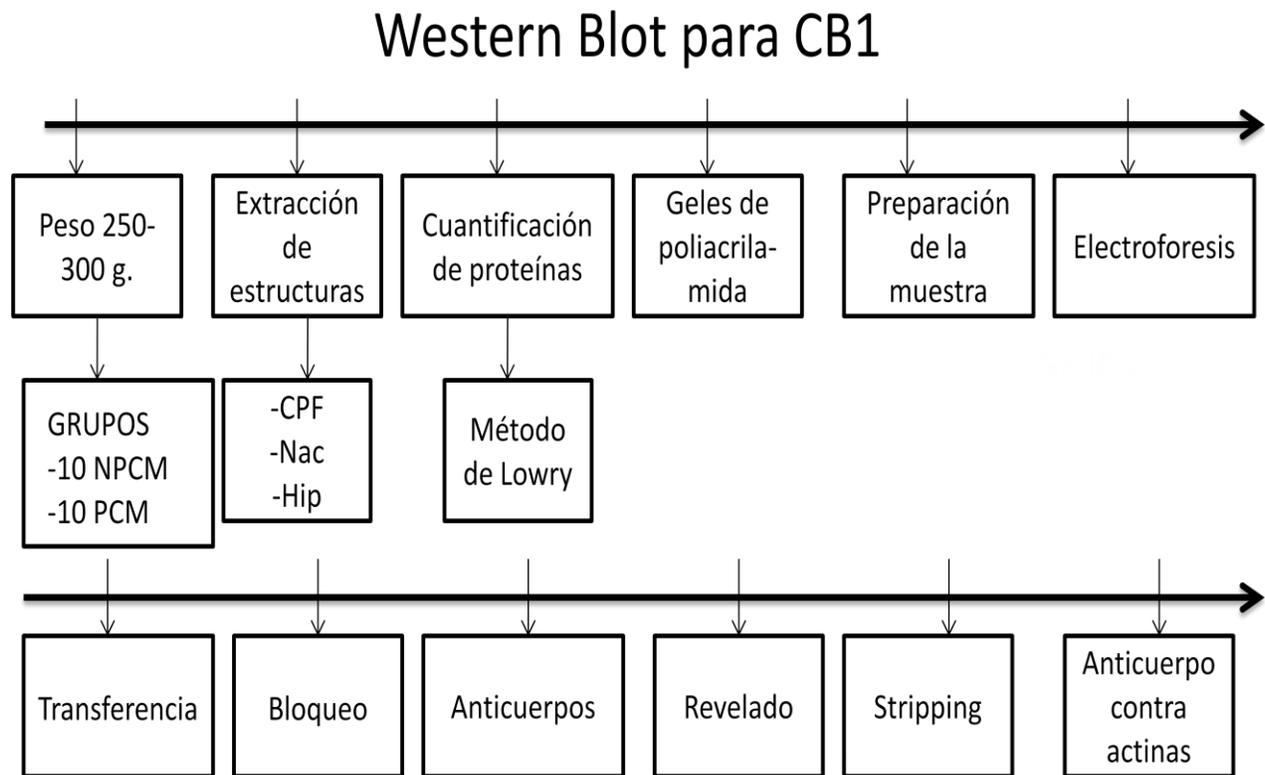
El registro se dividió en bloques de 12 horas, fase de luz y fase de obscuridad. De esta manera podríamos evaluar la actividad eléctrica de la rata en luz y obscuridad.

Al finalizar el registro, las ratas se sacaron de las cámaras de registro y se sacrificaron.

### 3.5 Western Blot (WB)

Para sustentar la idea de que el SeC tiene un papel fundamental en la reversión de las alteraciones de los patrones de sueño y de que éste mismo se encuentra modificado por el modelo de PCM, se optó por analizar muestras de tejido (CPF, NAc e HIP) obtenidas de ratas con PCM y sin PCM mediante una técnica de biología molecular llamada Western Blot (WB).

Para el WB se requirieron 10 ratas Wistar sometidas a PCM y otras 10 ratas Wistar sin PCM. Este experimento se llevo a cabo cuando las ratas llegaron a un peso de 250-300 g. El WB consta de varios pasos, para ver técnica detallada, ir a Anexo 1.



**Fig 19: Método esquematizado de la técnica de Western Blot.** NPCM= sin privación de cuidado maternal. PCM= con privación de cuidado maternal. CPF= corteza Prefrontal. NAc= Núcleo Accumbens. Hip= hipocampo.

### 3.6 Análisis estadísticos

#### 3.6.1 Datos de registros EEG

Para el análisis estadístico de los registros EEG se empleó un análisis de varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés) de una vía, y un análisis post hoc de Tukey. Si las muestras no pasaban las pruebas de homogeneidad de la varianza, entonces, se utilizó un análisis de varianza de rangos (ANOVA de rangos) y un análisis post-hoc de Games-Howel. Estas pruebas fueron realizadas con el equipo estadístico SIGMA PLOT versión 11 y SPSS versión 16.

Las comparaciones se realizaron de la siguiente manera: 1) El grupo VEH-NPCM se comparó contra el grupo VEH-PCM, 2) El Grupo VEH-NPCM se comparó contra los otros tres grupos que no fueron sometidos a la PCM; VEH-NPCM vs OLE-NPCM, VEH-NPCM vs AM-NPCM y VEH-NPCM vs CKT-NPCM, 3) El Grupo VEH-PCM se comparó contra los otros tres grupos que si fueron sometidos a la PCM; VEH-PCM vs OLE-PCM, VEH-PCM vs AM-PCM y VEH-NPCM vs CKT-NPCM, 4) Los grupos también se compararon por tratamiento, es decir, se hicieron comparaciones entre el mismo fármaco pero con distinta condición; OLE-NPCM vs OLE-PCM, AM-NPCM vs AM-PCM y CKT-NPCM vs CKT-PCM, 5) y por último también se hicieron comparaciones entre grupos de la misma condición pero con distinto fármaco; OLE-NPCM vs AM-NPCM, OLE-NPCM vs CKT-NPCM, AM-NPCM vs CKT-NPCM, OLE-PCM vs AM-PCM, OLE-PCM vs CKT-PCM y AM-PCM vs CKT-PCM. }

### 3.6.2 Datos de Western Blot

Para el análisis estadístico del WB, en el que teníamos solo dos grupos para cada estructura, se empleó una prueba t de Student para dos muestras independientes. Si en dado caso no pasaban la prueba de homogeneidad de la varianza entonces optamos por correr la prueba U- de Mann-Whitney. Estas pruebas fueron realizadas con el equipo estadístico SIGMA PLOT versión 11 y SPSS versión 16.

Las comparaciones entre grupos se realizaron de la siguiente manera: 1) CPF de NPCM comparado con CPF de PCM, 2) NAc de NPCM comparado con NAc de PCM y 3) Hip de NPCM comparado con Hip de PCM.

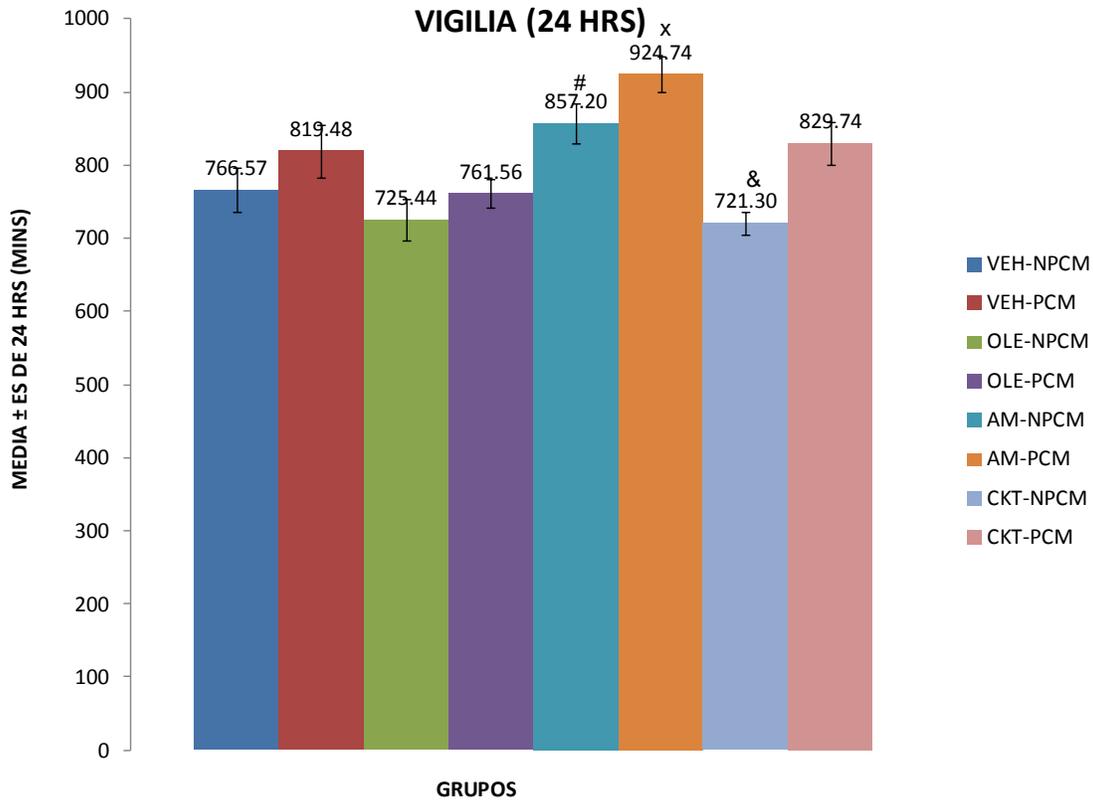
## 4. RESULTADOS

Los datos correspondientes a los tiempos totales que los sujetos permanecieron en Vigilia, SOL o sueño MOR se presentan por separado. Para observar la integridad del ciclo vigilia-sueño se presentan datos del registro completo de 24 HRS. También los datos se representan en bloques de 12 HRS, la fase de luz y la de oscuridad, para considerar los cambios que estas condiciones puedan definir. Por último también se divide el registro completo de 24 HRS en bloques de 4 HRS., para observar la duración, inmediatez, calidad y mantenimiento del efecto farmacológico de los cannabinoides administrados. Con respecto a los parámetros de sueño referentes a la microarquitectura, estos, se manejan en tablas diferentes dependiendo de cada estado y del parámetro evaluado. Todos los parámetros evaluados se representan en minutos (media  $\pm$  error estándar) exceptuando el número de transiciones y el número de episodios.

### 4.1 Tiempos totales: Vigilia

La Gráfica 1 representa el tiempo total que los sujetos transcurrieron en Vigilia durante las 24 HRS del registro EEG. Se observa que en promedio, los sujetos controles que no fueron sometidos a la PCM tuvieron un periodo de vigilia con duración de 766.57 min en 24 horas. El resto de los grupos, con excepción de los 2 grupos que recibieron AM-251 y al grupo que recibió el coctel de fármacos y no sometido a PCM, fueron similares y no presentaron diferencias significativas estadísticamente. Los dos grupos que recibieron el antagonista de cannabinoides AM-251 mostraron diferencias estadísticas ( $p < .05$ ), independientemente de si fueron o no tratados con PCM respecto a los grupos que recibieron OLE. Aunque es necesario notar que los tratados con PCM tuvieron un tiempo de vigilia aún mayor. El análisis también reveló que existe

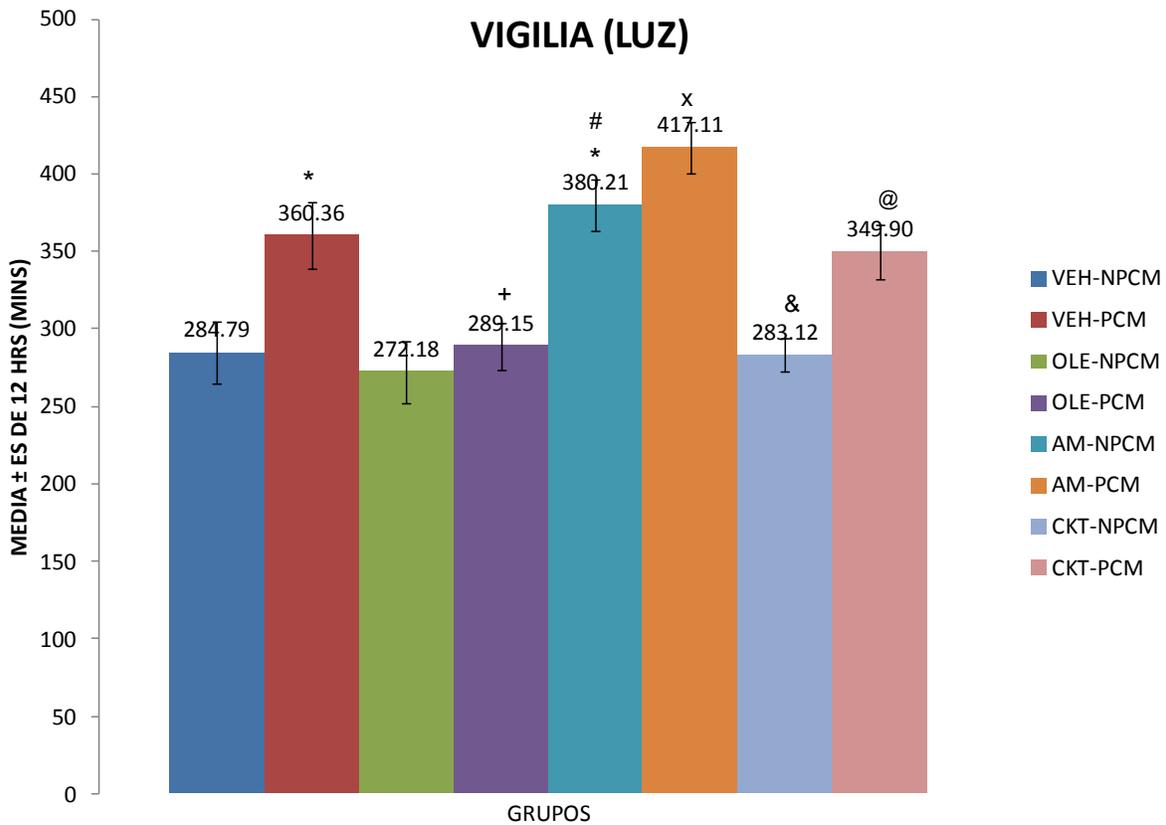
un decremento significativo ( $p < 0.05$ ), en el tiempo de Vigilia para el grupo administrado con CKT pero sin PCM comparado contra el grupo con AM-251 y sin PCM.



**Gráfica 1: Cambios en la Vigilia tras la PCM y la administración de cannabinoides.** Tiempo total que los sujetos pasaron en sueño Vigilia durante las 24 HRS. del registro EEG. Los datos se presentan en minutos (media  $\pm$  error estándar). Existen una disminución del tiempo transcurrido en Vigilia de AM-NPCM vs CKT-NPCM (&). También existe un aumento del tiempo transcurrido Vigilia de OLE-NPCM vs AM-NPCM (#) y de OLE-PCM vs AM-PCM (x). ( $p < .05$ ).

Cuando el análisis se realiza por las primeras 12 horas, fase de luz, las diferencias son más contrastante. En la Gráfica 2 se observa que los sujetos controles mostraron una vigilia de 284.79 min en promedio, lo cual fue significativamente menor que los 360.36 min del grupo sometido a PCM, y con los grupos que recibieron el antagonista canabinoide con NPCM (386.21 min;  $p < 0.05$ ) y con PCM (417.11 min;  $p < 0.05$ ). También los sujetos que recibieron el coctel y PCM (349.90 min;  $p < 0.05$ ) mostraron tiempo de vigilia significativamente mayores al grupo

control tratado con AM-251. Esta Gráfica, muestra también que el someter a los animales a la PCM induce un mayor tiempo de vigilia, sin embargo este efecto es revertido cuando se aplica el canabinoide OLE ya sea sólo o en combinación con el coctel. Mientras que la aplicación del antagonista canabinoide AM-251, realiza el efecto opuesto, es decir incrementa el tiempo de vigilia.



Gráfica 2: **Cambios en Vigilia durante la fase de luz tras la PCM y la administración de canabinoides.** Tiempo total que los sujetos pasaron en Vigilia durante las primeras 12 HRS. del registro EEG y posteriores a la administración de fármacos. Los datos se presentan en minutos (media ± error estándar). Existen una aumento del tiempo transcurrido en Vigilia de VEH-NPCM vs VEH-PCM y VEH-NPCM vs AM-NPCM (\*), de OLE-NPCM vs AM-NPCM (#) y de OLE-PCM vs AM-PCM (x). También existe una disminución del tiempo en Vigilia de VEH-PCM vs OLE-PCM (+), de AM-NPCM vs CKT-NPCM (&) y de CKT-NPCM vs CKT-PCM (<). (p<.05).

No existieron diferencias significativas referentes al tiempo transcurrido en Vigilia durante la fase de oscuridad.

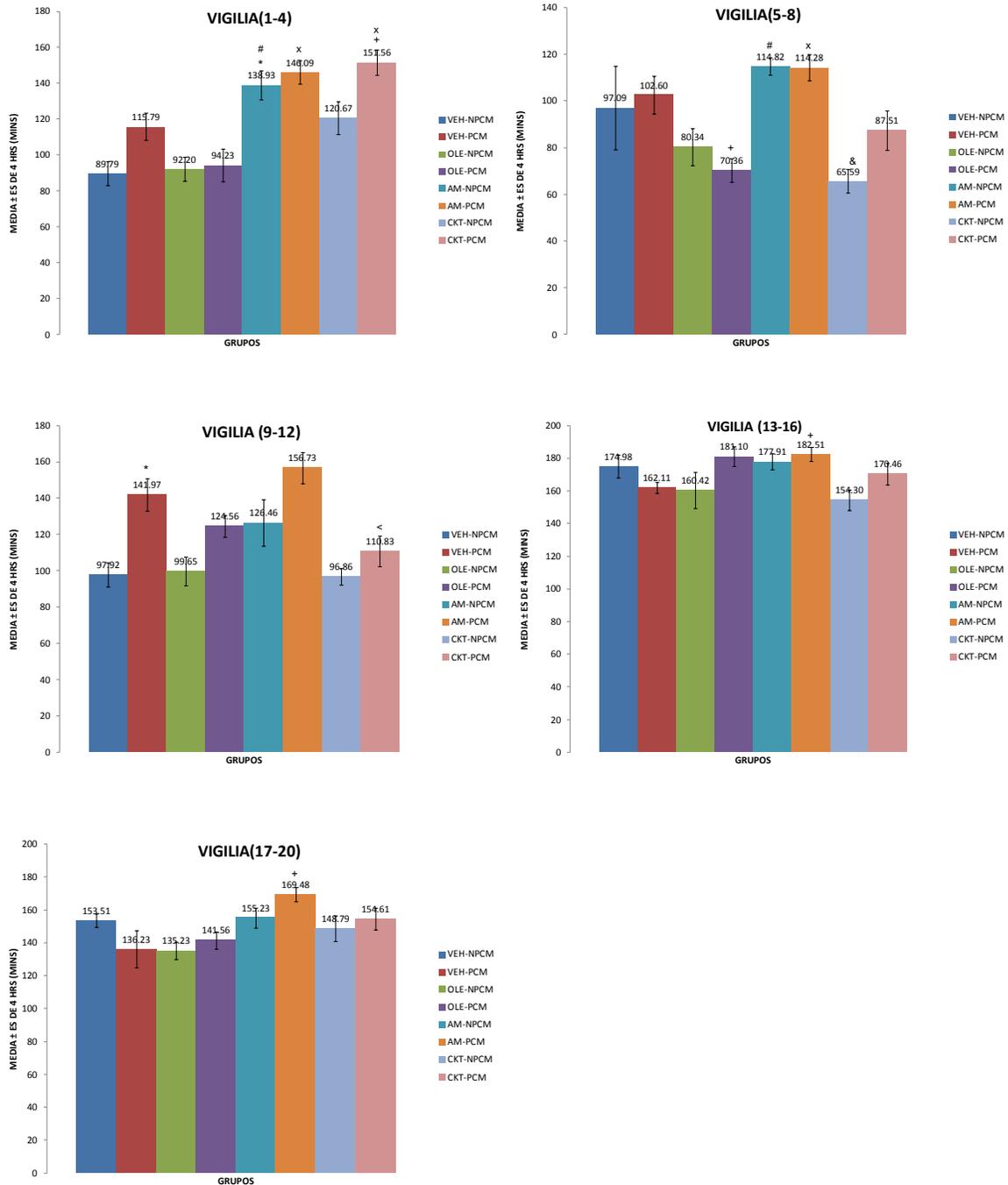
Cuando dividimos el registro en bloques de cuatro para denotar el impacto farmacológico de los cannabinoides encontramos varias diferencias significativas a lo largo del registro EEG.

En la Gráfica 3 se muestra el tiempo total que los grupos transcurrieron en vigilia durante el registro de 24 HRS pero dividido en bloques de 4 HRS. En el primer bloque se encontraron diferencias en los tratados con AM-251, tanto sin PCM (138.93 min) como en los tratados con PCM (146.09 min), así como del grupo de sujetos que recibieron el coctel de fármacos y fueron tratados con PCM (151.56) cuando se compararon con el grupo control (89.79 min). Además se observaron diferencias significativas entre ambos grupos tratados con OLE. Esta diferencia también se observa entre ambos grupos que recibieron el coctel. Nuevamente se observa que el canabinoide revierte el efecto de la PCM y que el antagonista canabinoide incrementa el efecto de la PCM sobre la vigilia.

Para el segundo bloque de cuatro HRS (vigilia 5-8) perteneciente a la fase de luz, también se observan diferencias significativas. Tal como lo muestra la Gráfica 3 los grupos tratados con AM-251 continúan mostrando un incremento del tiempo de vigilia con respecto al control ( $p < 0.05$ ), pero ahora se muestra que existe una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) del tiempo transcurrido en Vigilia del grupo sujeto a la PCM y administrado con OLE en comparación al grupo con solo VEH y con PCM. También encontramos una disminución significativa del tiempo en Vigilia del grupo administrado con CKT y que no tuvo la PCM con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ).

Para el último bloque de la fase de luz (vigilia 9-12) encontramos nuevamente que el efecto de la PCM es incrementar el tiempo de vigilia significativamente ( $p < 0.05$ ), efecto que es revertido por la OLE, e Incrementado por la administración de AM-251. El análisis también reveló una disminución en el tiempo que pasa en Vigilia el grupo sometido a la PCM y administrado con CKT comparado con el grupo que fue administrado con AM-251 y de la misma condición ( $p < .05$ ).

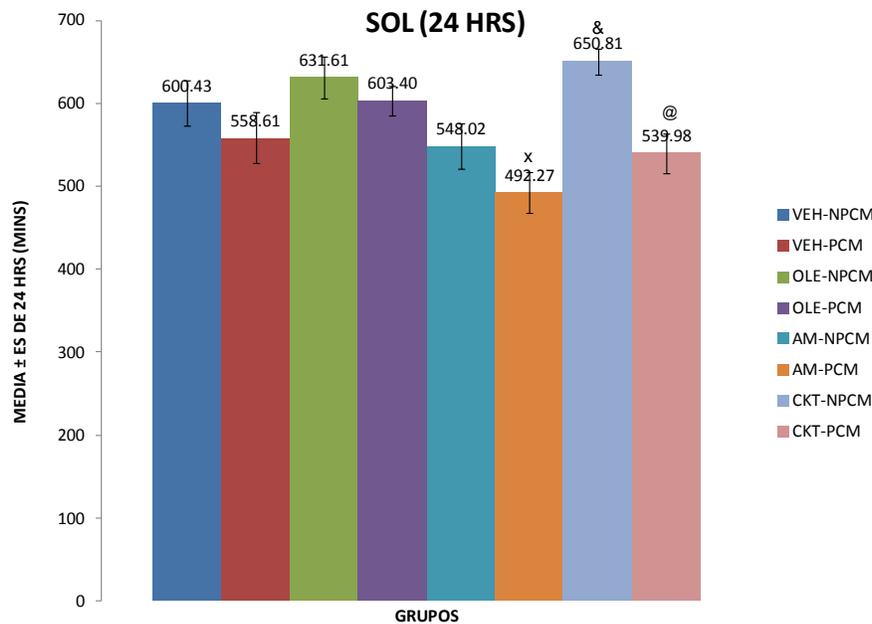
Para la fase de oscuridad solo se encontró una diferencia significativa en los primeros dos bloques de 4 HRS. No hubo diferencia alguna en el último bloque del registro. Se observó que el grupo tratado con PCM y AM-251 es diferente del grupo tratado con PCM y VEH ( $p < .08$ )



**Gráfica 3: Cambios en Vigilia durante bloques de 4HRs; efecto de la PCM y de la administración de endocannabinoides.** Los datos se presentan en minutos (media ± error estándar) y muestran los tiempos totales que los sujetos transcurrieron en vigilia. Se puede observar distintas diferencias significativas a lo largo del registro. Por ejemplo; Se observa que el efecto del AM-251 para el grupo con PCM dura a lo largo de las primeras 20 HRS. También se puede observar el efecto que la PCM provoca en los sujetos, aumentando el tiempo de Vigilia al ser comparados con los sujetos sin PCM. De igual forma existe la tendencia de la OLE a disminuir el tiempo en que los sujetos pasan despiertos. Significancias; \* vs VEH-NPCM, + vs VEH-PCM, # vs OLE-NPCM, x vs OLE-PCM, & vs AM-NPCM, < vs AM-PCM, @ vs CKT-NPCM. ( $p < .05$ ).

## 4.2 Tiempos totales: SOL

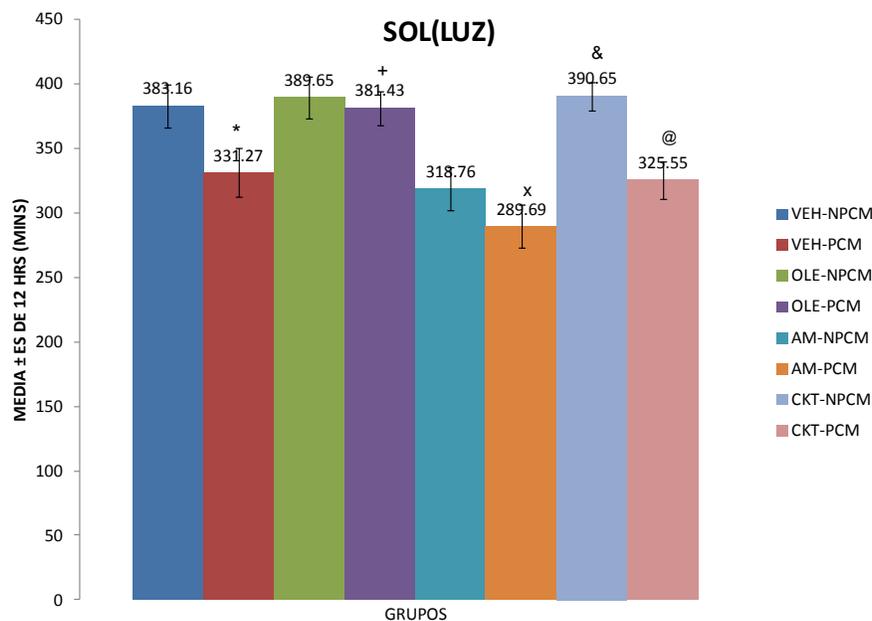
Los efectos ejercidos por la PCM y por la administración de OLE, AM-251 y el coctel de OLE con AM-251 sobre el SOL durante las 24 hrs de registro se muestran en la Gráfica 4. Existe una reducción significativa ( $p < 0.05$ ) para los grupos sometidos a la PCM y que recibió ya sea AM-251 o el coctel de ambos fármacos. Además se encontró un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) de este tipo de sueño en sujetos que recibieron el coctel y NPCM.



**Gráfica 4: Cambios en el sueño SOL tras la PCM y la administración de cannabinoides.** Tiempo total que los sujetos pasaron en sueño SOL durante las 24 HRS. de registro EEG. Los datos se presentan en minutos (media  $\pm$  error estándar). Existen una disminución del tiempo transcurrido en sueño SOL de OLE-PCM vs AM-PCM (x) y de CKT-NPCM vs CKT-PCM (@). También existe un aumento en el tiempo transcurrido en sueño SOL de AM-NPCM vs CKT- NPCM (&). ( $p < .05$ ).

Al considerar la fase de luz (las primeras 12 HRS) del registro EEG encontramos más diferencias significativas. Como se muestra en la Gráfica 5, a excepción del grupo tratado con OLE, todos los grupos restantes sometidos a PCM, muestran una disminución significativa en su

tiempo de SOL, lo cual sugiere que la OLE revierte el efecto de la PCM. El contraste entre los grupos tratados con ambos fármacos también es significativo ( $p < 0.05$ ), así como entre los animales que recibieron o no la PCM. Es decir hay diferencias entre el grupo AM-PCM contra el grupo OLE-PCM, en este caso el AM-251 disminuye el sueño ( $p < 0.05$ ). El grupo CKT-NPCM es significativamente diferente al grupo AM-NPCM ( $p < 0.05$ ) y así también el grupo CKT-PCM comparado con el grupo CKT-NPCM ( $p < 0.05$ ).



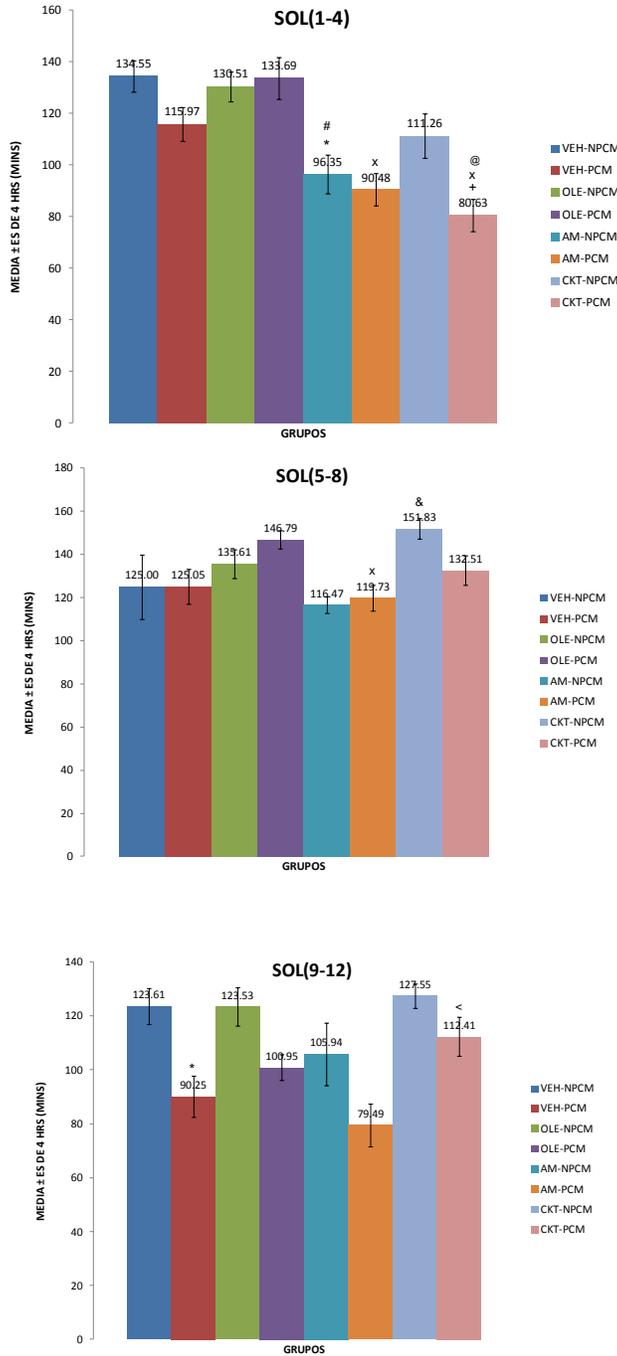
**Gráfica 5: Cambios en el sueño MOR durante la fase de luz tras la PCM y la administración de cannabinoides.** Tiempo total que los sujetos pasaron en sueño SOL durante las 12 primeras HRS. del registro EEG y posteriores a la administración de fármacos. Los datos se presentan en minutos (media  $\pm$  error estándar). Existen una disminución del tiempo transcurrido en sueño MOR de VEH-NPCM vs VEH-PCM (\*), de OLE-PCM vs AM-PCM (x) y de CKT-NPCM vs CKT-PCM (@). También existe un aumento en el tiempo transcurrido en sueño MOR de VEH-PCM vs OLE-PCM (+) y de AM-NPCM vs CKT-NPCM (&). ( $p < .05$ ).

No existieron diferencias significativas referentes al tiempo transcurrido en SOL durante la fase de oscuridad para ningún grupo.

En la Gráfica 6 se presenta el tiempo total que los grupos transcurrieron en SOL durante bloques de 4 HRS a lo largo del registro completo. El análisis mostró que no existió diferencia alguna en la fase de oscuridad. Sin embargo, se observa para el primer bloque, que la aplicación de OLE revierte el efecto de la PCM sobre este tipo de sueño, y que los grupos tratados con AM-251 disminuyen significativamente el tiempo que pasan en este tipo de sueño, ya sea cuando se aplica solo o cuando se aplica en coctel, en comparación con el control y con los grupos tratados con OLE. Nuevamente estos datos muestran que el AM-251 incrementa los efectos de la PCM sobre el sueño.

En el análisis del segundo bloque se mostró que las únicas diferencias significativas que se encontraron fueron; el grupo sometido a la PCM que fue administrado con AM-251 comparado con el grupo que recibió OLE con la PCM ( $p < 0.05$ ) y el grupo administrado con CKT y sujeto a la PCM comparado con el grupo que recibió AM -251 y fue sometido a la PCM. Tal como lo muestra la Gráfica 6 (SOL 5-8).

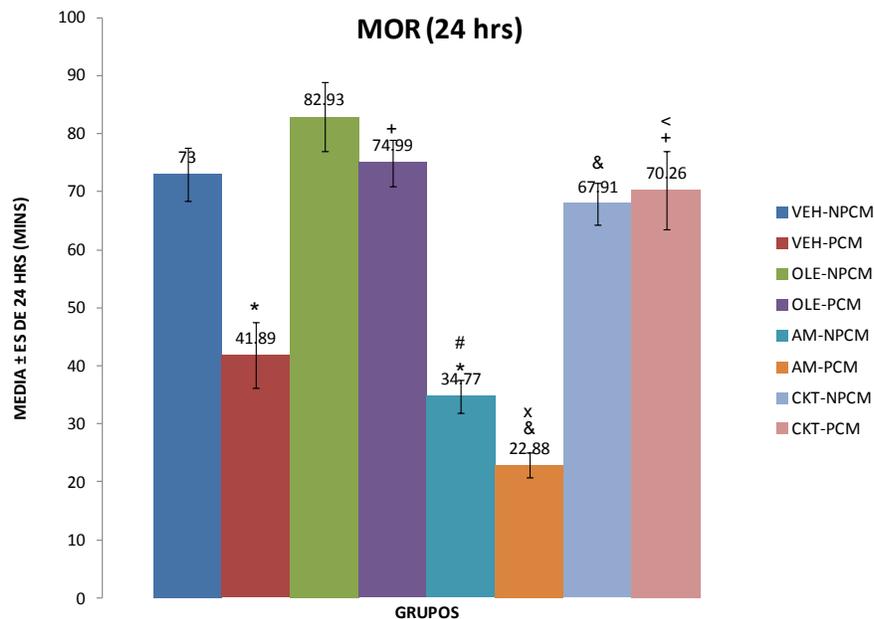
AL evaluar el tercer bloque de la fase de luz se manifiesta el efecto de la PCM sobre el SOL, en todos los grupos la PCM induce una reducción en la duración de este sueño, independientemente del tratamiento farmacológico realizado. Aunque solo los decrementos inducidos en los grupos que recibieron el vehículo y el coctel de fármacos fueron estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ).



**Gráfica 6: Cambios en SOL durante bloques de 4HRs; efecto de la PCM y de la administración de endocannabinoides.** Los datos se presentan en minutos (media  $\pm$  error estándar) y muestran los tiempos totales que los sujetos transcurrieron en SOL durante bloques de 4 HRS. Se puede observar distintas diferencias significativas a lo largo del registro. Por ejemplo; Se observa que el efecto del AM-251 para ambos grupos (PCM o NPCM) tiene un efecto disminuyendo el sueño SOL. Se observa una tendencia de OLE por incrementar el sueño SOL para los sujetos tratados con PCM. Además, se puede apreciar que la administración del Coctel tiene un efecto distinto en cada bloque de 4HRS. Significancias; \* vs VEH-NPCM, + vs VEH-PCM, # vs OLE-NPCM, x vs OLE-PCM, & vs AM-NPCM, < vs AM-PCM, @ vs CKT-NPCM. ( $p < .05$ ).

### 4.3 Tiempos totales: MOR

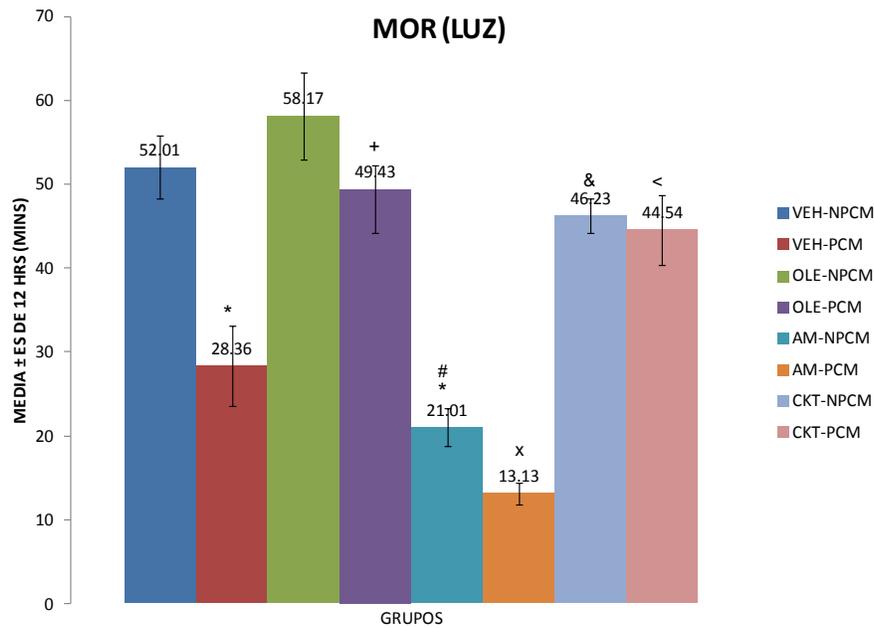
La Gráfica 7 representa el tiempo total que los sujetos transcurrieron en sueño MOR durante las 24 HRS del registro EEG. Para empezar, el análisis mostró que la PCM induce una disminución del tiempo transcurrido en sueño MOR. Este efecto es revertido por la OLE, ya sea aplicada sola o en conjunción con el AM-251. Además este efecto es acrecentado por la aplicación única del AM-251, ya que, al comparar ambos grupos administrados con AM-251 (NPCM y PCM) estos son diferentes entre sí ( $p < 0.05$ ).



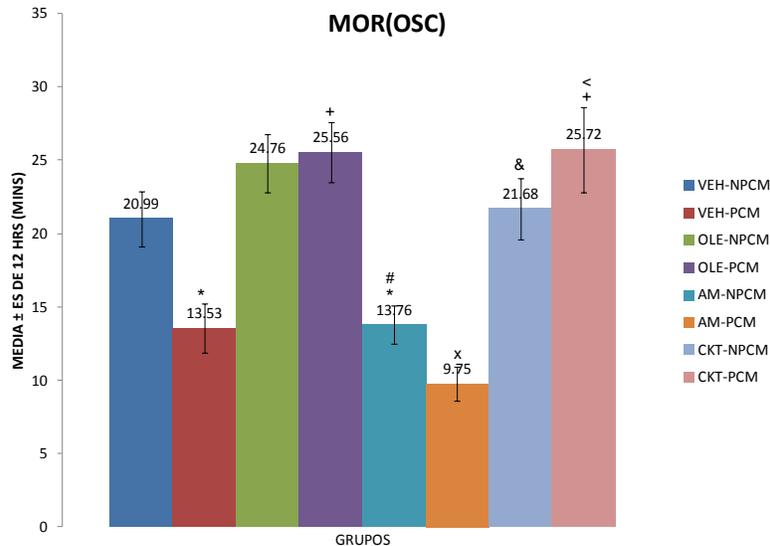
Gráfica 7: **Cambios en el sueño MOR tras la PCM y la administración de cannabinoides.** Tiempo total que los sujetos pasaron en sueño MOR durante las 24 HRS. de registro EEG. Los datos se presentan en minutos (media  $\pm$  error estándar). Existen una disminución del tiempo transcurrido en sueño MOR de VEH- NPCM vs VEH-PCM y VEH-NPCM vs AM-NPCM (\*), de OLE-NPCM vs AM-NPCM (#), de OLE-PCM vs AM-PCM (x) y de AM-NPCM vs AM-PCM (&). Mientras que existe un aumento en el tiempo transcurrido en sueño MOR de VEH-PCM vs OLE-PCM y VEH-PCM vs CKT-PCM (+), de AM-NPCM vs CKT- NPCM (&) y de AM-PCM vs CKT-PCM (<). ( $p < 0.05$ ).

El análisis de las primeras 12 HRS de la fase de luz, y de las 12 HRS de la fase de oscuridad que también se analizaron, Fig. 8 y Fig. 9, respectivamente, se muestra un patrón muy

similar a la observada en el análisis de las 24 horas. Nuevamente en ambas situaciones observamos que la PCM reduce significativamente el sueño MOR y que la OLE revierte tal efecto. De la misma manera se observa que el AM-251 incrementa el efecto de la PCM y disminuye el sueño MOR en los animales que no fueron sometidos a esta condición. Se muestran diferencias en todos los grupos, con excepción del que recibió OLE y no fue sometido a la PCM. Nuevamente se observa que el efecto del coctel no está bien definido. Se observan patrones, exceptuando a los grupos de coctel, al comparar los valores entre los animales que recibieron la PCM de aquellos que no la recibieron, implicando que la PCM disminuye el sueño MOR.

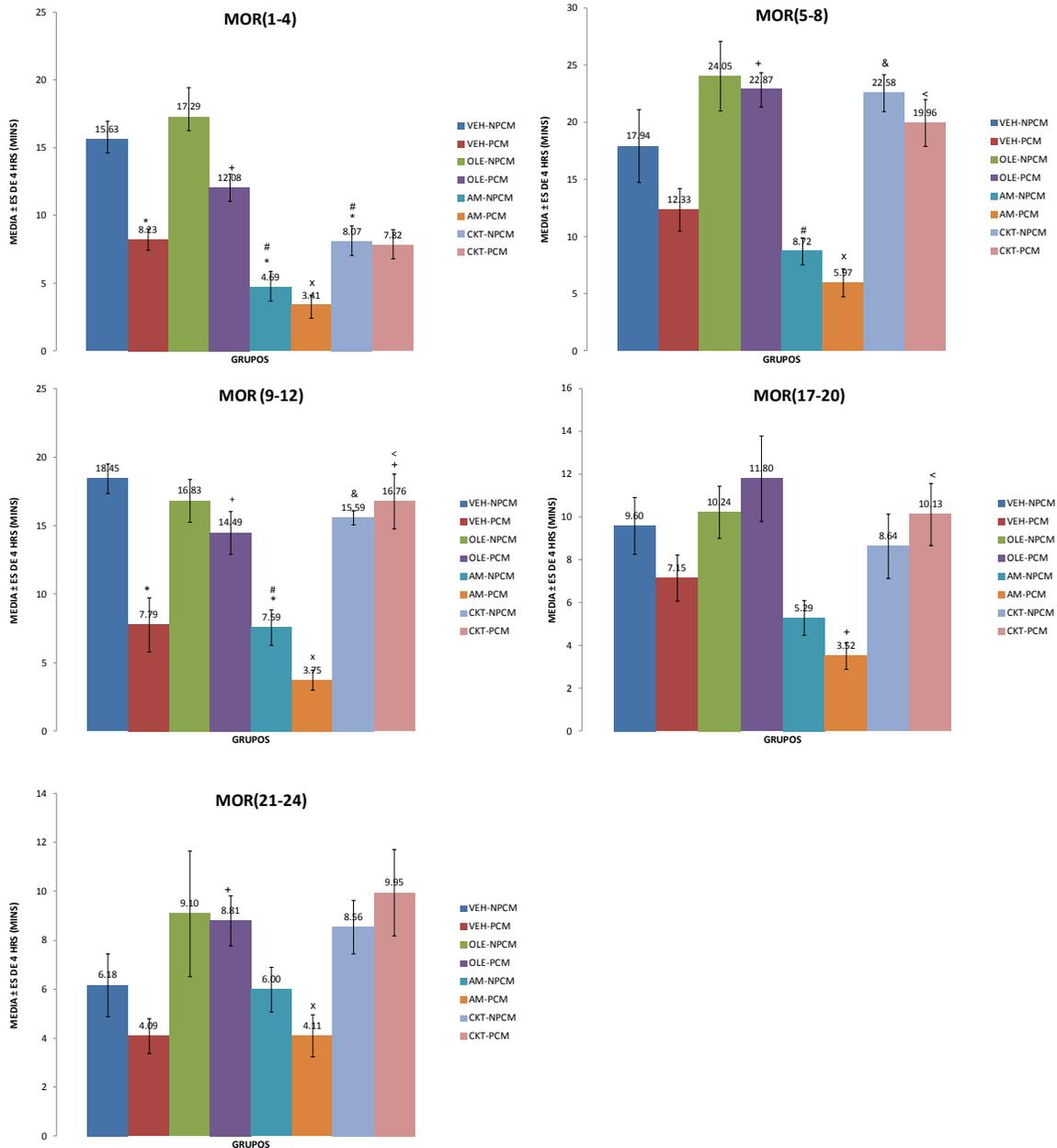


Gráfica 8: **Cambios en el sueño MOR durante la fase de luz tras la PCM y la administración de cannabinoides.** Tiempo total que los sujetos pasaron en sueño MOR durante las 12 primeras HRS. del registro EEG y posteriores a la administración de fármacos. Los datos se presentan en minutos (media ± error estándar). Existen una disminución del tiempo transcurrido en sueño MOR de VEH-NPCM vs VEH-PCM y VEH-NPCM vs AM-NPCM (\*), de OLE-NPCM vs AM-NPCM (#), de OLE-PCM vs AM-PCM (x). También existe un aumento en el tiempo transcurrido en sueño MOR de VEH-PCM vs OLE-PCM (+), de AM-NPCM vs CKT- NPCM (&) y de AM-PCM vs CKT-PCM (<). (p<.05).



**Gráfica 9: Cambios en el sueño MOR durante la fase de oscuridad tras la PCM y la administración de cannabinoides.** Tiempo total que los sujetos pasaron en sueño MOR durante las 12 últimas HRS. del registro EEG. Los datos se presentan en minutos (media  $\pm$  error estándar). Existen una disminución del tiempo transcurrido en sueño MOR de VEH- NPCM vs VEH-PCM y VEH-NPCM vs AM-NPCM (\*), de OLE-NPCM vs AM-NPCM (#) y de OLE-PCM vs AM-PCM (x). También existe un aumento en el tiempo transcurrido en sueño MOR de VEH-PCM vs OLE-PCM y de VEH-PCM vs CKT-PCM (+), de AM-NPCM vs CKT- NPCM (&) y de AM-PCM vs CKT-PCM (<). ( $p < .05$ ).

En la Gráfica 10 se presenta el tiempo total que los grupos transcurrieron en sueño MOR durante las diferentes etapas de 4 horas, con excepción de las primeras 4 horas de la fase de oscuridad en la que no se encontraron diferencias significativas en ningún grupo. En estas 5 Gráficas puede observarse muchas similitudes entre ellas. En todas ellas se observa que la PCM induce una reducción importante del sueño MOR, Sobre todo en la última fase del periodo de luz. También todas ellas muestran que la aplicación IP de OLE revierte el efecto, en algunos periodos, casi en su totalidad, ya sea cuando se aplica solo o en combinación con el AM-251, sólo durante la primera etapa de sueño esta reversión no se presentó, pero en los restantes periodos este efecto fue consistente. La aplicación exclusiva de AM-251, provocó un incremento del efecto de la PCM sobre el sueño MOR. Es decir, la reducción del sueño MOR fue mayor en todos los grupos a los que se aplicó este bloqueador del CB1.



Gráfica10: Cambios en sueño MOR durante bloques de 4HRs; efecto de la PCM y de la administración de endocannabinoides. Los datos se presentan en minutos (media  $\pm$  error estándar) y muestran los tiempos totales que los sujetos transcurrieron en SOL durante bloques de 4 HRS. Se puede observar distintas diferencias significativas a lo largo del registro. Por ejemplo; Se observa que el efecto de la PCM reduce el sueño Mor de manera importante. Por otro lado, la administración de OLE en la condición de PCM revierte este efecto, aumentando el sueño MOR. También el efecto de AM-251 para todos los grupos y durante todo el registro de 24 HRS incrementa el efecto de la PCM, es decir reduce el sueño MOR aun más que la PCM sola. Además, se puede apreciar que el AM-251 no revierte el efecto de Ole cuando se administran en conjunto. Significancias; \* vs VEH-NPCM, + vs VEH-PCM, # vs OLE-NPCM, x vs OLE-PCM, & vs AM-NPCM, < vs AM-PCM, @ vs CKT-NPCM. ( $p < .05$ ).

#### 4.4 Latencias

La latencia es uno de los parámetros de sueño que define el tiempo que tarda un sujeto en iniciar el primer episodio de sueño desde el comienzo del registro EEG. La latencia para SOL, hace referencia al tiempo que el sujeto tarda en mostrar el primer episodio de SOL, mientras que la latencia para MOR implica el tiempo que tarda el sujeto para el primer episodio de MOR.

Los resultados respecto a las latencias de ambos componentes del sueño se muestran en la siguiente tabla (tabla 3). Se puede observar que el único cambio significativo fue del grupo VEH-NPCM comparado con el grupo CKT-NPCM aumentando el tiempo que tarda el sujeto en tener su primer episodio de sueño SOL. Mientras que para las latencias de MOR, se puede observar que existe un aumento en el tiempo que el grupo AM-NPCM tarda para el primer episodio de MOR en comparación con el VEH-NPCM ( $p < .05$ ). Sin embargo, es importante destacar la tendencia que tiene la PCM por incrementar la latencia para MOR (grupo VEH-PCM vs grupo VEH-NPCM).

**Tabla 3: Cambios en la Latencia para SOL y de MOR después de la PCM y de la administración de cannabinoides.** Los datos se presentan en minutos (media  $\pm$  error estándar) y muestran la latencia para sueño SOL y para sueño MOR desde el comienzo del registro EEG. Se observa que hay un aumento de la latencia de VEH-NPCM vs CKT-NPCM (\*).  $p < .05$ ). También se observa que hay un aumento de la latencia de MOR de VEH-NPCM vs AM-NPCM (\*).  $p < .05$ ).

GRUPOS	LATENCIA SOL	LATENCIA MOR
VEH-NPCM	28.1 $\pm$ 3.04	57.92 $\pm$ 5.3
VEH-PCM	27.79 $\pm$ 4.75	100.9 $\pm$ 22.78
OLE-NPCM	24.35 $\pm$ 4.35	64.78 $\pm$ 4.6
OLE-PCM	30.96 $\pm$ 4.04	84.98 $\pm$ 17.2
AM-NPCM	47.93 $\pm$ 13.11	125.95 $\pm$ 18.17 *
AM-PCM	56.98 $\pm$ 14.18	147.05 $\pm$ 20.84
CKT-NPCM	51.61 $\pm$ 12.94 *	140.29 $\pm$ 22.74
CKT-PCM	69.51 $\pm$ 16.38	133.94 $\pm$ 15.16

## 4.5 Transiciones

Las transiciones son definidas como el número de veces que el sujeto “transita” de un estado a otro (vigilia- SOL- MOR). Se dividen en las transiciones durante la fase de luz y las transiciones durante la fase de oscuridad.

Tal como lo muestra la siguiente tabla (tabla 6) existe un aumento significativo en el número de transiciones en luz (primeras 12 hrs) para el grupo CKT-NPCM en comparación al grupo VEH-PCM y el AM-NPCM. Mientras que en caso de las transiciones en la fase de oscuridad, se puede observar que existe un aumento significativo del número de transiciones del grupo CKT-NPCM en comparación al VEH-NPCM y el grupo OLE-NPCM. Además, existe un aumento significativo del grupo CKT-PCM contra el grupo Ole-PCM.

**Tabla 6: Cambios en el número de transiciones después de la PCM y de la administración de canabinoides.** Los datos se presentan en minutos (media  $\pm$  error estándar) y muestran el número de transiciones ocurridas entre estados (Vigilia, SOL y MOR) a lo largo del registro completo. En la fase de luz se observa que hay un aumento del número de transiciones de VEH-NPCM vs CKT-NPCM (\*) y de AM-NPCM vs CKT-NPCM (&).  $p < .05$ . Para la fase de oscuridad se muestra un aumento del número de transiciones de VEH-NPCM vs CKT-NPCM (\*), de OLE-NPCM vs CKT-NPCM y una disminución de OLE-PCM vs CKT-PCM (&).  $p < .05$ .

GRUPOS	TRANSICIONES EN LUZ	TRANSICIONES EN OSC.
VEH-NPCM	184.22 $\pm$ 16.94	146.22 $\pm$ 7.86
VEH-PCM	190.44 $\pm$ 13.28	150.66 $\pm$ 12.17
OLE-NPCM	197.2 $\pm$ 12.48	141.1 $\pm$ 9.26
OLE- PCM	190.9 $\pm$ 12.9	143.9 $\pm$ 8.31
AM-NPCM	196.4 $\pm$ 8.96	175.9 $\pm$ 8.35
AM-PCM	174.33 $\pm$ 10.18	167.44 $\pm$ 13.04
CKT-NPCM	225.11 $\pm$ 7.99 * &	181.55 $\pm$ 11.86 * #
CKT-PCM	214.33 $\pm$ 13.94	168.44 $\pm$ 13.51 X

## 4.6 Número de episodios

El número de episodios es definido como el número de eventos presentados a lo largo del registro EEG en cada uno de los estados (vigilia- SOL- MOR). Aquí se presentan el número de episodios de cada uno de los estados por separado y también si pertenecieron a la fase de luz (12 HRS.) o a la fase de oscuridad (12 HRS.) Con respecto al número de episodios en Vigilia, no hubo diferencias significativas entre grupos, ni por tratamiento, ni por condición. No existieron cambios ni en la fase de luz, ni en la fase de oscuridad.

### 4.6.1 Número de episodios SOL

En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos respecto al número de episodios de SOL en la fase de luz. Se observó que el único cambio significativo fue en la fase de luz entre el grupo CKT-NPCM donde hubo un incremento del número de episodios presentado comparado con el VEH-NPCM.

Tabla 7: **Cambios en el número de episodios de SOL después de la PCM y de la administración de canabinoides.** Los datos se presentan en minutos (media  $\pm$  error estándar) y muestran el número de episodios ocurridos en SOL durante las primeras 12 HRS. del registro EEG que representan a la fase de luz. Se puede observar que hay un aumento del número de episodios de VEH-NPCM vs CKT-NPCM (\*).  $p < .05$ .

GRUPOS	NUMERO DE EPISODIOS (SOL-LUZ)
VEH-NPCM	75 $\pm$ 4.18
VEH-PCM	82 $\pm$ 5.61
OLE-NPCM	87.69 $\pm$ 6.86
OLE- PCM	85.28 $\pm$ 5.12
AM-NPCM	86.33 $\pm$ 4.62
AM-PCM	78.34 $\pm$ 4.68
CKT-NPCM	97.4 $\pm$ 3.78 *
CKT-PCM	89.75 $\pm$ 5.81

No se encontró cambio alguno en la fase de obscuridad respecto al número de episodios de SOL.

#### 4.6.2 Número de episodios MOR

Como se puede ver en la tabla 8 el número de episodios de MOR se encuentra modificado por la administración de fármacos. Se observó que hubo una disminución en el número de episodios del grupo AM-PCM comparado con el grupo VEH-NPCM y OLE-NPCM. Además se encontró una disminución significativa en el número de episodios MOR presentados por el grupo AM-PCM en comparación al grupo OLE-PCM. También encontramos una diferencia significativa entre los grupos PCM y NPCM administrados con AM-251. Por otra parte, existe un aumento significativo entre el grupo CKT-NPCM y AM-NPCM, de igual forma para el grupo CKT-PCM contra el grupo AM-PCM y una diferencia del CKT-PCM comparado con el VEH-PCM.

Podemos observar que respecto al número de episodios de MOR presentados durante la fase de oscuridad, las únicas diferencias significativas que se mantienen son las presentadas por el grupo CKT-PCM que presentan un incremento en comparación al grupo VEH-PCM y el AM-PCM.

Tabla 8: **Cambios en el número de episodios de MOR después de la PCM y de la administración de canabinoides.** Los datos se presentan en minutos (media  $\pm$  error estándar) y muestran el número de episodios ocurridos en MOR durante el registro de 24 HRS. Para la fase de luz se puede observar que hay una disminución del número de episodios de VEH-NPCM vs AM-NPCM (\*), de OLE-NPCM vs AM-NPCM (#), de OLE-PCM vs AM-PCM (x) y de AM-NPCM vs AM-PCM (&), mientras que hay un incremento en el número de episodios de AM-NPCM vs CKT-NPCM, de VEH-PCM vs CKT-PCM y de AM-PCM vs CKT-PCM.  $p < .05$ ). Para la fase de oscuridad existe un aumento del número de episodios de VEH-PCM vs CKT-PCM (+) y una disminución de episodios de AM-PCM vs CKT-PCM (<).  $p < .05$ ).

GRUPOS	NÚMERO DE EPISODIOS (MOR-LUZ)	NÚMERO DE EPISODIOS (MOR-OSC)
VEH-NPCM	32.55 $\pm$ 1.56	19.44 $\pm$ 1.97
VEH-PCM	23.44 $\pm$ 3.57	16.33 $\pm$ 3.67
OLE-NPCM	34.09 $\pm$ 2.5	15.8 $\pm$ 1.19
OLE-PCM	34.2 $\pm$ 2.21	17.6 $\pm$ 2.07
AM-NPCM	21.8 $\pm$ 2.01 * #	14.2 $\pm$ 0.97
AM-PCM	14.11 $\pm$ 1.13 x &	11 $\pm$ 0.63
CKT-NPCM	38.55 $\pm$ 3.16 &	18.44 $\pm$ 2.18
CKT-PCM	37.44 $\pm$ 4.33+ <	24.77 $\pm$ 1.6 + <

#### 4.7 Duración promedio de episodios

La duración promedio del episodio es un parámetro del registro EEG que define el tiempo promedio que dura un evento de Vigilia, SOL o MOR. Se obtiene dividiendo el tiempo total transcurrido en un estado, por ejemplo, MOR entre el número total de episodios de MOR. Los datos se presentan considerando el estado (vigilia, SOL y MOR) y la fase en la que se evaluó (Luz y oscuridad). Los datos se presentan en minutos (media  $\pm$  error estándar). No se menciona la duración promedio del episodio de Vigilia, porque no hubo cambios, ni en la fase de luz, ni en la fase de oscuridad.

##### 4.8.1 Duración promedio del episodio de SOL

La tabla 9 muestra que existen diferencias significativas únicamente en los grupos que fueron administrados con AM-251. Se observa que el grupo NPCM es significativamente diferente al VEH-NPCM y al OLE-NPCM mostrando una reducción en la duración promedio de

los episodios de SOL. De igual forma, el grupo AM-PCM es diferente al grupo OLE-PCM mostrando una reducción.

Tabla 9: **Cambios en la duración promedio de un episodio de SOL después de la PCM y de la administración de cannabinoides.** Los datos se presentan en minutos (media  $\pm$  error estándar) y muestran la duración promedio de un episodio de SOL ocurrido durante las primeras 12 HRS. del registro EEG que representan a la fase de luz. Se puede observar que hay un aumento del número de episodios de VEH-NPCM vs AM-NPCM (\*) y de OLE-NPCM vs AM-NPCM(#).  $p < .05$ .

GRUPOS	DURACION PROMEDIO DEL EPISODIO (SOL-LUZ)
VEH-NPCM	5.21 $\pm$ 0.34
VEH-PCM	4.07 $\pm$ 0.15
OLE-NPCM	4.64 $\pm$ 0.39
OLE-PCM	4.58 $\pm$ 0.28
AM-NPCM	3.74 $\pm$ 0.21 * #
AM-PCM	3.72 $\pm$ 0.17 x
CKT-NPCM	4.05 $\pm$ 0.2
CKT-PCM	3.69 $\pm$ 0.19

No existieron cambios significativos en la duración promedio del episodio de SOL en la fase de oscuridad.

#### 4.8.2 Duración promedio de episodio de MOR

La tabla 10 presenta la duración promedio del episodio de MOR durante la fase de luz y la fase de oscuridad. Se observa una disminución significativa en la duración del episodio del grupo AM-NPCM comparado con VEH-NPCM y OLE-NPCM. Además el análisis también reveló una reducción de la duración en el grupo AM-PCM comparado con el grupo OLE-PCM.

Por otra parte, se puede observar que el cambio en la duración promedio de los grupos AM-NPCM y AM-PCM en la fase de luz se mantiene a lo largo de las siguientes 12 HRS., es decir, en la fase de oscuridad. Esta diferencia significativa de ambos grupos se da en comparación a los dos grupos de OLE. (OLE-PCM vs AM-PCM y OLE-NPCM vs AM-NPCM).

Tabla 10: **Cambios en la duración promedio de un episodio de MOR después de la PCM y de la administración de cannabinoides.** Los datos se presentan en minutos (media  $\pm$  error estándar) y muestran la duración promedio de un episodio de MOR ocurrido durante el registro de 24 HRS. Para la fase de luz se puede observar que hay una disminución de la duración promedio del episodio de VEH-NPCM vs AM-NPCM (\*) y de OLE-NPCM vs AM-NPCM(#).  $p < .05$ . Mientras que para la fase de oscuridad de muestra una disminución de la duración promedio del episodio de OLE-NPCM vs AM-NPCM (#) y de OLE-PCM vs AM-PCM(x).  $p < .05$ .

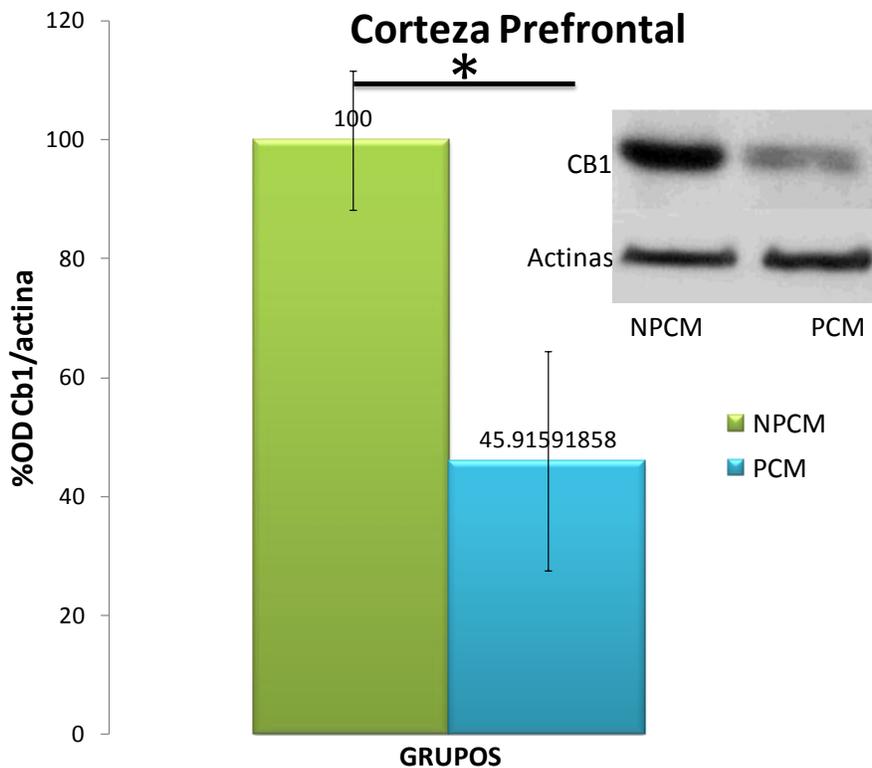
GRUPOS	DURACIÓN PROMEDIO DEL EPISODIO (MOR-LUZ)	DURACIÓN PROMEDIO DE EPISODIO (MOR-OSC)
VEH-NPCM	1.6 $\pm$ 0.1	1.11 $\pm$ 0.09
VEH-PCM	1.21 $\pm$ 0.1	0.95 $\pm$ 0.13
OLE-NPCM	1.7 $\pm$ 0.12	1.63 $\pm$ 0.17
OLE-PCM	1.48 $\pm$ 0.11	1.69 $\pm$ 0.33
AM-NPCM	0.95 $\pm$ 0.03 * #	0.96 $\pm$ 0.05 #
AM-PCM	0.93 $\pm$ 0.06 x	0.87 $\pm$ 0.07 x
CKT-NPCM	1.28 $\pm$ 0.16	1.32 $\pm$ 0.27
CKT-PCM	1.24 $\pm$ 0.12	1.03 $\pm$ 0.1

## 4.8 Resultados de Western Blot (WB)

Los resultados correspondientes a la expresión del CB1 en la CPF, NAc e HIP de las ratas con PCM y sin PCM, se presentan en porcentajes de densidad óptica. Se realizó un índice el cual consta de la densidad óptica del CB1 expresado entre la densidad óptica de las Actinas.

### 4.9.1 WB en CPF

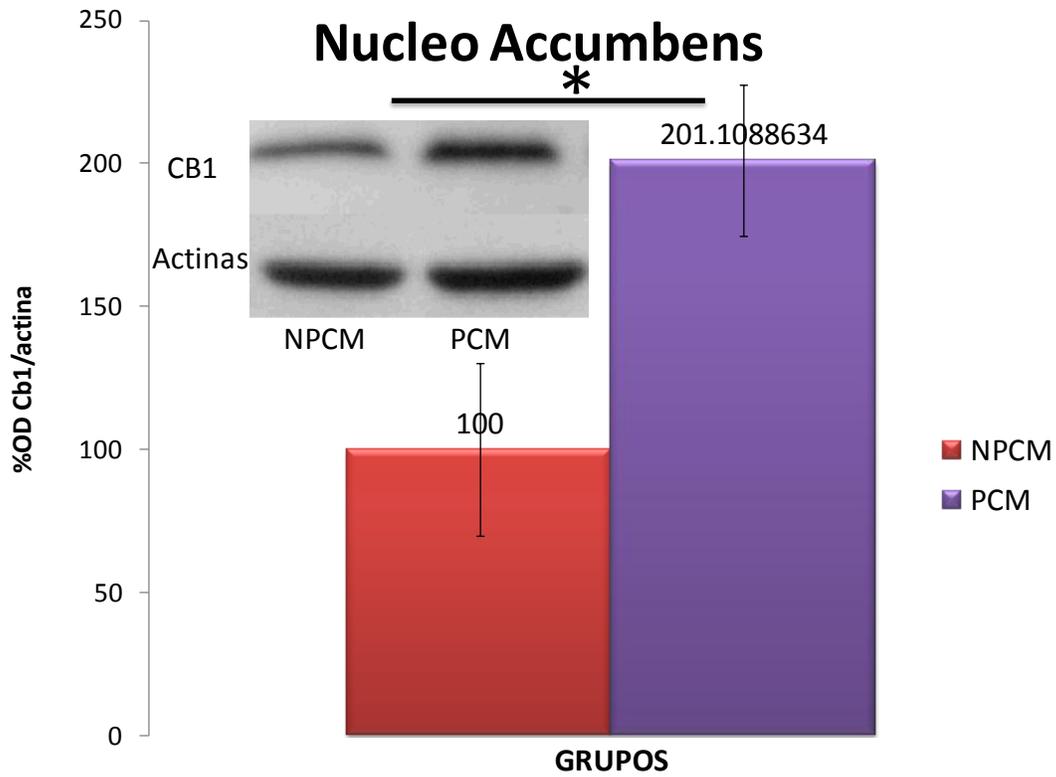
Con respecto al receptor canabinoide CB1 expresado en CPF, la Gráfica 11 muestra que las ratas con PCM (n=10) tienen una disminución significativa en la expresión del CB1 comparadas con las ratas que no tuvieron PCM (n=10).  $T = 99.000$   $P(\text{exact}) = 0.001$ .



**Gráfica 11: Efectos de la PCM en la expresión de CB1 en la CPF de ratas macho adultas.** Se muestra la densidad óptica de la expresión de CB1 en la CPF de ratas NPCM y PCM. Se observa una disminución significativa en la expresión del CB1 en las ratas con PCM. Se utilizó una prueba U de Mann-Whitney:  $T = 99.000$   $P(\text{exact}) = 0.001$ .

#### 4.9.2 WB en NAc

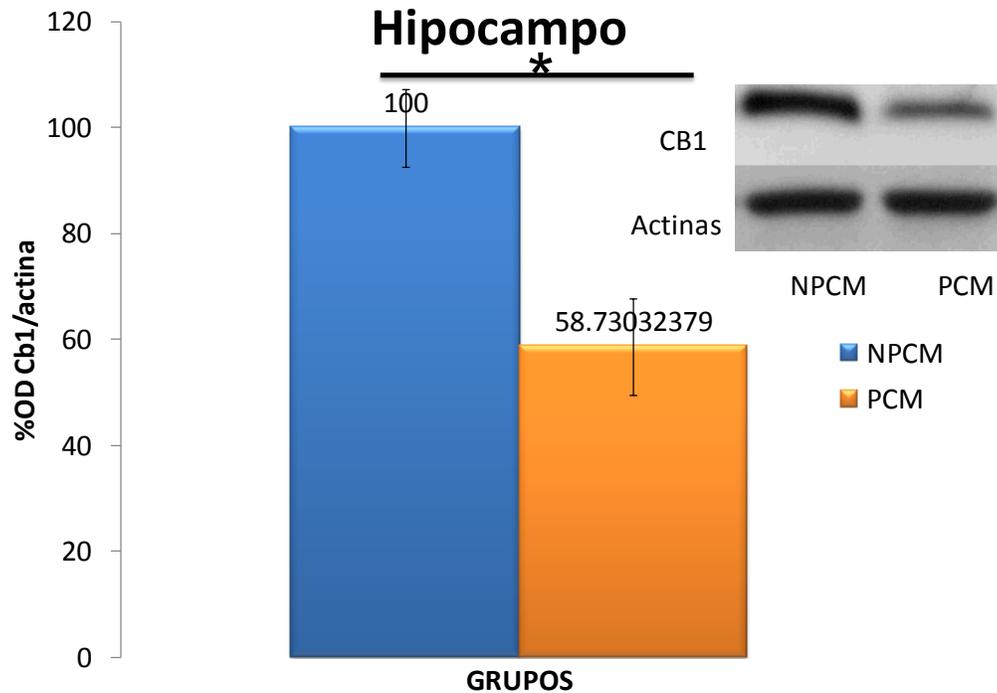
En relación con el receptor CB1 expresado en NAc, la Gráfica 12 muestra que las ratas con PCM (n=10) tienen un aumento significativo en la expresión del CB1 comparadas con las ratas sin PCM (n=10).  $T = 42.000$   $P(\text{exact}) = 0.005$ .



**Gráfica 12: Efectos de la PCM en la expresión de CB1 en el NAc de ratas macho adultas.** Se muestra la densidad óptica de la expresión de CB1 en el NAC de ratas NPCM y PCM. Se observa un aumento significativo del 100% en la expresión del CB1 en las ratas con PCM. Se utilizó una prueba U de Mann-Whitney:  $T = 42.000$   $P(\text{exact}) = 0.005$ .

### 4.9.3 WB en HIP

Por último y respecto al receptor CB1 expresado en HIP, la Gráfica 13 muestra que las ratas con PCM (n=10) tienen una disminución significativa en la expresión del CB1 comparadas con las ratas que no tuvieron PCM (n=10).  $t = 4.622$  (gl=18) ( $P = <0.001$ ).



Gráfica 13: **Efectos de la PCM en la expresión de CB1 en el hipocampo de ratas macho adultas.** Se muestra la densidad óptica de la expresión de CB1 en el hipocampo de ratas NPCM y PCM. Se observa una disminución significativa en la expresión del CB1 en las ratas con PCM.  $t = 4.622$  (gl=18) ( $P = <0.001$ ).

## 5. DISCUSIÓN

Como múltiples estudios conductuales han mostrado, las condiciones ambientales de crianza durante el periodo neonatal son críticas para el establecimiento de los factores neurobiológicos que controlan la conducta y la respuesta al estrés en la vida adulta (Bagot *et al.* 2009; Caldji *et al.* 1998; Champagne *et al.* 2008). La PCM en las primeras etapas de la vida es un modelo experimental que se ha empleado para observar conductas anormales en el individuo. Por ejemplo; se ha descrito que estas conductas pueden ser muy similares a las que presentan individuos que padecen psicopatologías del tipo de la ansiedad, de la depresión y de la esquizofrenia (Caspi *et al.* 2003; Daniels *et al.* 2004; Pryce *et al.* 2005).

Los efectos que la PCM provoca en la vida adulta de los individuos han sido estudiados por múltiples grupos; así, se mostró que además de variaciones en el sueño (Feng *et al.* 2007b; Tiba *et al.* 2008), las ratas que padecieron PCM muestran alteraciones respiratorias severas (Dumont and Kinkead, 2010; Gulemetova and Kinkead, 2011; Kinkead *et al.* 2009), importantes cambios gastro-intestinales (Barreau *et al.* 2004; Barreau *et al.* 2007) modificaciones cardiovasculares (Loria *et al.* 2011; Sanders and Anticevic, 2007; Tucker and Johnson, 1984) y alteraciones en la ingesta de alimentos en la vida adulta. (Jahng, 2011; Ryu *et al.* 2008).

Se sugiere que la razón fundamental como causa de los efectos provocados por la PCM, reside en una alteración del desarrollo de los sistemas del eje hipotálamo-hipofisis-adrenales (eje HPA) y como consecuencia en la forma en que los animales adultos manejan el estrés. En el caso de los estudios experimentales realizados en la rata, muestran que los sujetos en las primeras etapas de su vida aún no tienen el desarrollo total del su eje HPA, por lo que la sensibilidad de su

eje a los propios cortico-esteroides varía de acuerdo a su etapa postnatal (Aisa *et al.* 2009b; Macri *et al.* 2008). Si los sujetos con sensibilidad alterada a cortico-esteroides son sometidos a un estrés significativo, esto provocará una alteración irreversible y de largo plazo en la forma en que estos sistemas serán modulados en la vida adulta de estos individuos (Francis *et al.* 1999a; Ladd *et al.* 2000; Meaney, 2001).

La función adecuada del eje HPA parece ser esencial para el bienestar de los organismos, por lo que la desregulación del eje puede resultar en consecuencias potencialmente deletéreas tales como la reactividad alterada al estrés y una capacidad deficiente para enfrentar situaciones estresantes. De hecho las evidencias sugieren que las alteraciones múltiples en el estado de ánimo incluyendo los estados de ansiedad y la depresión endógena están asociadas con alteraciones crónicas en los niveles circulantes y en los ritmos circadianos de los glucocorticoides adrenales y puntualizan la importancia de los receptores a los corticoides (mineralocorticoides y glucocorticoides) en el control de la reactividad emocional (Akil, 2005; de Kloet, 2003; de Kloet and Oitzl, 2003; Rozeboom *et al.* 2007).

Los cuidados maternos parecen ser cruciales para la regulación del desarrollo del eje HPA. En particular, se ha mostrado que la PCM induce alteraciones tanto de corto, como de largo plazo en la reactividad del sistema de estrés (Lehmann *et al.* 2002; Levine *et al.* 1991; Schmidt *et al.* 2002) tanto en ratas como en ratones en los que se observaron incrementos de corta duración en los niveles basales circulantes de la ACTH después de la exposición a la PCM (Rots *et al.* 1996; Schmidt *et al.* 2004; van Oers *et al.* 1998a; Workel *et al.* 2001). Además estos sujetos se caracterizan por mostrar una respuesta alterada a diversos estímulos estresantes

(Suchecki and Tufik, 1997; van Oers *et al.* 1998b; Workel *et al.* 2001). Es también característico, en la edad adulta, en estos sujetos el manifestar cambios sostenidos en los transcritos a los glucocorticoides tanto en el hipocampo como en el núcleo paraventricular del hipotálamo

Además, se sabe que los glucocorticoides endógenos regulan las concentraciones de receptores a canabinoides en el cerebro, dando origen a una asociación PCM y el SeC (Finn, 2010; Mailleux and Vanderhaeghen, 1993). A su vez, la señalización del sistema canabinoide modula la actividad del HPA y cuando se presenta una disminución de su tono modulador se induce una respuesta hormonal adrenal al estrés. Igualmente, cuando se bloquea el receptor CB1 se muestra un incremento de la ACTH y de la liberación de corticosterona, así como un incremento en la activación neuronal del núcleo paraventricular hipotalámico que indican una mayor función del HPA (Riebe and Wotjak, 2011).

Aun cuando en este trabajo no se determinó si las sujetos sometidos a PCM tienen alteraciones en el eje HPA, se postula que la modificación encontrada en el ciclo-sueño vigilia, pudiera resultar de la participación del sistema adrenal o del SeC ya que ambos participan de forma determinante en los procesos de regulación del sueño como ya ha pues sido ampliamente descrito (Bouyer *et al.* 1998; Papale *et al.* 2005; Pawlyk *et al.* 2008), así, es probable que los individuos sometidos a PCM, muestren alteraciones significativas en uno u otro e inclusive en ambos sistemas neuroquímicos (Finn, 2010; Marco *et al.* 2009; Riebe and Wotjak, 2011).

Los resultados de la presente investigación muestran que la PCM en edades tempranas de la vida induce cambios significativos en el sueño, además de alteraciones estructurales en el SeC.

Los animales sometidos a PCM durante 15 días mostraron un incremento en el tiempo de vigilia, principalmente, a expensas de una reducción en el sueño MOR y en menor intensidad en el sueño de onda lenta (SOL). Aunque el efecto fue más significativo en las primeras 12 horas (fase de luz), éste se observó en las 24 horas del registro EEG. Las diferencias entre ambos tipos de fenómenos de sueño, pueden deberse a la estructura funcional y neuroquímica que modula ambos fenómenos. Se ha descrito que la generación de la fase MOR de sueño requiere de la activación colinérgica proveniente de varios núcleos del tallo cerebral y de la activación de la corteza a través del tálamo y el cerebro anterior basal (Datta, 1995; Maquet *et al.* 1996). Mientras que el SOL depende de la actividad del hipotálamo anterior, principalmente del área preóptica ventrolateral y que además utiliza los neurotransmisores GABA y Galanina para inhibir a las regiones que promueven la vigilia (Friedman *et al.* 2006; Maquet *et al.* 1997).

Durante el sueño los sujetos adultos presentan cambios en las concentraciones de las hormonas adrenales. Desde un punto de vista fisiológico, la primera fase de sueño, la cual se caracteriza por la presencia de SOL, se asocia con una reducción significativa de la actividad del eje HPA; mientras que en la fase más tardía de sueño es característico encontrar un incremento importante de la actividad del eje HPA (Machado *et al.* 2010; Vgontzas and Chrousos, 2002). Sin embargo, cuando las concentraciones de las hormonas adrenales se encuentran aumentados por efecto del estrés, entonces consistentemente se observa un decremento en el sueño MOR y

en el SOL (Basta *et al.* 2007; Clow *et al.* 2010; Lattova *et al.* 2011), tal como el encontrado en el presente estudio (Grafica 5, 6 y 7).

El principal efecto descrito en el presente trabajo, muestra que la aplicación de OLE revierte el efecto provocado por la PCM. Este efecto se observa consistentemente en todos los grupos tratados con el endocanabinoide, ya sea cuando se administra sólo o en algunos casos cuando se combina con el AM-251 (Gráfica 8 y 9). El efecto de OLE fue más significativo sobre el sueño MOR que sobre el SOL (Gráfica 5) y mayormente expresado en la fase de luz. Este efecto ha sido descrito (Herrera-Solis *et al.* 2010) en ratas adultas no sometidas a PCM, aunque autores como Mendelson y Basile (2001) han encontrado que el principal efecto de este endocanabinoide es sobre el sueño SOL (Mendelson and Basile, 2001).

Los hallazgos del presente estudio, podrían sugerir que la OLE revierte el efecto de la PCM por restaurar la función del SeC. Esto implicaría que el efecto de esta maniobra experimental, al modificar la reactividad al estrés del individuo, afectaría también el estado basal de los endocannabinoides. Esta sugerencia también es apoyada por el hallazgo de que la aplicación del antagonista del receptor CB1 (AM-251) incrementa los efectos de la PCM sobre el sueño (Grafica 7 y 9).

La OLE, considerada un canabinoide endógeno induce sueño tanto en animales privado como no privados de sueño (Basile *et al.* 1999; Boger *et al.* 1998a), por lo que su papel sobre la inducción y mantenimiento del mismo está ampliamente documentada. Sin embargo, el efecto observado en los sujetos que fueron sometidos a PCM fue diferente al encontrado en los sujetos

que no fueron sometidos a PCM (controles). En este último caso hay una tendencia a incrementar el sueño MOR y prácticamente no hay efecto sobre el SOL. Posiblemente porque la dosis utilizada puede haber sido baja para los sujetos control. Esto sugiere que las condiciones basales del SeC, es diferente en los sujetos sometidos a PCM que en los sujetos que no la padecieron. Esto contrasta con los efectos del antagonista a cannabinoides como es el caso del AM-251, el cual ejerció un efecto muy similar en los sujetos que padecieron la PCM como en aquellos que no fueron sometidos, es decir, disminuyó tanto el sueño MOR como el SOL en ambos grupos, de manera más importante afectando el MOR. Más adelante se discute el posible motivo del por qué existe este efecto diferencial. Aun con este contraste, también es necesario mencionar que los sujetos sometidos a PCM mostraron mayores efectos al AM-251 y que este efecto se mantiene tanto en la fase de luz como de la oscuridad.

En cuanto a la microarquitectura del sueño, las únicas diferencias significativas encontradas fueron para los grupos a los que se les administró el antagonista canabinoide (AM-251) modificando la latencia de aparición para sueño MOR en el grupo sin PCM; esta latencia fue mayor cuando se comparó con los sujetos controles. También modificó la duración promedio del episodio para SOL en luz para ambos grupos sometidos a AM-25. Y por último, modificó el número de episodios (LUZ) y la duración promedio del episodio (LUZ y OSC) para sueño MOR. Implicando que el antagonista a CB1 por si solo tiene un efecto sobre la microarquitectura del sueño. Sería relevante destacar que respecto a estos parámetros evaluados, para ambos grupos administrados con AM-251 el efecto que produce es muy similar.

Cabe mencionar que para los grupos coctel también existieron algunas diferencias en cuanto a la microarquitectura del sueño, pero dichos resultados se argumentan en el siguiente párrafo, ya que son muchos los efectos encontrados tras la administración del coctel.

En el diseño experimental decidimos elaborar grupos que recibieran tanto el agonista como el antagonista canabinoide, esto, con la idea de observar un efecto similar al que mostrarán los sujetos experimentales controles ya que al estar bloqueado el CB1, la OLE no tendría efecto alguno. Sin embargo, estos grupos mostraron efectos que fueron similares a los mostrados por la aplicación de OLE y en ocasiones similares a los sujetos tratados con AM-251. Esta discrepancia puede deberse a las diferencias de la farmacocinética de ambas drogas, tales como velocidad de absorción, volumen de distribución, vida media del fármaco, etc. También una propuesta que debe ser considerada es que varios estudios han señalado que la OLE no es específica del CB1, sino que afecta a otros receptores (Boger *et al.* 1998b; Cheer *et al.* 1999; Soria-Gomez *et al.* 2010; Thomas *et al.* 1997; Thomas *et al.* 1999), por lo tanto, el efecto visto cuando se administra el coctel podría deberse a que la OLE está actuando sobre otros receptores que también participan en los mecanismos para la inducción del sueño.

Estos datos sugieren entonces que la maniobra experimental empleada en el presente estudio, i.e., la PCM, provoca cambios significativos en el SeC que podrían explicar parte de las alteraciones conductuales que muestran los sujetos adultos que padecieron la PCM en las primeras etapas de la vida. Sería interesante el estudiar los efectos de estos endocannabinoides sobre otras de las alteraciones fisiológicas y conductuales que muestran estos individuos, como la ingesta de alimentos o las alteraciones cardiovasculares, entre otras funciones que son

moduladas por estas sustancias (Akanmu *et al.* 2007; Fernandez-Ruiz *et al.* 2002; Romero *et al.* 2002; Walker *et al.* 1999).

También se pensó que si las alteraciones a largo plazo que provoca la PCM implican cambios en la sensibilidad del SeC sería de esperarse que existieran alteraciones en la actividad de los mismos. Tales cambios podrían ser estructurales y manifestarse por ejemplo en la movilización de neurotransmisores o en las concentraciones de receptores que se asocian a los mismos. Con esta idea en mente se decidió determinar si este modelo experimental modificaba las concentraciones de receptores CB1.

Se exploraron 3 regiones cerebrales que son fundamentales en los procesos de reforzamiento positivo del individuo, lo cual forma parte del sustrato anatómico de muchas funciones cerebrales y dentro de la cuales podríamos considerar el sueño. Las estructuras analizadas fueron; el núcleo accumbens, la corteza prefrontal y el hipocampo, debido a que estas estructuras muestran mayor concentración de receptores a cannabinoides tipo 1 (Martinez-Vargas *et al.* 2003)

El HIP es una estructura con altas concentraciones de CB1 (Pettit *et al.* 1998) y la modulación de este sistema es crucial para su actividad (Piomelli, 2003) . En relación al sueño la actividad hipocampal genera el ritmo theta (Brankack *et al.* 2009), y la administración de cannabinoides directamente sobre el HIP aumenta el sueño MOR (Rueda-Orozco *et al.* 2010). Por otro lado, las neuronas del NAc son activadas durante el despertar y el sueño MOR y desactivadas durante el SOL (Braun *et al.* 1997; Nofzinger *et al.* 1997). A su vez, la generación

de un EEG de ondas lentas de amplitud grande se inicia en la CPF y se extiende hacia otras áreas corticales (Massimini *et al.* 2004). Se ha determinado que en humanos existe una función de la CPF alterada, tras la pérdida de sueño (Killgore, 2010). Esta CPF se comunica con el hipocampo durante el SOL, particularmente a través de oscilaciones lentas que se supone ejercen una influencia moduladora sobre la actividad del HIP durante la consolidación de la memoria (Marshall and Born, 2007).

Estos estudios sugieren la importancia de estas estructuras durante el sueño y su alteración puede explicar los cambios que en esta función presentan los sujetos sometidos a la PCM.

Los resultados que aquí se presentan, mostraron en los animales sometidos a PCM, niveles reducidos (55%) del CB1 en la CPF y HIP (60%) en contraste con el NAc el cual mostró un incremento del 100% de estos receptores, cuando se compararon con sujetos controles. Estos datos sugieren que dentro de estas estructuras existen cambios en el SeC, los que probablemente inducen las alteraciones provocadas por la PCM sobre el sueño ya que la administración de endocannabinoides revierte este efecto y la aplicación de antagonistas incrementa el efecto.

Los resultados del WB, nos indican cambios significativos en la concentración del receptor CB1, en las 3 estructuras estudiadas, sin embargo, es difícil hacer una correlación de la concentración del receptor con el efecto observado en estos sujetos. En otras palabras, si la concentración del receptor se incrementa o disminuye, ¿Cómo conciliarlo con un cambio en la presencia de sueño MOR o de SOL? El solo cambio de concentración, sin conocer otros datos

de la cinética del sistema, como la sensibilidad del receptor, la concentración final del agonista, la concentración de mensajeros intracelulares, etc. hace difícil la interpretación en este sentido.

Sin embargo, en un contexto general, los datos aquí presentados muestran que el modelo experimental de PCM, induce efectos a largo plazo en el SeC que se manifiestan en la arquitectura del sueño con un decremento del sueño MOR y del SOL. Que la aplicación de los correspondientes agonistas a receptores canabinoides revierten este efecto y la de los antagonistas incrementan esta alteración. Además de que los cambios a largo plazo inducidos por la PCM involucran a estructuras como la CPF, el HIP y el NAc, donde se presentan alteraciones en la concentración de receptores a estos sistemas.

En resumen, el presente estudio muestra la importancia del SeC en la modulación del sueño y su participación en los procesos plásticos del cerebro que son modulados por los factores ambientales a los que son sometidos los individuos en edad temprana.

## 6. CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio sugieren que la privación de cuidado maternal (PCM) provoca alteraciones en el ciclo sueño- vigilia. Estas alteraciones son a largo plazo ya que se mantienen al menos hasta la vida adulta.

Aun no se sabe qué del modelo de PCM es lo que ocasiona dichas alteraciones, sin embargo, los datos señalan un cambio en el SeC, que ya sabemos, juega una función importante en dicho ciclo. Si dicho cambio en el SeC no es único, al menos forma parte del circuito que modula el ciclo sueño-vigilia

Los resultados indican que existe una modificación de la expresión del CB1 en la corteza prefrontal, el hipocampo y el núcleo accumbens tras la exposición a la privación de cuidado maternal, lo que podría involucrar no solo cambios en el ciclo sueño-vigilia, sino también modificaciones fisiológicas en las que el Sec juegue una función importante.

Así mismo, los datos invitan a considerar que la activación del sistema canabinoide, a nivel farmacológico, en particular por la Oleamida, puede jugar un papel fundamental en la recuperación de patrones normales del ciclo sueño-vigilia.

## 7. ANEXO 1: Técnica detallada del Western Blot

El WB es una técnica que nos permite determinar cómo se encuentra la expresión de una proteína, en este caso, del CB1 en los tejidos analizados. El WB utiliza un principio químico llamado electroforesis. La electroforesis es un método analítico-semipreparativo, en el que se separan biomoléculas, en dependencia de su carga y bajo la acción de un campo eléctrico, fue empleado por primera vez por Tiselius en el año de 1937. En la electroforesis la migración hacia el cátodo o ánodo de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico depende de a una combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional.

### Obtención de la muestra/ extracción de estructuras

Una vez que las ratas llegaron a un peso de 250-350 g, en lugar de ser sometidas a la cirugía para implante de registro EEG, se sacrificaron para la obtención de tejidos de la CPF, el NAc y el HIP. Se extrajo el cerebro de la rata y colocado en una plataforma horizontal e hidratando constantemente el tejido con solución salina, se realizaron los cortes necesarios para la obtención de dichas estructuras. Los tejidos de las diversas estructuras se colocaron en alícuotas de 1 ml con buffer (pH=7.2) para la extracción de proteínas. En ese mismo instante fueron homogenizadas y se les congeló (-40° C) hasta que fueran a ser utilizadas.

Fármacos:

- Buffer para extracción de proteínas
- 250 mM de sucrosa
- 1mM EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). (*Bio-Rad, Hercules, CA*).

- Buffer 10 mM Tris•HCl [pH 7.6], (tris(hidroximetil)aminometano). Se utiliza en particular para preparar disoluciones tampón (que mantienen un equilibrio ácido-base) por lo tanto, mantiene estable el pH.
- 10mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo, PMSF por sus siglas en inglés). (*Bio-Rad, Hercules, CA*). Es un inhibidor de proteasas de serina que preserva a las proteínas celulares de su digestión por proteasas.
- Coctel inhibidor completo de proteasa mini [1 tableta/ 50 ml]). (*Roche Diagnostics, Rotkreuz,Switzerland*).

#### Cuantificación de proteínas por método de Lowry

Para la cuantificación de proteínas se requirió una curva de calibración a base de albumina y el método de Lowry. Éste, implica un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. Es decir, a la muestra se añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas. Para la obtención de la curva estándar se utilizó la Albumina en 10 ml de solución salina. Se prepararon 5 tubos, uno con cierta cantidad de albumina, para hacer cinco puntos de la curva.

Cuando se tuvieron las cantidades necesarias de albumina, éstas y las muestras de tejido se colocaron en una placa con pequeños pozos (placa de Elisa) para su cuantificación. Con la ayuda de un software se pudo hacer la cuantificación de todas las muestras utilizadas para el WB.

Fármacos:

- Ensayo a proteína Bio-Rad DC (*Bio-Rad, Hercules, CA*).

### Geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Los geles fueron hechos con un equipo especial para WB comprado en *Bio-Rad*, y con reacciones específicas de polimerización de la acrilamida. Se requirió de soportes especiales que sostienen los vidrios de grosores específicos donde se hicieron los geles. Así procurando evitar fugas entre los vidrios, se juntaron los compuestos necesarios (TRIS, Acrilamida, Glicina, TEMED y persulfato de amonio) para la polimerización de dichos geles. Una vez que los geles solidificaron los colocamos en la cámara de electroforesis con buffer TBS-T para evitar que los geles se deshidratarán.

Fármacos:

- Tris (tris (hidroximetil) aminometano).
- Glicina (ácido aminoacético); es utilizado como fuente de iones de arrastre.
- Acrilamida (*Bio-Rad, Hercules, CA*). en presencia de un sistema generador de radicales libres, los monómeros de acrilamida se activan para formar polímeros de cadena larga.
- Bisacrilamida (*Bio-Rad, Hercules, CA*). polimeriza conjuntamente con la acrilamida pero establece puentes entre las cadenas lineales de poliacrilamida, y así evita el deslizamiento de éstas y conduce a la formación del gel.
- Dodecilsulfato sódico (SDS). (*Bio-Rad, Hercules, CA*). Desnaturaliza proteínas en sus polipéptidos individuales.
- Persulfato amónico (APS). (*Bio-Rad, Hercules, CA*). Iniciador de la reacción de polimerización que finalmente forma el gel.

- TEMED, acrónimo de (N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina). (*Bio-Rad, Hercules, CA*). Se trata de otro iniciador (propagador) de la polimerización para la formación del gel.

### Preparación de la muestra para cargado en el Gel SDS-PAGE

Con los geles ya preparados, las muestras de tejido se prepararon para ser colocadas en los carriles de cada gel. Cada uno de los geles llevó 2 marcadores de peso molecular en sus extremos (*Bio-Rad, Hercules, CA*) y 8 muestras de tejido. Cada gel llevó muestras de una sola estructura. La muestra se prepara con el Buffer de Leam (*Bio-Rad, Hercules, CA*), 2-Mercaptoethanol (*Bio-Rad, Hercules, CA*) y DDT (*Bio-Rad, Hercules, CA*). Esta mezcla permitió la desnaturalización de las proteínas para que éstas se alinearan y se separaran dependiendo de su peso molecular. Se utilizó esta mezcla con el mismo volumen que el de la muestra tomada.

Fármacos:

- Marcador de peso molecular (*Bio-Rad, Hercules, CA*). (Marcadores preteñidos Precision Plus Protein™ Standards)
- Para desnaturalizar las proteínas:
- Buffer de Leam (*Bio-Rad, Hercules, CA*).
- 2-Mercaptoethanol (*Bio-Rad, Hercules, CA*). Algunas proteínas pueden ser desnaturalizadas por 2-mercaptoetanol por medio de su habilidad para separar puentes disulfuro.
- DDT (*Bio-Rad, Hercules, CA*).

### Electroforesis

La electroforesis se llevó a cabo en una cámara especial para este proceso. Esta cámara se conecta a una fuente de poder que estando a 100 V durante 100 min permitió que las proteínas migraran hacia abajo y se separaran por su peso molecular.

Fármacos:

- Buffer TBS-T. (Buffer Tris Salino).
- Tween 20 (*Sigma-Aldrich Química, S.A. de C.V.*).

### Transferencia de Gel a membrana PVDF (Millipore)

Una vez terminado el proceso de electroforesis y con las membranas PVDF (*Immobilon-P, Millipore, Billerica, MA, EEUU*) ya cortadas (5x8 cm) y humedecidas en metanol, los geles se sacaron de los vidrios y se colocaron cuidadosamente entre la membrana y un papel filtro (paper Blot) bañado en Buffer de Towbin para evitar que las membranas se secan. Estando ya los geles entre las membranas y el paper Blot se colocaron en el Transblot (equipo especial para la transferencia) que fue utilizado con 10 V durante 40 min.

Fármacos:

- Metanol (*Sigma-Aldrich Química, S.A. de C.V.*).
- Buffer de Towbin.

### Bloqueo y anticuerpos de membrana

Cuando la transferencia terminó, las membranas con las proteínas transferidas se procesaron seguidamente enjuagándolas con TBS-T. Luego de enjuagarlas con TBS-T se realizó

el bloqueo de las membranas con disolución de bloqueo en leche (Blotting Grade Blocker (Non-fat Dry Milk) (*Bio-Rad, Hercules, CA.*) durante 120 min y a temperatura ambiente. Después de los 120 min en leche, las membranas se colocaron en pequeños recipientes con TBS-T haciendo tres lavados de diez min cada uno con agitación continua. Así, quitamos el exceso de leche de las membranas.

Tras los 3 lavados, las membranas se incubaron con la disolución requerida del anticuerpo primario, permitiendo transcurrir 2 hrs de incubación en un horno a temperatura de 25°C. Este anticuerpo es específico para el CB1, es decir, reconoce la proteína específica y si ésta se encuentra en la membrana, entonces la reconocerá. Pasadas las dos HRS se hicieron otros tres lavados con TBS-T de 10 min cada uno y luego se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario durante dos horas a temperatura ambiente. Este anticuerpo se unirá al anticuerpo primario y será el que tendrá una reacción luminiscente para ver si la proteína de CB1 está en dicha membrana. Finalmente se hicieron tres lavados más con TBS-T y se continuó con el revelado.

Fármacos:

- Blotting Grade Blocker (Non-fat Dry Milk) (*Bio-Rad, Hercules, CA.*)
- Buffer TBS-T. (Buffer Tris Salino con Tween-20).
- Tween 20. (*Sigma-Aldrich Química, S.A. de C.V.*).
- Anticuerpo primario; de conejo para anti CB1 (1:500, Cayman)
- Anticuerpo secundario; de burro anticonejo IgG acoplado a peroxidasa de rábano (1:10,000; *Santa Cruz Biotechnology.*)

### Revelado 1

Para el revelado se utilizó el principio de electroquimioluminiscencia (ELC) que es un proceso muy sensible en el que se generan especies reactivas y luego vuelven al estado basal mediante una reacción quimioluminiscente, es decir, que emite luz. Así, utilizando agentes de detección (Amersham Biosciences), las membranas fueron sometidas a dos sustancias que permitieron una reacción quimioluminiscente y al ser puestas en un cuarto oscuro y expuestas a películas autoradiográficas por 1 min las bandas de proteínas de CB1 fueron plasmadas en dichas placas, permitiendo así cuantificar su expresión mediante un software que mide la densidad óptica de cada proteína expuesta.

Fármacos:

- Agentes de detección (*Amersham Biosciences*).
- Revelador (*Kodak*).
- Fijador (*Kodak*).

### Stripping

Con la finalidad de tener un control de referencia y de cargado, se midieron las actinas. Lo que se hizo fue; después del revelado, las membranas se sometieron a un proceso llamado stripping, en el que se eliminan los reactivos quimioluminiscentes y los anticuerpos, en este caso para CB1. Se le realiza el stripping de esta membrana sumergiéndola en 25 ml de buffer y calentándola a 50° C durante media hora con agitación gentil cada 10 minutos.

Fármacos:

- Tris (tris (hidroximetil) aminometano).

- 2-Mercaptoetanol (*Bio-Rad, Hercules, CA*).
- 2% Dodecilsulfato sódico (SDS). (*Bio-Rad, Hercules, CA*). Desnaturaliza proteínas en sus polipéptidos individuales.

### Control de cargado /Anticuerpos contra Actina

Una vez transcurrido ese tiempo. Se realizan tres lavados de 10 min con TBS-T, para quitar el exceso de buffer. Inmediatamente después se incuba la membrana con el anticuerpo primario anti-actina durante 90 min y después se hacen nuevamente tres lavados de 10 minutos con TBS-T. En esta ocasión, el anticuerpo reconoce solamente a las actinas. Posteriormente se incuba la membrana con el anticuerpo secundario acoplado a una peroxidasa de rábano durante 90 min y finalmente se lavan con TBS-T para entonces volver a hacer el procedimiento de con quimioluminiscencia.

Fármacos:

- TBS-T (Buffer Tris Salino con Tween-20)
- Tween 20 (*Sigma-Aldrich Química, S.A. de C.V.*).
- Anticuerpo primario: Actina (1-19) R (*Santa Cruz Biotechnology*).
- Anticuerpo secundario: de burro anticonejo IgG acoplado a peroxidasa de rábano (*Santa Cruz Biotechnology*).

### Revelado 2

Con las membranas listas con el anticuerpo anti-actina se repite el procedimiento de revelado para obtener ahora las actinas expresadas.

## Reference List

- Adrien, J., Dugovic, C. & Martin, P. (1991). *Sleep-wakefulness patterns in the helpless rat. Physiol Behav.* 49, 257-262.
- Advani, T., Hensler, J. G. & Koek, W. (2007). *Effect of early rearing conditions on alcohol drinking and 5-HT1A receptor function in C57BL/6J mice. Int. J. Neuropsychopharmacol.* 10, 595-607.
- Aisa, B., Elizalde, N., Tordera, R., Lasheras, B., Del, R. J. & Ramirez, M. J. (2009a). *Effects of neonatal stress on markers of synaptic plasticity in the hippocampus: implications for spatial memory. Hippocampus* 19, 1222-1231.
- Aisa, B., Gil-Bea, F. J., Marcos, B., Tordera, R., Lasheras, B., Del, R. J. & Ramirez, M. J. (2009b). *Neonatal stress affects vulnerability of cholinergic neurons and cognition in the rat: involvement of the HPA axis. Psychoneuroendocrinology* 34, 1495-1505.
- Aisa, B., Tordera, R., Lasheras, B., Del, R. J. & Ramirez, M. J. (2007). *Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. Psychoneuroendocrinology* 32, 256-266.
- Akanmu, M. A., Adeosun, S. O. & Ilesanmi, O. R. (2007). *Neuropharmacological effects of oleamide in male and female mice. Behav. Brain Res.* 182, 88-94.
- Akil, H. (2005). *Stressed and depressed. Nat. Med.* 11, 116-118.
- Anisman, H., Zaharia, M. D., Meaney, M. J. & Merali, Z. (1998). *Do early-life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors? Int. J. Dev. Neurosci.* 16, 149-164.
- Bagot, R. C., van Hasselt, F. N., Champagne, D. L., Meaney, M. J., Krugers, H. J. & Joels, M. (2009). *Maternal care determines rapid effects of stress mediators on synaptic plasticity in adult rat hippocampal dentate gyrus. Neurobiol. Learn. Mem.* 92, 292-300.
- Barreau, F., Cartier, C., Leveque, M., Ferrier, L., Moriez, R., Laroute, V., Rosztoczy, A., Fioramonti, J. & Bueno, L. (2007). *Pathways involved in gut mucosal barrier dysfunction induced in adult rats by maternal deprivation: corticotrophin-releasing factor and nerve growth factor interplay. J. Physiol* 580, 347-356.
- Barreau, F., Ferrier, L., Fioramonti, J. & Bueno, L. (2004). *Neonatal maternal deprivation triggers long term alterations in colonic epithelial barrier and mucosal immunity in rats. Gut* 53, 501-506.
- Basile, A. S., Hanus, L. & Mendelson, W. B. (1999). *Characterization of the hypnotic properties of oleamide. Neuroreport* 10, 947-951.

- Basta, M., Chrousos, G. P., Vela-Bueno, A. & Vgontzas, A. N. (2007). CHRONIC INSOMNIA AND STRESS SYSTEM. *Sleep Med. Clin.* 2, 279-291.**
- Biagini, G., Pich, E. M., Carani, C., Marrama, P. & Agnati, L. F. (1998). Postnatal maternal separation during the stress hyporesponsive period enhances the adrenocortical response to novelty in adult rats by affecting feedback regulation in the CA1 hippocampal field. *Int. J. Dev. Neurosci.* 16, 187-197.**
- Bisogno, T., Ligresti, A. & Di, M., V (2005). The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 81, 224-238.**
- Boger, D. L., Henriksen, S. J. & Cravatt, B. F. (1998a). Oleamide: an endogenous sleep-inducing lipid and prototypical member of a new class of biological signaling molecules. *Curr. Pharm. Des* 4, 303-314.**
- Boger, D. L., Patterson, J. E. & Jin, Q. (1998b). Structural requirements for 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>1A</sub> serotonin receptor potentiation by the biologically active lipid oleamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 4102-4107.**
- Bonhaus, D. W., Chang, L. K., Kwan, J. & Martin, G. R. (1998). Dual activation and inhibition of adenylyl cyclase by cannabinoid receptor agonists: evidence for agonist-specific trafficking of intracellular responses. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 287, 884-888.**
- Bonnet, C., Leger, L., Baubet, V., Debilly, G. & Cespuglio, R. (1997). Influence of a 1 h immobilization stress on sleep states and corticotropin-like intermediate lobe peptide (CLIP or ACTH<sub>18-39</sub>, Ph-ACTH<sub>18-39</sub>) brain contents in the rat. *Brain Res.* 751, 54-63.**
- Born, J. & Fehm, H. L. (1998). Hypothalamus-pituitary-adrenal activity during human sleep: a coordinating role for the limbic hippocampal system. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 106, 153-163.**
- Born, J., Zwick, A., Roth, G., Fehm-Wolfsdorf, G. & Fehm, H. L. (1987). Differential effects of hydrocortisone, fluocortolone, and aldosterone on nocturnal sleep in humans. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 116, 129-137.**
- Bouyer, J. J., Vallee, M., Deminiere, J. M., Le, M. M. & Mayo, W. (1998). Reaction of sleep-wakefulness cycle to stress is related to differences in hypothalamo-pituitary-adrenal axis reactivity in rat. *Brain Res.* 804, 114-124.**
- Brankack, J., Platt, B. & Riedel, G. (2009). Sleep and hippocampus: do we search for the right things? *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 33, 806-812.**
- Braun, A. R., Balkin, T. J., Wesenten, N. J., Carson, R. E., Varga, M., Baldwin, P., Selbie, S., Belenky, G. & Herscovitch, P. (1997). Regional cerebral blood flow throughout the sleep-wake cycle. An H<sub>2</sub>(<sup>15</sup>O) PET study. *Brain* 120 ( Pt 7), 1173-1197.**

- Bremne, J. D. & Vermetten, E. (2001a). Stress and development: behavioral and biological consequences. Dev. Psychopathol. 13, 473-489.*
- Bremne, J. D. & Vermetten, E. (2001b). Stress and development: behavioral and biological consequences. Dev. Psychopathol. 13, 473-489.*
- Burstein, S., Budrow, J., Debatis, M., Hunter, S. A. & Subramanian, A. (1994). Phospholipase participation in cannabinoid-induced release of free arachidonic acid. Biochem. Pharmacol. 48, 1253-1264.*
- Caldji, C., Diorio, J. & Meaney, M. J. (2000). Variations in maternal care in infancy regulate the development of stress reactivity. Biol. Psychiatry 48, 1164-1174.*
- Caldji, C., Diorio, J. & Meaney, M. J. (2003). Variations in maternal care alter GABA(A) receptor subunit expression in brain regions associated with fear. Neuropsychopharmacology 28, 1950-1959.*
- Caldji, C., Tannenbaum, B., Sharma, S., Francis, D., Plotsky, P. M. & Meaney, M. J. (1998). Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 95, 5335-5340.*
- Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, T. E., Taylor, A., Craig, I. W., Harrington, H., McClay, J., Mill, J., Martin, J., Braithwaite, A. & Poulton, R. (2003). Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. Science 301, 386-389.*
- Champagne, D. L., Bagot, R. C., van, H. F., Ramakers, G., Meaney, M. J., de Kloet, E. R., Joels, M. & Krugers, H. (2008). Maternal care and hippocampal plasticity: evidence for experience-dependent structural plasticity, altered synaptic functioning, and differential responsiveness to glucocorticoids and stress. J. Neurosci. 28, 6037-6045.*
- Champagne, F. A. & Meaney, M. J. (2006). Stress during gestation alters postpartum maternal care and the development of the offspring in a rodent model. Biol. Psychiatry 59, 1227-1235.*
- Charmandari, E., Tsigos, C. & Chrousos, G. (2005). Endocrinology of the stress response. Annu. Rev. Physiol 67, 259-284.*
- Cheer, J. F., Cadogan, A. K., Marsden, C. A., Fone, K. C. & Kendall, D. A. (1999). Modification of 5-HT2 receptor mediated behaviour in the rat by oleamide and the role of cannabinoid receptors. Neuropharmacology 38, 533-541.*
- Childers, S. R. & Deadwyler, S. A. (1996). Role of cyclic AMP in the actions of cannabinoid receptors. Biochem. Pharmacol. 52, 819-827.*
- Chrousos, G. P. (2007). Organization and Integration of the Endocrine System. Sleep Med. Clin. 2, 125-145.*

- Chrousos, G. P. (2009). *Stress and disorders of the stress system. Nat. Rev. Endocrinol.* 5, 374-381.
- Chrousos, G. P. & Gold, P. W. (1992). *The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. JAMA* 267, 1244-1252.
- Clow, A., Hucklebridge, F., Stalder, T., Evans, P. & Thorn, L. (2010). *The cortisol awakening response: more than a measure of HPA axis function. Neurosci. Biobehav. Rev.* 35, 97-103.
- Cohen, H., Shane, M. D. & Dement, W. C. (1970). *Sleep and REM deprivation in the rat: effect of dexamethasone, a preliminary study. Biol. Psychiatry* 2, 401-403.
- Colorado, R. A., Shumake, J., Conejo, N. M., Gonzalez-Pardo, H. & Gonzalez-Lima, F. (2006). *Effects of maternal separation, early handling, and standard facility rearing on orienting and impulsive behavior of adolescent rats. Behav. Processes* 71, 51-58.
- Condie, R., Herring, A., Koh, W. S., Lee, M. & Kaminski, N. E. (1996). *Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase-mediated signal transduction and interleukin 2 (IL-2) expression in the murine T-cell line, EL4.IL-2. J. Biol. Chem.* 271, 13175-13183.
- Coplan, J. D., Andrews, M. W., Rosenblum, L. A., Owens, M. J., Friedman, S., Gorman, J. M. & Nemeroff, C. B. (1996). *Persistent elevations of cerebrospinal fluid concentrations of corticotropin-releasing factor in adult nonhuman primates exposed to early-life stressors: implications for the pathophysiology of mood and anxiety disorders. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 1619-1623.
- Cravatt, B. F., Giang, D. K., Mayfield, S. P., Boger, D. L., Lerner, R. A. & Gilula, N. B. (1996). *Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. Nature* 384, 83-87.
- Cravatt, B. F. & Lichtman, A. H. (2002). *The enzymatic inactivation of the fatty acid amide class of signaling lipids. Chem. Phys. Lipids* 121, 135-148.
- Cravatt, B. F., Prospero-Garcia, O., Siuzdak, G., Gilula, N. B., Henriksen, S. J., Boger, D. L. & Lerner, R. A. (1995). *Chemical characterization of a family of brain lipids that induce sleep. Science* 268, 1506-1509.
- Daniels, W. M., Pietersen, C. Y., Carstens, M. E. & Stein, D. J. (2004). *Maternal separation in rats leads to anxiety-like behavior and a blunted ACTH response and altered neurotransmitter levels in response to a subsequent stressor. Metab Brain Dis.* 19, 3-14.
- Datta, S. (1995). *Neuronal activity in the peribrachial area: relationship to behavioral state control. Neurosci. Biobehav. Rev.* 19, 67-84.
- de Kloet, E. R. (2003). *Hormones, brain and stress. Endocr. Regul.* 37, 51-68.

- de Kloet, E. R. & Oitzl, M. S. (2003). Who cares for a stressed brain? The mother, the kid or both? Neurobiol. Aging 24 Suppl 1, S61-S65.*
- De, P. L., Deva, R., Mainieri, F., Schaefer, M., Bisogno, T., Ciccoli, R., Ligresti, A., Hill, K., Nigam, S., Appendino, G. & Di, M., V (2009). Chemical synthesis, pharmacological characterization, and possible formation in unicellular fungi of 3-hydroxy-anandamide. J. Lipid Res. 50, 658-666.*
- De, P. L. & Di, M., V (2009). An introduction to the endocannabinoid system: from the early to the latest concepts. Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab 23, 1-15.*
- Devane, W. A., Dysarz, F. A., III, Johnson, M. R., Melvin, L. S. & Howlett, A. C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. Mol. Pharmacol. 34, 605-613.*
- Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A. & Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. Science 258, 1946-1949.*
- Di, M., V, Bisogno, T., Melck, D., Ross, R., Brockie, H., Stevenson, L., Pertwee, R. & De, P. L. (1998). Interactions between synthetic vanilloids and the endogenous cannabinoid system. FEBS Lett. 436, 449-454.*
- Di, M., V & Fontana, A. (1995). Anandamide, an endogenous cannabinomimetic eicosanoid: 'killing two birds with one stone'. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 53, 1-11.*
- Di, M., V, Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J. C. & Piomelli, D. (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. Nature 372, 686-691.*
- Dinh, T. P., Carpenter, D., Leslie, F. M., Freund, T. F., Katona, I., Sensi, S. L., Kathuria, S. & Piomelli, D. (2002). Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 99, 10819-10824.*
- Dozier, M. & Peloso, E. (2006). The role of early stressors in child health and mental health outcomes. Arch. Pediatr. Adolesc. Med. 160, 1300-1301.*
- Dumont, F. S. & Kinkead, R. (2010). Neonatal stress and attenuation of the hypercapnic ventilatory response in adult male rats: the role of carotid chemoreceptors and baroreceptors. Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol 299, R1279-R1289.*
- Ehlers, C. L., Reed, T. K. & Henriksen, S. J. (1986). Effects of corticotropin-releasing factor and growth hormone-releasing factor on sleep and activity in rats. Neuroendocrinology 42, 467-474.*

- Fehm, H. L., Benkowitz, R., Kern, W., Fehm-Wolfsdorf, G., Pauschinger, P. & Born, J. (1986). Influences of corticosteroids, dexamethasone and hydrocortisone on sleep in humans. Neuropsychobiology 16, 198-204.*
- Feng, P., Hu, Y., Vurbic, D. & Guo, Y. (2011). Maternal stress induces adult reduced REM sleep and melatonin level. Dev. Neurobiol.*
- Feng, P., Liu, X., Vurbic, D., Fan, H. & Wang, S. (2007a). Neonatal REM sleep is regulated by corticotropin releasing factor. Behav. Brain Res. 182, 95-102.*
- Feng, P., Vurbic, D., Wu, Z. & Strohl, K. P. (2007b). Brain orexins and wake regulation in rats exposed to maternal deprivation. Brain Res. 1154, 163-172.*
- Fernandez-Ruiz, J., Berrendero, F., Hernandez, M. L. & Ramos, J. A. (2000). The endogenous cannabinoid system and brain development. Trends Neurosci. 23, 14-20.*
- Fernandez-Ruiz, J., Lastres-Becker, I., Cabranes, A., Gonzalez, S. & Ramos, J. A. (2002). Endocannabinoids and basal ganglia functionality. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 66, 257-267.*
- Fimiani, C., Liberty, T., Aquirre, A. J., Amin, I., Ali, N. & Stefano, G. B. (1999). Opiate, cannabinoid, and eicosanoid signaling converges on common intracellular pathways nitric oxide coupling. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 57, 23-34.*
- Finn, D. P. (2010). Endocannabinoid-mediated modulation of stress responses: physiological and pathophysiological significance. Immunobiology 215, 629-646.*
- Flanigan, W. F., Jr., Wilcox, R. H. & Rechtschaffen, A. (1973). The EEG and behavioral continuum of the crocodilian, Caiman sclerops. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. 34, 521-538.*
- Francis, D. D., Caldji, C., Champagne, F., Plotsky, P. M. & Meaney, M. J. (1999a). The role of corticotropin-releasing factor--norepinephrine systems in mediating the effects of early experience on the development of behavioral and endocrine responses to stress. Biol. Psychiatry 46, 1153-1166.*
- Francis, D. D., Champagne, F. A., Liu, D. & Meaney, M. J. (1999b). Maternal care, gene expression, and the development of individual differences in stress reactivity. Ann. N. Y. Acad. Sci. 896, 66-84.*
- Francis, D. D. & Meaney, M. J. (1999). Maternal care and the development of stress responses. Curr. Opin. Neurobiol. 9, 128-134.*
- Friedman, J. N., Hurley, R. A. & Taber, K. H. (2006). Bipolar disorder: imaging state versus trait. J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci. 18, 296-301.*

- Friess, E., Wiedemann, K., Steiger, A. & Holsboer, F. (1995). *The hypothalamic-pituitary-adrenocortical system and sleep in man. Adv. Neuroimmunol. 5, 111-125.*
- Fuller, P. M., Gooley, J. J. & Saper, C. B. (2006). *Neurobiology of the sleep-wake cycle: sleep architecture, circadian regulation, and regulatory feedback. J. Biol. Rhythms 21, 482-493.*
- Genest, S. E., Balon, N., Laforest, S., Drolet, G. & Kinkead, R. (2007). *Neonatal maternal separation and enhancement of the hypoxic ventilatory response in rat: the role of GABAergic modulation within the paraventricular nucleus of the hypothalamus. J. Physiol 583, 299-314.*
- Gomez del, P. T., Velasco, G. & Guzman, M. (2000). *The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt. Biochem. J. 347, 369-373.*
- Grotenhermen, F. (2003). *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. Clin. Pharmacokinet. 42, 327-360.*
- Grotenhermen, F. (2004). *Pharmacology of cannabinoids. Neuro. Endocrinol. Lett. 25, 14-23.*
- Grotenhermen, F. (2005). *Cannabinoids. Curr. Drug Targets. CNS. Neurol. Disord. 4, 507-530.*
- Gulemetova, R. & Kinkead, R. (2011). *Neonatal stress increases respiratory instability in rat pups. Respir. Physiol Neurobiol. 176, 103-109.*
- Gutman, D. A. & Nemeroff, C. B. (2002). *Neurobiology of early life stress: rodent studies. Semin. Clin. Neuropsychiatry 7, 89-95.*
- Guzman, M., Sanchez, C. & Galve-Roperh, I. (2001). *Control of the cell survival/death decision by cannabinoids. J. Mol. Med. (Berl) 78, 613-625.*
- Hagemann, C. & Blank, J. L. (2001). *The ups and downs of MEK kinase interactions. Cell Signal. 13, 863-875.*
- Hampson, A. J., Grimaldi, M., Axelrod, J. & Wink, D. (1998). *Cannabidiol and (-)-Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 95, 8268-8273.*
- Hampson, R. E. & Deadwyler, S. A. (1999). *Cannabinoids, hippocampal function and memory. Life Sci. 65, 715-723.*
- Hanus, L., Abu-Lafi, S., Fride, E., Breuer, A., Vogel, Z., Shalev, D. E., Kustanovich, I. & Mechoulam, R. (2001). *2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 98, 3662-3665.*

- Heim, C. & Nemeroff, C. B. (1999). *The impact of early adverse experiences on brain systems involved in the pathophysiology of anxiety and affective disorders.* *Biol. Psychiatry* 46, 1509-1522.
- Heim, C. & Nemeroff, C. B. (2001). *The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies.* *Biol. Psychiatry* 49, 1023-1039.
- Heim, C. & Nemeroff, C. B. (2002). *Neurobiology of early life stress: clinical studies.* *Semin. Clin. Neuropsychiatry* 7, 147-159.
- Heim, C., Newport, D. J., Heit, S., Graham, Y. P., Wilcox, M., Bonsall, R., Miller, A. H. & Nemeroff, C. B. (2000). *Pituitary-adrenal and autonomic responses to stress in women after sexual and physical abuse in childhood.* *JAMA* 284, 592-597.
- Heim, C., Newport, D. J., Wagner, D., Wilcox, M. M., Miller, A. H. & Nemeroff, C. B. (2002). *The role of early adverse experience and adulthood stress in the prediction of neuroendocrine stress reactivity in women: a multiple regression analysis.* *Depress. Anxiety.* 15, 117-125.
- Herrera-Solis, A., Vasquez, K. G. & Prospero-Garcia, O. (2010). *Acute and subchronic administration of anandamide or oleamide increases REM sleep in rats.* *Pharmacol. Biochem. Behav.* 95, 106-112.
- Hillard, C. J. (2000). *Endocannabinoids and vascular function.* *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294, 27-32.
- Hillard, C. J., Harris, R. A. & Bloom, A. S. (1985). *Effects of the cannabinoids on physical properties of brain membranes and phospholipid vesicles: fluorescence studies.* *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 232, 579-588.
- Howlett, A. C., Bidaut-Russell, M., Devane, W. A., Melvin, L. S., Johnson, M. R. & Herkenham, M. (1990). *The cannabinoid receptor: biochemical, anatomical and behavioral characterization.* *Trends Neurosci.* 13, 420-423.
- Huot, R. L., Thirivikraman, K. V., Meaney, M. J. & Plotsky, P. M. (2001). *Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment.* *Psychopharmacology (Berl)* 158, 366-373.
- Jahng, J. W. (2011). *An animal model of eating disorders associated with stressful experience in early life.* *Horm. Behav.* 59, 213-220.
- Jones, B. E. (2005). *From waking to sleeping: neuronal and chemical substrates.* *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 578-586.
- Jouvet, M. (1969). *Biogenic amines and the states of sleep.* *Science* 163, 32-41.

- Kalinichev, M., Easterling, K. W., Plotsky, P. M. & Holtzman, S. G. (2002). Long-lasting changes in stress-induced corticosterone response and anxiety-like behaviors as a consequence of neonatal maternal separation in Long-Evans rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73, 131-140.
- Kaminski, N. E. (1998). Regulation of the cAMP cascade, gene expression and immune function by cannabinoid receptors. *J. Neuroimmunol.* 83, 124-132.
- Killgore, W. D. (2010). Effects of sleep deprivation on cognition. *Prog. Brain Res.* 185, 105-129.
- Kim, J., Isokawa, M., Ledent, C. & Alger, B. E. (2002). Activation of muscarinic acetylcholine receptors enhances the release of endogenous cannabinoids in the hippocampus. *J. Neurosci.* 22, 10182-10191.
- Kinkead, R., Montandon, G., Bairam, A., Lajeunesse, Y. & Horner, R. (2009). Neonatal maternal separation disrupts regulation of sleep and breathing in adult male rats. *Sleep* 32, 1611-1620.
- Koranyi, L., Beyer, C. & Guzman-Flores, C. (1971). Multiple unit activity during habituation, sleep-wakefulness cycle and the effect of ACTH and corticosteroid treatment. *Physiol Behav.* 7, 321-329.
- Kosten, T. A., Lee, H. J. & Kim, J. J. (2007). Neonatal handling alters learning in adult male and female rats in a task-specific manner. *Brain Res.* 1154, 144-153.
- Ladd, C. O., Huot, R. L., Thrivikraman, K. V., Nemeroff, C. B., Meaney, M. J. & Plotsky, P. M. (2000). Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. *Prog. Brain Res.* 122, 81-103.
- Ladd, C. O., Huot, R. L., Thrivikraman, K. V., Nemeroff, C. B. & Plotsky, P. M. (2004). Long-term adaptations in glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor mRNA and negative feedback on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis following neonatal maternal separation. *Biol. Psychiatry* 55, 367-375.
- Ladd, C. O., Owens, M. J. & Nemeroff, C. B. (1996). Persistent changes in corticotropin-releasing factor neuronal systems induced by maternal deprivation. *Endocrinology* 137, 1212-1218.
- Lattova, Z., Keckeis, M., Maurovich-Horvat, E., Wetter, T. C., Wilde-Frenz, J., Schuld, A. & Pollmacher, T. (2011). The stress hormone system in various sleep disorders. *J. Psychiatr. Res.* 45, 1223-1228.
- Leggett, J. D., Aspley, S., Beckett, S. R., D'Antona, A. M., Kendall, D. A. & Kendall, D. A. (2004). Oleamide is a selective endogenous agonist of rat and human CB1 cannabinoid receptors. *Br. J. Pharmacol.* 141, 253-262.

- Lehmann, J. & Feldon, J. (2000). Long-term biobehavioral effects of maternal separation in the rat: consistent or confusing? *Rev. Neurosci.* 11, 383-408.
- Lehmann, J., Pryce, C. R., Jongen-Relo, A. L., Stohr, T., Pothuisen, H. H. & Feldon, J. (2002). Comparison of maternal separation and early handling in terms of their neurobehavioral effects in aged rats. *Neurobiol. Aging* 23, 457-466.
- Levine, S., Huchton, D. M., Wiener, S. G. & Rosenfeld, P. (1991). Time course of the effect of maternal deprivation on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat. *Dev. Psychobiol.* 24, 547-558.
- Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., Sharma, S., Pearson, D., Plotsky, P. M. & Meaney, M. J. (1997). Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 277, 1659-1662.
- Loria, A. S., Kang, K. T., Pollock, D. M. & Pollock, J. S. (2011). Early life stress enhances angiotensin II-mediated vasoconstriction by reduced endothelial nitric oxide buffering capacity. *Hypertension* 58, 619-626.
- Machado, R. B., Tufik, S. & Suchecki, D. (2010). Modulation of Sleep Homeostasis by Corticotropin Releasing Hormone in REM Sleep-Deprived Rats. *Int. J. Endocrinol.* 2010, 326151.
- Mackie, K., Lai, Y., Westenbroek, R. & Mitchell, R. (1995). Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J. Neurosci.* 15, 6552-6561.
- Maejima, T., Ohno-Shosaku, T. & Kano, M. (2001). Endogenous cannabinoid as a retrograde messenger from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neurosci. Res.* 40, 205-210.
- Mailleux, P. & Vanderhaeghen, J. J. (1993). Glucocorticoid regulation of cannabinoid receptor messenger RNA levels in the rat caudate-putamen. An *in situ* hybridization study. *Neurosci. Lett.* 156, 51-53.
- Maquet, P., Degueldre, C., Delfiore, G., Aerts, J., Peters, J. M., Luxen, A. & Franck, G. (1997). Functional neuroanatomy of human slow wave sleep. *J. Neurosci.* 17, 2807-2812.
- Maquet, P., Peters, J., Aerts, J., Delfiore, G., Degueldre, C., Luxen, A. & Franck, G. (1996). Functional neuroanatomy of human rapid-eye-movement sleep and dreaming. *Nature* 383, 163-166.
- Marco, E. M., Adriani, W., Llorente, R., Laviola, G. & Viveros, M. P. (2009). Detrimental psychophysiological effects of early maternal deprivation in adolescent and adult

- rodents: altered responses to cannabinoid exposure. Neurosci. Biobehav. Rev. 33, 498-507.*
- Marmendal, M., Roman, E., Eriksson, C. J., Nylander, I. & Fahlke, C. (2004). Maternal separation alters maternal care, but has minor effects on behavior and brain opioid peptides in adult offspring. Dev. Psychobiol. 45, 140-152.*
- Marshall, L. & Born, J. (2007). The contribution of sleep to hippocampus-dependent memory consolidation. Trends Cogn Sci. 11, 442-450.*
- Martinez-Gonzalez, D., Bonilla-Jaime, H., Morales-Otal, A., Henriksen, S. J., Velazquez-Moctezuma, J. & Prospero-Garcia, O. (2004). Oleamide and anandamide effects on food intake and sexual behavior of rats. Neurosci. Lett. 364, 1-6.*
- Martinez-Vargas, M., Murillo-rodriguez, E., Gonzalez-Rivera, R., Landa, A., Mendez-diaz, M., Prospero-Garcia, O. & Navarro, L. (2003). Sleep modulates cannabinoid receptor 1 expression in the pons of rats. Neuroscience 117, 197-201.*
- Massimini, M., Huber, R., Ferrarelli, F., Hill, S. & Tononi, G. (2004). The sleep slow oscillation as a traveling wave. J. Neurosci. 24, 6862-6870.*
- Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C. & Bonner, T. I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. Nature 346, 561-564.*
- Mazure, C. M., Kincare, P. & Schaffer, C. E. (1995). DSM-III-R Axis IV: clinician reliability and comparability to patients' reports of stressor severity. Psychiatry 58, 56-64.*
- McEwen, B. S. (1999). Stress and hippocampal plasticity. Annu. Rev. Neurosci. 22, 105-122.*
- McEwen, B. S. (2002). Sex, stress and the hippocampus: allostasis, allostatic load and the aging process. Neurobiol. Aging 23, 921-939.*
- McEwen, B. S. (2003). Early life influences on life-long patterns of behavior and health. Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev. 9, 149-154.*
- Meaney, M. J. (2001). Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. Annu. Rev. Neurosci. 24, 1161-1192.*
- Meaney, M. J., Aitken, D. H., van, B. C., Bhatnagar, S. & Sapolsky, R. M. (1988). Effect of neonatal handling on age-related impairments associated with the hippocampus. Science 239, 766-768.*
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N. E., Schatz, A. R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B. R., Compton, D. R. & . (1995). Identification of an*

- endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. Biochem. Pharmacol. 50, 83-90.*
- Mechoulam, R. & Gaoni, Y. (1967). The absolute configuration of delta-1-tetrahydrocannabinol, the major active constituent of hashish. Tetrahedron Lett. 12, 1109-1111.*
- Mechoulam, R., Hanus, L. & Martin, B. R. (1994). Search for endogenous ligands of the cannabinoid receptor. Biochem. Pharmacol. 48, 1537-1544.*
- Mendelson, W. B. & Basile, A. S. (1999). The hypnotic actions of oleamide are blocked by a cannabinoid receptor antagonist. Neuroreport 10, 3237-3239.*
- Mendelson, W. B. & Basile, A. S. (2001). The hypnotic actions of the fatty acid amide, oleamide. Neuropsychopharmacology 25, S36-S39.*
- Milde, A. M., Enger, O. & Murison, R. (2004). The effects of postnatal maternal separation on stress responsivity and experimentally induced colitis in adult rats. Physiol Behav. 81, 71-84.*
- Mintz, M., Ruedi-Bettschen, D., Feldon, J. & Pryce, C. R. (2005). Early social and physical deprivation leads to reduced social motivation in adulthood in Wistar rats. Behav. Brain Res. 156, 311-320.*
- Morrison, J. L., Sood, S., Liu, H., Park, E., Nolan, P. & Horner, R. L. (2003). GABAA receptor antagonism at the hypoglossal motor nucleus increases genioglossus muscle activity in NREM but not REM sleep. J. Physiol 548, 569-583.*
- Murillo-rodriguez, E., Blanco-Centurion, C., Sanchez, C., Piomelli, D. & Shiromani, P. J. (2003). Anandamide enhances extracellular levels of adenosine and induces sleep: an in vivo microdialysis study. Sleep 26, 943-947.*
- Murillo-rodriguez, E., Cabeza, R., Mendez-diaz, M., Navarro, L. & Prospero-Garcia, O. (2001). Anandamide-induced sleep is blocked by SR141716A, a CB1 receptor antagonist and by U73122, a phospholipase C inhibitor. Neuroreport 12, 2131-2136.*
- Nemeroff CB, C. B. (2004). Early-Life Adversity, CRF Dysregulation, and Vulnerability to Mood and Anxiety Disorders. Psychopharmacol. Bull. 38, 14-20.*
- Nemeroff, C. B. (1996). The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. Mol. Psychiatry 1, 336-342.*
- Nemeroff, C. B. (2004). Neurobiological consequences of childhood trauma. J. Clin. Psychiatry 65 Suppl 1, 18-28.*
- Newport, D. J., Stowe, Z. N. & Nemeroff, C. B. (2002). Parental depression: animal models of an adverse life event. Am. J. Psychiatry 159, 1265-1283.*

- Nofzinger, E. A., Mintun, M. A., Wiseman, M., Kupfer, D. J. & Moore, R. Y. (1997). *Forebrain activation in REM sleep: an FDG PET study. Brain Res. 770, 192-201.*
- Obal, F., Jr. (1986). *Effects of peptides (DSIP, DSIP analogues, VIP, GRF and CCK) on sleep in the rat. Clin. Neuropharmacol. 9 Suppl 4, 459-461.*
- Obal, F., Jr., Sary, G., Alfoldi, P., Rubicsek, G. & Obal, F. (1986). *Vasoactive intestinal polypeptide promotes sleep without effects on brain temperature in rats at night. Neurosci. Lett. 64, 236-240.*
- Ono, Y., Tsuya, A. & Kawakami, M. (1969). *Effects of head irradiation on paradoxical sleep (EEG afterreaction) in the rabbit. Radiat. Res. 38, 365-378.*
- Pacher, P., Batkai, S. & Kunos, G. (2006). *The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. Pharmacol. Rev. 58, 389-462.*
- Papale, L. A., Andersen, M. L., Antunes, I. B., Alvarenga, T. A. & Tufik, S. (2005). *Sleep pattern in rats under different stress modalities. Brain Res. 1060, 47-54.*
- Parker, G. (1983). *Parental 'affectionless control' as an antecedent to adult depression. A risk factor delineated. Arch. Gen. Psychiatry 40, 956-960.*
- Parolaro, D. (1999). *Presence and functional regulation of cannabinoid receptors in immune cells. Life Sci. 65, 637-644.*
- Paton, W. D. & Pertwee, R. G. (1972). *Effect of cannabis and certain of its constituents on pentobarbitone sleeping time and phenazone metabolism. Br. J. Pharmacol. 44, 250-261.*
- Patricelli, M. P. & Cravatt, B. F. (2000). *Clarifying the catalytic roles of conserved residues in the amidase signature family. J. Biol. Chem. 275, 19177-19184.*
- Pawlyk, A. C., Morrison, A. R., Ross, R. J. & Brennan, F. X. (2008). *Stress-induced changes in sleep in rodents: models and mechanisms. Neurosci. Biobehav. Rev. 32, 99-117.*
- Paxinos, G., Watson, C. R. & Emson, P. C. (1980). *AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. J. Neurosci. Methods 3, 129-149.*
- Pertwee, R., Griffin, G., Fernando, S., Li, X., Hill, A. & Makriyannis, A. (1995). *AM630, a competitive cannabinoid receptor antagonist. Life Sci. 56, 1949-1955.*
- Pertwee, R. G. & Ross, R. A. (2002). *Cannabinoid receptors and their ligands. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 66, 101-121.*
- Pettit, D. A., Harrison, M. P., Olson, J. M., Spencer, R. F. & Cabral, G. A. (1998). *Immunohistochemical localization of the neural cannabinoid receptor in rat brain. J. Neurosci. Res. 51, 391-402.*

- Piomelli, D. (2003). *The molecular logic of endocannabinoid signalling*. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 873-884.
- Piomelli, D., Giuffrida, A., Calignano, A. & Rodriguez De, F. F. (2000). *The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs*. *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 218-224.
- Ploj, K., Roman, E. & Nylander, I. (2003). *Long-term effects of maternal separation on ethanol intake and brain opioid and dopamine receptors in male Wistar rats*. *Neuroscience* 121, 787-799.
- Plotsky, P. M. & Meaney, M. J. (1993). *Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats*. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 18, 195-200.
- Plotsky, P. M., Thirivikraman, K. V., Nemeroff, C. B., Caldji, C., Sharma, S. & Meaney, M. J. (2005). *Long-term consequences of neonatal rearing on central corticotropin-releasing factor systems in adult male rat offspring*. *Neuropsychopharmacology* 30, 2192-2204.
- Porter, A. C., Sauer, J. M., Knierman, M. D., Becker, G. W., Berna, M. J., Bao, J., Nomikos, G. G., Carter, P., Bymaster, F. P., Leese, A. B. & Felder, C. C. (2002). *Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301, 1020-1024.
- Prospero-Garcia, O., Morales, M., Arankowsky-Sandoval, G. & Drucker-Colin, R. (1986). *Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and cerebrospinal fluid (CSF) of sleep-deprived cats restores REM sleep in insomniac recipients*. *Brain Res.* 385, 169-173.
- Pryce, C. R., Bettschen, D. & Feldon, J. (2001). *Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat*. *Dev. Psychobiol.* 38, 239-251.
- Pryce, C. R. & Feldon, J. (2003). *Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms*. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27, 57-71.
- Pryce, C. R., Ruedi-Bettschen, D., Dettling, A. C. & Feldon, J. (2002). *Early life stress: long-term physiological impact in rodents and primates*. *News Physiol Sci.* 17, 150-155.
- Pryce, C. R., Ruedi-Bettschen, D., Dettling, A. C., Weston, A., Russig, H., Ferger, B. & Feldon, J. (2005). *Long-term effects of early-life environmental manipulations in rodents and primates: Potential animal models in depression research*. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 649-674.
- Qureshi, J., Saady, M., Cardounel, A. & Kalimi, M. (1998). *Identification and characterization of a novel synthetic cannabinoid CP 55,940 binder in rat brain cytosol*. *Mol. Cell Biochem.* 181, 21-27.

- Rampin, C., Cespuglio, R., Chastrette, N. & Jouvet, M. (1991). *Immobilisation stress induces a paradoxical sleep rebound in rat. Neurosci. Lett.* 126, 113-118.
- Rapee, R. M. (1997). *Potential role of childrearing practices in the development of anxiety and depression. Clin. Psychol. Rev.* 17, 47-67.
- Repetti, R. L., Taylor, S. E. & Seeman, T. E. (2002). *Risky families: family social environments and the mental and physical health of offspring. Psychol. Bull.* 128, 330-366.
- Riebe, C. J. & Wotjak, C. T. (2011). *Endocannabinoids and stress. Stress.* 14, 384-397.
- Romero, J., Hillard, C. J., Calero, M. & Rabano, A. (2002). *Fatty acid amide hydrolase localization in the human central nervous system: an immunohistochemical study. Brain Res. Mol. Brain Res.* 100, 85-93.
- Rots, N. Y., de, J. J., Workel, J. O., Levine, S., Cools, A. R. & de Kloet, E. R. (1996). *Neonatal maternally deprived rats have as adults elevated basal pituitary-adrenal activity and enhanced susceptibility to apomorphine. J. Neuroendocrinol.* 8, 501-506.
- Rozeboom, A. M., Akil, H. & Seasholtz, A. F. (2007). *Mineralocorticoid receptor overexpression in forebrain decreases anxiety-like behavior and alters the stress response in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 4688-4693.
- Rueda-Orozco, P. E., Soria-Gomez, E., Montes-Rodriguez, C. J., Perez-Morales, M. & Prospero-Garcia, O. (2010). *Intrahippocampal administration of anandamide increases REM sleep. Neurosci. Lett.* 473, 158-162.
- Ryu, V., Lee, J. H., Yoo, S. B., Gu, X. F., Moon, Y. W. & Jahng, J. W. (2008). *Sustained hyperphagia in adolescent rats that experienced neonatal maternal separation. Int. J. Obes. (Lond)* 32, 1355-1362.
- Sanders, B. J. & Anticevic, A. (2007). *Maternal separation enhances neuronal activation and cardiovascular responses to acute stress in borderline hypertensive rats. Behav. Brain Res.* 183, 25-30.
- Santucci, V., Storme, J. J., Soubrie, P. & Le, F. G. (1996). *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, L103-L110.
- Saxena, S. (2009). *Fungal biotransformation of cannabinoids: potential for new effective drugs. Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 12, 305-312.
- Schlicker, E. & Kathmann, M. (2001). *Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. Trends Pharmacol. Sci.* 22, 565-572.

- Schmidt, M., Enthoven, L., van Woezik, J. H., Levine, S., de Kloet, E. R. & Oitzl, M. S. (2004). *The dynamics of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during maternal deprivation. J. Neuroendocrinol. 16, 52-57.*
- Schmidt, M., Okimoto, D. K., Dent, G. W., Gordon, M. K. & Levine, S. (2002). *Maternal regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the 20-day-old rat: consequences of laboratory weaning. J. Neuroendocrinol. 14, 450-457.*
- Schweitzer, P. (2000). *Cannabinoids decrease the K(+) M-current in hippocampal CA1 neurons. J. Neurosci. 20, 51-58.*
- Shea, A., Walsh, C., Macmillan, H. & Steiner, M. (2005). *Child maltreatment and HPA axis dysregulation: relationship to major depressive disorder and post traumatic stress disorder in females. Psychoneuroendocrinology 30, 162-178.*
- Singareddy, R. K. & Balon, R. (2002). *Sleep in posttraumatic stress disorder. Ann. Clin. Psychiatry 14, 183-190.*
- Slotten, H. A., Kalinichev, M., Hagan, J. J., Marsden, C. A. & Fone, K. C. (2006). *Long-lasting changes in behavioural and neuroendocrine indices in the rat following neonatal maternal separation: gender-dependent effects. Brain Res. 1097, 123-132.*
- Soria-Gomez, E., Marquez-Diosdado, M. I., Montes-Rodriguez, C. J., Estrada-Gonzalez, V. & Prospero-Garcia, O. (2010). *Oleamide administered into the nucleus accumbens shell regulates feeding behaviour via CB1 and 5-HT2C receptors. Int. J. Neuropsychopharmacol. 13, 1247-1254.*
- Stefano, G. B. (2000). *Endocannabinoid immune and vascular signaling. Acta Pharmacol. Sin. 21, 1071-1081.*
- Stuart-Harris, R. C., Mooney, C. A. & Smith, I. E. (1983). *Levonantradol: a synthetic cannabinoid in the treatment of severe chemotherapy-induced nausea and vomiting resistant to conventional anti-emetic therapy. Clin. Oncol. 9, 143-146.*
- Suchecki, D. & Tufik, S. (1997). *Long-term effects of maternal deprivation on the corticosterone response to stress in rats. Am. J. Physiol 273, R1332-R1338.*
- Tang, X., Liu, X., Yang, L. & Sanford, L. D. (2005). *Rat strain differences in sleep after acute mild stressors and short-term sleep loss. Behav. Brain Res. 160, 60-71.*
- Teicher, M. H., Tomoda, A. & Andersen, S. L. (2006). *Neurobiological consequences of early stress and childhood maltreatment: are results from human and animal studies comparable? Ann. N. Y. Acad. Sci. 1071, 313-323.*
- Thomas, E. A., Carson, M. J., Neal, M. J. & Sutcliffe, J. G. (1997). *Unique allosteric regulation of 5-hydroxytryptamine receptor-mediated signal transduction by oleamide. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 94, 14115-14119.*

- Thomas, E. A., Cravatt, B. F. & Sutcliffe, J. G. (1999). *The endogenous lipid oleamide activates serotonin 5-HT7 neurons in mouse thalamus and hypothalamus. J. Neurochem. 72, 2370-2378.*
- Tiba, P. A., Tufik, S. & Suchecki, D. (2004). *Effects of maternal separation on baseline sleep and cold stress-induced sleep rebound in adult Wistar rats. Sleep 27, 1146-1153.*
- Tiba, P. A., Tufik, S. & Suchecki, D. (2008). *Long lasting alteration in REM sleep of female rats submitted to long maternal separation. Physiol Behav. 93, 444-452.*
- Toki, S., Morinobu, S., Imanaka, A., Yamamoto, S., Yamawaki, S. & Honma, K. (2007). *Importance of early lighting conditions in maternal care by dam as well as anxiety and memory later in life of offspring. Eur. J. Neurosci. 25, 815-829.*
- Tomida, I., Azuara-Blanco, A., House, H., Flint, M., Pertwee, R. G. & Robson, P. J. (2006). *Effect of sublingual application of cannabinoids on intraocular pressure: a pilot study. J. Glaucoma. 15, 349-353.*
- Tucker, D. C. & Johnson, A. K. (1984). *Influence of neonatal handling on blood pressure, locomotor activity, and preweanling heart rate in spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto rats. Dev. Psychobiol. 17, 587-600.*
- van Oers, H. J., de Kloet, E. R. & Levine, S. (1998a). *Early vs. late maternal deprivation differentially alters the endocrine and hypothalamic responses to stress. Brain Res. Dev. Brain Res. 111, 245-252.*
- van Oers, H. J., de Kloet, E. R., Li, C. & Levine, S. (1998b). *The ontogeny of glucocorticoid negative feedback: influence of maternal deprivation. Endocrinology 139, 2838-2846.*
- Van Sickle, M. D., Duncan, M., Kingsley, P. J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., Stella, N., Makriyannis, A., Piomelli, D., Davison, J. S., Marnett, L. J., Di, M., V, Pittman, Q. J., Patel, K. D. & Sharkey, K. A. (2005). *Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. Science 310, 329-332.*
- Varma, N., Carlson, G. C., Ledent, C. & Alger, B. E. (2001). *Metabotropic glutamate receptors drive the endocannabinoid system in hippocampus. J. Neurosci. 21, RC188.*
- Varvel, S. A., Wise, L. E., Niyuhire, F., Cravatt, B. F. & Lichtman, A. H. (2007). *Inhibition of fatty-acid amide hydrolase accelerates acquisition and extinction rates in a spatial memory task. Neuropsychopharmacology 32, 1032-1041.*
- Vazquez-Palacios, G. & Velazquez-Moctezuma, J. (2000). *Effect of electric foot shocks, immobilization, and corticosterone administration on the sleep-wake pattern in the rat. Physiol Behav. 71, 23-28.*

- Vgontzas, A. N. & Chrousos, G. P. (2002). *Sleep, the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, and cytokines: multiple interactions and disturbances in sleep disorders.* *Endocrinol. Metab Clin. North Am.* 31, 15-36.
- Walker, J. M., Huang, S. M., Strangman, N. M., Tsou, K. & Sanudo-Pena, M. C. (1999). *Pain modulation by release of the endogenous cannabinoid anandamide.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 12198-12203.
- Weaver, I. C., Diorio, J., Seckl, J. R., Szyf, M. & Meaney, M. J. (2004). *Early environmental regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene expression: characterization of intracellular mediators and potential genomic target sites.* *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1024, 182-212.
- Wenger, T., Toth, B. E., Juaneda, C., Leonardelli, J. & Tramu, G. (1999). *The effects of cannabinoids on the regulation of reproduction.* *Life Sci.* 65, 695-701.
- Wigger, A. & Neumann, I. D. (1999). *Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats.* *Physiol Behav.* 66, 293-302.
- Wilson, R. I. & Nicoll, R. A. (2002). *Endocannabinoid signaling in the brain.* *Science* 296, 678-682.
- Workel, J. O., Oitzl, M. S., Fluttert, M., Lesscher, H., Karssen, A. & de Kloet, E. R. (2001). *Differential and age-dependent effects of maternal deprivation on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of brown norway rats from youth to senescence.* *J. Neuroendocrinol.* 13, 569-580.
- Zhang, T. Y., Chretien, P., Meaney, M. J. & Gratton, A. (2005). *Influence of naturally occurring variations in maternal care on prepulse inhibition of acoustic startle and the medial prefrontal cortical dopamine response to stress in adult rats.* *J. Neurosci.* 25, 1493-1502.
- Zimmerberg, B. & Shartrand, A. M. (1992). *Temperature-dependent effects of maternal separation on growth, activity, and amphetamine sensitivity in the rat.* *Dev. Psychobiol.* 25, 213-226.
- Zuardi, A. W., Shirakawa, I., Finkelfarb, E. & Karniol, I. G. (1982). *Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by delta 9-THC in normal subjects.* *Psychopharmacology (Berl)* 76, 245-250.