



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS NEURONAS MCHÉRGICAS Y
OREXINÉRGICAS DEL HIPOTÁLAMO LATERAL POR ENDOCANABINOIDES,
Y SUS EFECTOS SOBRE LA GENERACIÓN DE SUEÑO MOR

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

LIC. MAURICIO MARCEL PÉREZ MORALES

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ÓSCAR PROSPÉRO GARCÍA

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. RAÚL AGUILAR ROBLERO

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

DR. JAVIER VELÁZQUEZ MOCTEZUMA

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, D. F., MAYO DE 2014.



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.

AGRADECIMIENTOS.

Esta Tesis Doctoral refleja el trabajo de casi seis años –con momentos buenos y malos–, y muchas personas participaron, directa o indirectamente, en ella. A todas quiero agradecerles, aunque no las mencione en particular.

Quiero agradecerle *principalmente* a mi compañera, amiga y esposa *Elizabeth*, porque sin su amor, apoyo y comprensión en *todo* momento, ni siquiera habría comenzado. A lo largo del doctorado, tú siempre compartiste mis preocupaciones y logros, como nadie más. (Sólo *Gatusso* puede imaginárselo.)

Gracias a mi tutor, Óscar Próspero, por su orientación, retroalimentación y apoyo, a lo largo de todos estos años. (Si hubiera más tutores como tú en el país, *tal vez* la ciencia sería *más* importante y *menos* aburrida para los mexicanos.)

También quiero agradecer al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM, por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo; y al CONACyT, que me otorgó la beca 220685, durante cinco años (sin la cual, el 90% de este trabajo no habría sido posible). Dedicarse a la ciencia, es el *mejor* trabajo.

Asimismo, quiero agradecer a la familia Pérez Morales por compartir los buenos y los malos momentos en la realización de esta Tesis. Pero quiero ser más específico: a Francisco Pérez Ortiz, mi papá, y a María Eugenia Morales Rojas, mi mamá, porque siempre me han apoyado en *todo*; y a mis hermanos, Diego y Damián –sin un orden de importancia, en particular–, porque siempre dijeron –en los momentos más difíciles–, de una u otra forma, que no *dramatizara* (aunque casi siempre necesitábamos alcohol, para que ocurriera).

También quiero agradecer a la familia Cruz Velasco: Rodolfo Cruz Zavala (mi suegro), Yolanda Velasco Cortés (mi suegra), Marlene Cruz Velasco (mi cuñada) y Jennifer Cruz Velasco (mi cuñada), porque me han hecho sentir parte de su familia, a lo largo de todos estos años (aunque no sepan *exactamente* qué hago con mi vida).

Gracias igualmente a los miembros de mi comité tutorial, por todos los comentarios, regaños, sugerencias y anécdotas *off the record* que hicieron en todas las evaluaciones semestrales.

Gracias también a los miembros de mi examen de candidatura, por su retroalimentación en ese momento.

Asimismo agradezco a los miembros del jurado de mi examen de grado, por los comentarios y sugerencias que hicieron al manuscrito de la Tesis. Gracias por haberse tomado el tiempo para leer el manuscrito completo y no haber declinado por la exasperante presencia de frases repetitivas y de abreviaturas.

Gracias a los integrantes del laboratorio de cannabinoides, del departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la UNAM, por escuchar mis comentarios y discutir mis datos en los seminarios de cada lunes (y a cualquier hora). Gracias a los que siguen en el laboratorio, y a los que estuvieron (cuando yo estuve).

Gracias a todas las ratas Wistar macho del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM, que otorgaron su vida para la realización de esta Tesis Doctoral.

ÍNDICE

- 1. Introducción... 1**
- 2. El hipotálamo... 4**
 - 2.1. El hipotálamo lateral... 5**
 - 2.2. Perfiles neuroquímicos de las neuronas del hipotálamo lateral...6**
- 3. El sueño: definición... 7**
 - 3.1. Variables electrofisiológicas empleadas para identificar el ciclo sueño-vigilia... 8**
 - 3.2. Herramientas empleadas para identificar el ciclo sueño-vigilia... 8**
 - 3.3. Criterios para la identificación del ciclo sueño-vigilia en roedores... 9**
 - 3.4. Moléculas involucradas en la regulación del ciclo sueño-vigilia... 11**
- 4. Perspectiva histórica de la investigación del sueño... 12**
 - 4.1. Circuitería hipotalámica responsable de la regulación del ciclo sueño-vigilia... 15**
 - 4.2. El hipotálamo lateral y su influencia sobre el ciclo sueño-vigilia... 19**
- 5. Sueño de movimientos oculares rápidos... 19**
 - 5.1. Núcleos responsables de la generación del s-MOR... 20**
 - 5.2. Atonía muscular durante el s-MOR... 22**
- 6. La ingestión de alimento: definición... 24**
 - 6.1. Circuitería hipotalámica responsable de la regulación de la ingestión de alimento... 24**
 - 6.2. El hipotálamo lateral y su influencia sobre la ingestión de alimento... 26**

6.3. Las neuronas del hipotálamo lateral sintetizan péptidos orexigénicos que también modulan el ciclo sueño-vigilia...	29
7. Los neuropéptidos OX y MCH del hipotálamo lateral...	30
7.1. Las orexinas...	30
7.2. Hormona concentradora de melanina (MCH)...	32
7.3. OX y MCH proyectan a estructuras cerebrales involucradas en la regulación del ciclo sueño-vigilia...	33
7.4. OX y MCH modulan componentes opuestos del ciclo sueño-vigilia.	
7.4.1. Neuronas orexinérgicas y narcolepsia...	35
7.4.2. Neuronas orexinérgicas y cataplexia...	37
7.4.3. Neuronas orexinérgicas y vigilia...	38
7.4.4. Neuronas MCHérgicas y la regulación del sueño...	39
8. El sistema endocannabinérgico...	41
8.1. Los receptores a cannabinoides tipo 1 (CB ₁ R) y tipo 2 (CB ₂ R)...	43
8.2. Los endocannabinoides...	48
8.3. Los endocannabinoides 2-AG y Anandamida...	49
8.4. 2-AG: vías de síntesis y de degradación...	50
9. Los endocannabinoides y su participación en la regulación del apetito y del sueño...	54
9.1. Moléculas endocannabinoides y su participación en la modulación del sueño...	54
9.2. Moléculas endocannabinoides y su participación como promotores de la ingestión de alimento...	56
10. Receptores activados por proteinasas (PARs)...	57

10.1. PAR₁ y 2-AG...	58
11. Planteamiento del problema, hipótesis y objetivos...	59
11.1. Hipótesis general...	61
11.2. Hipótesis específicas...	61
11.3. Objetivos...	62
12. Método.	
12.1. Sujetos...	66
12.2. Aparatos...	66
12.3. Administración de fármacos...	67
12.4. Biología molecular...	67
12.5. Programas...	67
12.6. Fármacos...	68
12.7. Reactivos...	68
12.8. Anticuerpos...	68
13. Procedimientos generales.	
13.1. Cirugía.	
13.1.1. Registros electroencefalográfico y electromiográfico...	69
13.1.2. Cánulas guía para la administración de fármacos...	70
13.2. Administración de los fármacos...	71
13.3. Perfusión...	72
13.4. Evaluación del ciclo sueño-vigilia...	73
13.5. Evaluación de la ingestión de alimento...	74
13.6. Inmunofluorescencia de doble marcaje...	75
13.7. Cuantificación de c-fos...	76

13.8. Análisis estadístico... 77

14. Procedimientos experimentales.

14.1. Estimulación del CB₁R por 2-AG en el hipotálamo lateral.

14.1.1. Efectos de la administración de 2-AG en el hipotálamo lateral sobre el ciclo sueño-vigilia... 78

14.1.2. Efectos de la administración de 2-AG en el hipotálamo lateral sobre la expresión de c-Fos en las neuronas MCHérgicas y orexinérgicas... 79

14.2. Estimulación del PAR₁ por S1820 en el hipotálamo lateral.

14.2.1. Efectos de la estimulación del PAR₁ sobre el ciclo sueño-vigilia... 80

14.2.2. Efectos de la estimulación del PAR₁ sobre la ingestión de alimento... 81

15. Resultados.

15.1. La administración de 2-AG (0.01 µg), agonista del receptor a cannabinoides tipo 1, en el hipotálamo lateral, incrementa el s-MOR y la frecuencia de episodios de s-MOR, mediante la activación del receptor a cannabinoides tipo 1.

15.1.1. Primeras 12 h de registro (fase de oscuridad)... 82

15.1.2. Últimas 12 h de registro (fase de luz)... 86

15.2. La administración de 2-AG (0.01 µg), agonista del receptor a cannabinoides tipo 1, en el hipotálamo lateral, incrementa la expresión de c-Fos en las neuronas MCHérgicas... 89

15.3. La estimulación del receptor activado por proteínas 1 en el hipotálamo lateral, incrementa el s-MOR y la frecuencia de episodios de s-MOR, a través de la activación del receptor a cannabinoides tipo 1.

15.3.1. 12 h de registro (fase de oscuridad)...	94
15.4. La estimulación del receptor activado por proteinasas 1 en el hipotálamo lateral, incrementa la ingestión de alimento, a través de la activación del receptor a cannabinoides tipo 1...	99
16. Discusión.	
16.1. Efectos de la administración de 2-AG, agonista del receptor a cannabinoides tipo 1, en el hipotálamo lateral, sobre el ciclo sueño-vigilia y la expresión de c-Fos en las neuronas MCHérgicas y orexinérgicas...	101
16.2. Efectos de la estimulación del receptor activado por proteinasas 1 (PAR₁), en el hipotálamo lateral, por S1820, agonista del PAR₁, sobre el ciclo sueño-vigilia y la ingestión de alimento...	104
17. Conclusiones...	109
18. Apéndices...	111
19. Bibliografía...	127
20. Anexos...	175

Abreviaturas.

α -MSH: hormona estimulante de melanocitos-alfa.

μ l: microlitros.

μ m: micrómetros.

μ V: microvolts.

2-AG: 2-araquidonil glicerol.

2-AGE: 2-araquidonil gliceril éter, o noladin éter.

3V: tercer ventrículo.

5-HT: serotonina.

5-HT_{2c}: receptor subtipo 2c a serotonina.

Δ 9-THC ó THC: delta9 tetrahidrocannabinol.

AA: ácido araquidónico.

AC: adenilato ciclasa.

ACEA: araquidonil-2'-cloroetilamida.

ACh: acetilcolina.

AEA: N-araquidonil etanolamida.

AgRP: proteína relacionada al gen agouti.

AMPA: α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato.

ARC: núcleo arcuato hipotalámico.

BF: cerebro basal anterior.

cAMP: monofosfato cíclico de adenosina.

CART: transcrito regulado por cocaína y anfetamina.

CB₁R: receptor a cannabinoides 1.

CB₂R: receptor a cannabinoides 2.

cps: ciclos por segundo.

DAG: diacilglicerol.

DAG-L: diacilglicerol lipasa.

DMH: núcleo dorsomedial hipotalámico.

DMSO: dimetil sulfóxido.

DRN: núcleo dorsal del Rafé.

DSIP: péptido inductor de sueño delta.

EEG: electroencefalograma.

EMG: electromiograma.

EOG: electrooculograma.

FAAH: hidrolasa de los ácidos amidados grasos.

FTG: campo gigantocelular del tegmento.

GABA: ácido- γ -aminobutírico.

Gi α : núcleo reticular gigantocelular alfa.

GiV: núcleo reticular gigantocelular ventral.

GHRH: hormona liberadora de la hormona de crecimiento.

Glu: glutamato.

g: gramos.

His: histamina.

Hz: hertz.

icv: intracerebroventricular.

ip: intraperitoneal.

IP₃: inositol trifosfato.

IPSCs: corrientes post-sinápticas inhibitorias.

iv: intravenoso (a).

LC: locus coeruleus.

LDT: núcleo lateral dorsal tegmental.

LPGi: núcleo reticular lateral paragigantocelular.

MAG-L: monoacilglicerol lipasa.

MAPK: proteína cinasa activada por mitógenos.

MCH: hormona concentradora de melanina.

MCH₁R: receptor 1 a hormona concentradora de melanina.

MCH₂R: receptor 2 a hormona concentradora de melanina.

mGluRs: receptores metabotrópicos a glutamato.

MnPO: núcleo preóptico mediano.

mRNA: RNA mensajero.

NA: noradrenalina.

NAc: núcleo accumbens.

NAcS: núcleo accumbens shell.

NADA: N-araquidonil dopamina.

NAPE: N-araquidonil fosfatidiletanolamina.

NAPE-PLD: fosfolipasa D selectiva para la N-araquidonil fosfatidiletanolamina.

NAT: N-aciltransferasa.

NEI: neuropéptido amida isoleucina de ácido glutámico.

NGE: neuropéptido glicina de ácido glutámico.

NMDA: N-metil-D-aspartato.

NPY: neuropéptido Y.

OEA: N-oleoyletanolamida.

OLE: Cis-9-10 octadecenoamida, u Oleamida.

OX: orexina/hipocretina.

OX-A: orexina A/hipocretina 1.

OX-B: orexina B/hipocretina 2.

OX₁R: receptor 1 a orexinas.

OX₂R: receptor 2 a orexinas.

PACAP: polipéptido activador de la adenilil ciclasa.

PAR₁: receptor activado por proteinasas 1.

PBS: búfer de fosfatos de salina.

PC: fosfatidilcolina.

PEA: N-palmitoyletanolamida.

PeF: región perifornical del hipotálamo lateral.

peri-LCα: peri-locus coeruleus alfa.

PFA: paraformaldehído.

PIP₂: fosfatidil inositol 4, 5 bifosfato.

PLA: fosfolipasa A.

PLC: fosfolipasa C.

PE: fosfatidiletanolamina.

PnC: pontis caudalis.

PnO: pontis oralis.

POA: área preóptica hipotalámica.

PPAR: receptor activado por proliferador de peroxisomas.

PPT: núcleo pedúnculo pontino tegmental.

PVN: núcleo paraventricular hipotalámico.

RMg: rafé magnus.

s: segundos.

s-MOR: sueño de movimientos oculares rápidos.

SLD: núcleo sublateral dorsal del tegmento.

SOL: sueño de ondas lentas, sueño delta o sueño no-mor.

SON: núcleo supraóptico hipotalámico.

SubC: núcleo sub-coeruleus.

THL: tetrahidrolipstatina.

TMN: núcleo túbulo mamilar.

TRPV₁: receptor potencial transitorio a vaniloides tipo 1.

VGLUT₂: transportador vesicular de glutamato tipo 2.

vIPAG: sustancia gris periacueductal ventrolateral.

VLPO: área preóptica ventrolateral.

VMH: núcleo hipotalámico ventromedial.

VTA: área ventral tegmental.

RESUMEN

Se ha mostrado que los ligandos endógenos del receptor a cannabinoides 1 (CB₁R), los endocannabinoides (eCBs), como anandamida (AEA) y oleamida (OLE), inducen sueño en ratas, particularmente sueño de movimientos oculares rápidos (s-MOR), aun cuando los mecanismos exactos por los cuales lo hacen permanecen sin conocerse. Por otra parte, recientemente se han descubierto un par de péptidos, sintetizados por poblaciones independientes de neuronas del hipotálamo lateral. Las neuronas que sintetizan hormona concentradora de melanina (MCH) se han asociado con el s-MOR, mientras que las orexinas (OX) han sido asociadas con el mantenimiento de la vigilia. Asimismo, evidencia *in vitro* ha mostrado que la activación del CB₁R despolariza a las neuronas MCHérgicas e hiperpolariza a las neuronas orexinérgicas. Igualmente, evidencia *in vitro* ha mostrado que la estimulación del receptor activado por proteinasas 1 (PAR₁) induce señalización retrógrada endocannabinoide, a través del CB₁R y del endocannabinoide 2-araquidonil glicerol (2-AG). 2-AG no ha sido estudiado con relación al ciclo sueño vigilia.

En este contexto, en esta Tesis Doctoral, se mostró que la estimulación del CB₁R en el hipotálamo lateral de ratas, por 2-AG, aumenta el s-MOR y la expresión de c-Fos en las neuronas MCHérgicas, sugiriendo que 2-AG, y potencialmente otros eCBs, pueden actuar en el hipotálamo lateral para inducir sueño, al incrementar la actividad de las neuronas MCHérgicas promotoras del s-MOR.

En segundo lugar, se mostró que la administración de S1820, un agonista del PAR₁, en el hipotálamo lateral de ratas, aumenta el s-MOR y la ingestión de alimento, de manera dependiente de la dosis, a través del CB₁R. Ya que los eCBs, además de promover el sueño, facilitan la ingestión de alimento en ratas, estos datos revelan novedosos efectos endocannabinoides inducidos por la estimulación del PAR₁.

ABSTRACT

It has been shown that the endogenous ligands for the cannabinoid receptor 1 (CB₁R), the endocannabinoids (eCBs), such as anandamide (AEA) and oleamide (OLE), induce sleep in rats, particularly rapid eye movement sleep (REM), even though the exact mechanisms by which they do so remain unknown. On the other hand, recently, a couple of peptides, synthesized by independent populations of neurons of the lateral hypothalamus have been discovered. Melanin-concentrating hormone (MCH) neurons have been associated to REM, whereas orexin (OX) neurons have been associated to the maintenance of wakefulness. Also, *in vitro* evidence has showed that activation of the CB₁R depolarizes MCH- and hyperpolarizes OX- neurons. Likewise, *in vitro* evidence has demonstrated that stimulation of the proteinase-activated receptor 1 (PAR₁) induces retrograde endocannabinoid signaling, through the CB₁R and the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol (2-AG). 2-AG has not been studied in relation to the sleep-waking cycle.

In this context, firstly, we showed that stimulation of the CB₁R in the lateral hypothalamus of rats, by 2-AG, enhances REM and c-Fos expression in MCH neurons, suggesting that 2-AG, and potentially other eCBs, might act into the lateral hypothalamus to induce sleep, by increasing the activity of the REM –promoting MCH neurons.

In the second place, we demonstrated that the administration of S1820, a PAR₁ agonist, into the lateral hypothalamus of rats, enhances REM and food intake, in a dose dependent manner, through the CB₁R. Since eCBs, besides promoting sleep, have been shown to enhance food intake in rats, these data reveals novel endocannabinoid-like effects induced by PAR₁ stimulation.

1. Introducción.

El sueño es una actividad peculiar no sólo porque le dedicamos gran parte de nuestras vidas, sino porque además es una actividad que no necesitamos aprender a realizar. Aun cuando estas características por sí mismas pueden interesar genuinamente a cualquier persona en el sueño, de manera informal es más común que la gente se pregunte por qué soñamos lo que soñamos; si podríamos dedicarle menos horas al sueño y sin embargo rendir al máximo en la vigilia; por qué no podemos dormir; o por qué tenemos la sensación de no haber descansado a pesar de haber dormido. De manera formal, se han realizado diversos estudios sistemáticos en animales y en pacientes humanos para responder a esta clase de preguntas. En este contexto, aunque se han debatido por años, no se han podido determinar exactamente cuáles son las funciones del sueño, pero sí se han identificado ampliamente los sustratos cerebrales y las moléculas que lo regulan. Es decir, sabemos de dónde provienen los sueños, pero no sabemos por qué soñamos.

A partir de las enfermedades letárgicas descritas por Constantine von Economo en el primer cuarto del siglo XX, se sugirió que el hipotálamo, una estructura situada en la base del cerebro y que pesa apenas 4 gramos (g) en el humano, aparentemente incluía regiones que modulaban la vigilia o el sueño. von Economo observó lesiones en las porciones anterior, o posterior, del hipotálamo de pacientes que habían padecido insomnio, o somnolencia, discapacitante y letal. Estos hallazgos no sólo sugirieron la existencia de un par de centros cerebrales encargados de generar el sueño o la vigilia, sino que impulsaron el estudio sistemático de los componentes del sueño y de la vigilia. Asimismo, otros estudios

realizados en animales de experimentación revelaron que la vigilia y el sueño no sólo están regulados por estructuras hipotalámicas, sino que además intervienen regiones del mesencéfalo y del tallo cerebral (para consultar una revisión al respecto, ver Jones, 2005). Otros autores buscaron sustancias cerebrales que promovieran el sueño, y de este modo se identificaron factores inductores de sueño y más tarde se sugirió la participación de los neurotransmisores en la regulación del ciclo sueño-vigilia (para consultar un par de revisiones al respecto, léanse Brown et al., 2012; y García-García & Drucker-Colín, 1999).

En la actualidad no sólo sabemos que los neurotransmisores facilitan el sueño o la vigilia, sino que además hay una interacción recíproca entre los sistemas que promueven el sueño y los sistemas que promueven la vigilia, y que existen otra clase de moléculas, tales como los neuropéptidos (Prospéro-García & Méndez-Díaz, 2004) y los endocannabinoides (Prospéro-García, Herrera-Solís, Méndez-Díaz, Ruiz-Contreras, & Pérez-Morales, 2009), que forman parte de esta modulación. La hormona concentradora de melanina (MCH) y las orexinas/hipocretinas (OX), son un par de ejemplos de esta clase de neuropéptidos. MCH y OX son sintetizados exclusivamente por poblaciones independientes de neuronas del hipotálamo lateral. Esta región cerebral ha sido asociada con el mantenimiento de la vigilia y la facilitación de la ingestión de alimentos, a partir de una serie de estudios de lesión o de estimulación eléctrica llevados a cabo en ratas y en gatos (revisado en Berthoud & Münzberg, 2011). Asimismo, se ha reportado que las neuronas orexinérgicas y las neuronas MCHérgicas proyectan difusamente hacia todo el sistema nervioso central,

incluyendo regiones que regulan la vigilia o el sueño; y se ha mostrado que estos neuropéptidos modulan diferencialmente el ciclo-sueño vigilia.

Mediante inmunohistoquímica se ha observado que las neuronas orexinérgicas están activas en la vigilia, mientras que las neuronas MCHérgicas están activas en el sueño de movimientos oculares rápidos (s-MOR). Adicionalmente, estudios de registro de actividad unitaria en roedores han permitido identificar que las neuronas orexinérgicas tienen su máxima tasa de disparo en la vigilia, mientras que las neuronas MCHérgicas tienen su máxima tasa de disparo durante el s-MOR. De manera complementaria, aproximaciones farmacológicas han apoyado la noción de que las OX promueven la vigilia, mientras que MCH facilita el s-MOR. Por otra parte, también se ha observado que OX y MCH participan ligeramente en la regulación del apetito, ya que en comparación con otros péptidos orexigénicos, como el neuropéptido Y (NPY) o la proteína relacionada al gen Agouti (AgRP), el efecto de OX y de MCH sobre la ingestión de alimento es débil.

Asimismo, en las últimas décadas una creciente literatura ha sugerido que los endocannabinoides, los ligandos endógenos de los receptores a cannabinoides 1 y 2 (CB₁R y CB₂R, respectivamente), así como el delta-9 tetrahidrocanabinol (Δ 9-THC), la sustancia psicoactiva más importante de la marihuana, son moléculas hipnóticas. En este contexto, existen tanto reportes anecdóticos de usuarios de marihuana como evidencia experimental obtenida de pacientes humanos voluntarios sanos y de animales, que sustentan la noción de que tanto la marihuana como los endocannabinoides facilitan el s-MOR. A pesar de que esta evidencia experimental es sólida y consistente, se desconocen los mecanismos cerebrales a través de los cuales los endocannabinoides incrementan el s-MOR;

sin embargo, una serie de estudios *in vitro* ha documentado que la activación del CB₁R en rebanadas de cerebro de rata despolariza a neuronas que sintetizan MCH e inhibe a neuronas que sintetizan OX, sugiriendo que la modulación de estas estirpes neuronales del hipotálamo lateral por la activación del CB₁R podría ser uno de los mecanismos a través de los cuales los endocannabinoides incrementan el s-MOR.

Igualmente, otra serie de estudios *in vitro* ha mostrado que la estimulación del receptor 1 activado por proteinasas (PAR₁), cuyo ligando endógeno es la trombina, induce señalización retrógrada sináptica a través del 2-araquidonil glicerol (2-AG), el endocannabinoide más abundante en el sistema nervioso central, y que esta señalización está mediada por la activación del CB₁R, sugiriendo que la activación del PAR₁ involucra la síntesis de 2-AG (Hashimoto et al., 2011).

2. El hipotálamo.

El hipotálamo es una estructura heterogénea localizada en la porción ventral del cerebro. Desde un punto de vista evolutivo es una de las regiones cerebrales más antiguas y conservadas, ya que al integrar una gran variedad de información asociada a la expresión de conductas motivadas, resulta indispensable para la supervivencia de los organismos. Asimismo, se ha mostrado que el hipotálamo está conectado con todo el sistema nervioso central y que, además, al transformar información sináptica en señales que viajan a través del torrente sanguíneo, se comunica con órganos periféricos. De este modo, se ha considerado al hipotálamo como un centro esencial involucrado en la regulación de diversos procesos fisiológicos. Entre éstos, se pueden citar la regulación del peso y de la

temperatura corporal, así como el control de la ingestión de alimento y de la conducta sexual (Sternson, 2013).

A pesar de la importancia aparente de esta región cerebral, no fue sino hasta 1893, cuando el hipotálamo se reconoció como una región independiente del diencéfalo, gracias al trabajo del anatomista suizo Wilhem His (revisado en Card et al., 2008). Igualmente, con base en los estudios de cirujanos anatomistas de la primera mitad del siglo XX como Gurdjian y Le Gros Clark, se descubrió que las lesiones o la estimulación de estos núcleos podían modular selectivamente diversas funciones especializadas (revisado en Saper, 2004); por ejemplo, una serie de experimentos llevados a cabo en gatos por el grupo del neurólogo suizo Walter Rudolph Hess, mostró que la estimulación eléctrica de distintas áreas hipotalámicas inducía un apetito voraz o reacciones de cólera caracterizadas por silbidos, gruñidos, mordidas, piloerección, arqueamiento de la espalda y dilatación pupilar, entre otras conductas (revisado en Berthoud & Münzberg, 2011). En el Apéndice A se describe e ilustra la anatomía del hipotálamo, y se citan otras moléculas sintetizadas en esta región cerebral –no mencionadas en ninguna otra parte del texto– que ejercen efectos sobre el ciclo sueño-vigilia y/o la ingestión de alimento.

2.1. El hipotálamo lateral.

El hipotálamo lateral está delimitado rostralmente por el área preóptica (POA); medialmente, por el hipotálamo dorsomedial (DMH), por el hipotálamo ventromedial (VMH) y por el núcleo arcuato del hipotálamo (ARC); lateralmente,

por la cápsula interna y por el tracto óptico; y caudalmente, por el área tegmental ventral (VTA) (Ver Apéndice A).

Estudios neuroanatómicos realizados con técnicas clásicas de trazadores, han mostrado que el hipotálamo lateral contiene un vasto arreglo de conexiones nerviosas (Elias et al., 1998; Veening et al., 1987), e incluso ha llegado a considerarse el área más extensamente interconectada del hipotálamo. En este sentido, se ha mostrado que el hipotálamo lateral es atravesado por los siguientes haces de fibras: el haz del prosencéfalo medial, que se extiende desde el tallo cerebral hasta el bulbo olfatorio (Nieuwenhuys et al., 1982); el fórnix, que atraviesa al hipotálamo lateral, conectando al hipotálamo con los núcleos mamilares situados en la porción ventral del hipotálamo posterior; y por el tracto mamilotalámico (Saper et al., 1979).

2.2. Perfiles neuroquímicos de las neuronas del hipotálamo lateral.

Se ha descrito que el hipotálamo lateral está compuesto por diversas estirpes neuronales (para leer algunas revisiones al respecto, ver Adamantidis & de Lecea, 2008; Berthoud & Münzberg, 2011; Gerashchenko & Shiromani, 2004b).

Las neuronas del hipotálamo lateral sintetizan neurotransmisores clásicos, tales como el ácido- γ -aminobutírico (GABA) y el glutamato (glu) (para consultar una revisión al respecto, ver Meister, 2007). Igualmente, las neuronas del hipotálamo lateral sintetizan: sustancia P (Larsen, 1992; Ljungdahl et al., 1978), dinorfina (Chou et al., 2001), nesfatina-1 (Goebel-Stengel et al., 2011), neurotensina (Allen & Cechetto, 1995; Morin & Beaudet, 1998), el transcrito regulado por cocaína y amfetamina (CART) (Elias et al. 2001), hormona liberadora de hormona de

crecimiento (GHRH) (Sawchenko et al., 1985), neuropéptido Y (NPY) (Leger et al., 1987), el péptido inductor de sueño delta (DSIP) (Charnay et al., 1989), OX (de Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998) y MCH (Bittencourt et al., 1992). En los Apéndices B y C se ejemplifican los efectos de algunas de estas moléculas sobre el ciclo sueño-vigilia y la ingestión de alimento.

3. El sueño: definición.

De manera muy general, conductualmente el sueño es un estado recurrente de reposo caracterizado por una actividad motora reducida, acompañada por una disminución en la reactividad del sujeto hacia su entorno (Hobson, 1987).

En términos más particulares, el sueño es un estado reversible, asociado a una serie de cambios fisiológicos que incluyen una disminución en la actividad de la musculatura esquelética, movimientos oculares involuntarios y ritmos cerebrales. Como se detallará más adelante, estos movimientos oculares son esporádicos o rápidos, y los ritmos cerebrales son rápidos y mixtos, o lentos y sincronizados. En otras palabras: “El sueño es un estado complejo y altamente organizado, asociado a cambios reversibles en la consciencia, en las propiedades de disparo de redes neuronales, flujo sanguíneo cerebral, expresión de perfiles genéticos, química cerebral, y actividad del sistema nervioso autónomo” (Savage & West, 2007). Estos cambios fisiológicos no son los únicos que ocurren durante el sueño, pero son algunos de los más documentados en diversas especies animales.

Ya que en la presente Tesis Doctoral fueron empleadas ratas como sujetos experimentales, se ahondará en las características del ciclo sueño-vigilia de estos animales.

3.1. Variables electrofisiológicas empleadas para identificar el ciclo sueño-vigilia.

El ciclo sueño-vigilia –cuyos componentes son las fases de la vigilia y del sueño–, ha sido estudiado en diversas especies, a partir de la integración de patrones conductuales y electrofisiológicos (Jones, 2005). En otras palabras, además de que mediante la observación es posible discriminar si un sujeto está despierto o dormido, existen una serie de variables electrofisiológicas que nos permiten identificar las distintas etapas del ciclo sueño-vigilia. Estas variables involucran la actividad eléctrica del cerebro, la actividad muscular, e incluso el registro unitario de neuronas específicas (en modelos animales), entre otras.

3.2. Herramientas empleadas para identificar el ciclo sueño-vigilia.

El empleo simultáneo del electroencefalograma (EEG), del electromiograma (EMG) y del electrooculograma (EOG), se conoce como polisomnografía. A través de estas herramientas, se obtienen señales bioeléctricas que permiten identificar las diferentes fases del sueño en humanos y animales. Mientras que el EMG registra la actividad muscular (la actividad de los músculos de la nuca, en roedores) y el EOG registra los movimientos oculares (y se utiliza principalmente en humanos y gatos), el EEG permite registrar los ritmos cerebrales, mediante electrodos que se colocan en el cuero cabelludo de humanos, o directamente en el cráneo –o en el hipocampo– de animales. En el Apéndice D se describen las características del EEG.

3.3. Criterios para la identificación del ciclo sueño-vigilia en roedores.

En la rata –uno de los animales más utilizados para estudiar el sueño–, con base en las señales bioeléctricas obtenidas del EEG y del EMG, el ciclo sueño-vigilia se divide en:

Vigilia. Esta fase se caracteriza por un EEG aleatorio, o mixto, conformado por ondas de alta frecuencia –rápidas– y de bajo voltaje –baja amplitud–; y que van de 10 a 40 Hertz (Hz), en promedio –ritmos alfa (8-14 Hz), gamma/beta (15-120 Hz) y theta (4-8 Hz)–; y que tienen una amplitud que va de 5 a 50 microvolts (μV). El EMG está caracterizado por una actividad muscular elevada.

Sueño de ondas lentas (SOL). A esta etapa del sueño también se le conoce como ‘sueño lento’, ‘sueño sincronizado’, ‘sueño delta’ o ‘sueño no-MOR’, y está caracterizada por un EEG lento, conformado por ondas de baja frecuencia –ritmo delta, 0.5-2 Hz–, y alto voltaje –gran amplitud–, o sincronizadas; y que son menores a los 4 Hz; y que tienen una amplitud que va de 100 a 200 μV . El EMG de esta etapa muestra una actividad disminuida en comparación con el tono muscular de la vigilia.

Sueño de movimientos oculares rápidos (s-MOR). Está caracterizado por un EEG semejante al de la vigilia –rápido y de baja amplitud–, aunque con predominancia del ritmo theta –este ritmo es fácilmente detectable en el hipocampo–; por movimientos oculares rápidos e involuntarios, y por supresión del tono muscular. Asimismo, al s-MOR también se le conoce como ‘sueño activo’ o ‘sueño paradójico’, ya que el sujeto exhibe un EEG semejante al de la vigilia, pero está dormido. En oposición al SOL –caracterizado por ondas de alta amplitud que

reflejan la actividad sincrónica de diversas neuronas corticales–, al s-MOR se le llama también ‘sueño desincronizado.’

Estas señales bioeléctricas se califican visualmente, de acuerdo con un sistema estándar para humanos (Rechtschaffen & Kales, 1968), y un criterio estandarizado para roedores (Takeuchi, 1970; revisado en Robert et al., 1999). En la Figura 1 se ilustran trazos representativos de las fases del ciclo sueño-vigilia en la rata.

Más detalladamente, en roedores, algunos autores dividen a la vigilia en ‘activa’ y ‘pasiva’ (para ver un ejemplo, leer Mileykovskiy et al., 2005); y al SOL, en etapas I y II (para ver un ejemplo, leer Murillo-Rodríguez et al., 1998).

En resumen, la vigilia se define como ‘activa’ cuando el sujeto, además de estar despierto, interactúa enérgicamente con su entorno (EEG mixto y EMG elevado); y se define como ‘pasiva’ cuando el sujeto está despierto, pero no interactúa enérgicamente con su entorno (EEG mixto y EMG disminuido).

Asimismo, aunque en la actualidad esta subdivisión es obsoleta, las fases I y II del SOL se discriminan con base en la cantidad de ondas lentas representadas en cada ventana de registro. A su vez, cada ventana de registro está conformada por una época, típicamente constituida por 10 ó 12 s. De esta forma, una época se identifica como SOL-I cuando incluye menos del 50% de ondas lentas y como SOL-II cuando incluye más del 50%. SOL-I y SOL-II corresponden a la somnolencia y al sueño profundo, respectivamente. Es importante señalar que para identificar cualquier etapa del ciclo sueño-vigilia, se deben considerar al menos tres épocas consecutivas con el mismo patrón.

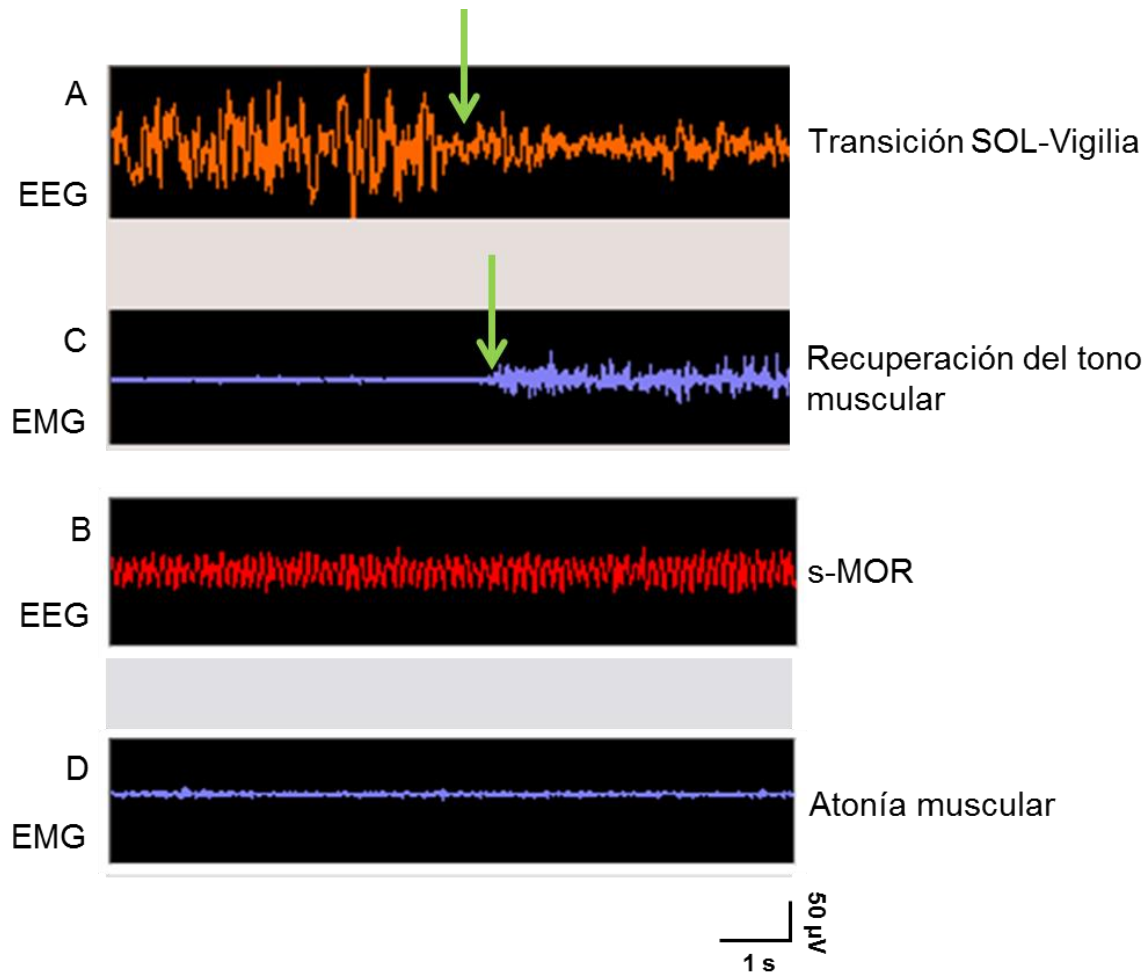


Figura 1. Se ilustran trazos característicos de la actividad del EEG (A y B) y del EMG (C y D), correspondientes a una transición de Sueño de Ondas Lentas (SOL) a Vigilia (A y C) y a un episodio de s-MOR (B y D), de una rata empleada en la presente Tesis Doctoral. La flecha indica la transición de SOL a Vigilia en los trazos del EEG y del EMG. Cada ventana de registro, está conformada por una época de 10 segundos (s). Señales obtenidas en el laboratorio del Dr. Próspero-García, empleando el programa ICELUS (Mark Opp; véanse las secciones **13.1** y **13.4**).

3.4. Moléculas involucradas en la regulación del ciclo sueño-vigilia.

Los ritmos cerebrales detectados a través del EEG están asociados a la actividad de grupos neuronales que sintetizan neurotransmisores clásicos tales como el GABA, la acetilcolina (ACh), la noradrenalina (NA), la serotonina (5-HT) y la

histamina (His) (para consultar un par de revisiones, léanse Brown et al., 2012; y Jones, 2005). Además de estos neurotransmisores, se han identificado otra clase de moléculas que participan en la generación y el mantenimiento de distintos componentes del ciclo sueño-vigilia. Un par de ejemplos de esta clase de moléculas son los neuropéptidos (Prospéro-García & Méndez-Díaz, 2004) y los endocannabinoides (Prospéro-García, Herrera-Solís, Méndez-Díaz, Ruiz-Contreras, & Pérez-Morales, 2009). En el contexto de la presente Tesis Doctoral serán descritos: 1) el s-MOR, 2) los neuropéptidos OX y MCH del hipotálamo lateral, y 3) los endocannabinoides.

4. Perspectiva histórica de la investigación del sueño.

De acuerdo con Swartz (1998), los primeros registros de actividad eléctrica del cerebro que se documentaron se llevaron a cabo en conejos, monos y perros, y corrieron a cargo de Caton y Beck, en 1875 y en 1890, respectivamente; sin embargo, el primer registro de este tipo llevado a cabo en humano fue hecho por Berger, quien colocó electrodos en el cuero cabelludo de su propio hijo, en 1924. Berger, además de acuñar el término 'Electroencefalograma', publicó sus resultados, bajo el título de *Über das Elektrenkephalogramm des Menschen* (Sobre el Electroencefalograma en humanos), hasta 1929 (revisado en Haas, 2003). En este trabajo, Berger documentó claras diferencias entre los ritmos cerebrales de la vigilia y del sueño.

Posteriormente, Frédéric Bremer (1935) registró el EEG de gatos a los que había sometido a una de dos preparaciones. La preparación de 'cerebro aislado'

consistía en realizar un corte a nivel intercolicular, separando el cerebro anterior del tallo cerebral. Este corte privaba al cerebro de impulsos sensoriales ascendentes, salvo los olfativos y los ópticos. La preparación de 'encéfalo aislado' consistía en realizar un corte a nivel de la médula espinal, con la intención de evitar que la estimulación sensorial periférica llegara al encéfalo, pero dejando los nervios craneales intactos. Bremer observó que los gatos sometidos a la preparación 'cerebro aislado' mostraban un EEG sincronizado de manera permanente (i.e., como si los animales estuvieran dormidos), semejante al de un estado comatoso, mientras que aquéllos sometidos a la preparación de 'encéfalo aislado' mostraban un EEG que transitaba normalmente de la vigilia al sueño. Estos resultados hicieron concluir a Bremer que, en su aproximación experimental, el sueño (i.e., EEG sincronizado) era el resultado de una cantidad insuficiente de estímulos sensoriales que, como consecuencia, no eran capaces de despertar a los animales. Sin embargo, Moruzzi y Magoun (1949), empleando la preparación 'cerebro aislado', estimularon eléctricamente diversas regiones localizadas en el tallo cerebral, y encontraron que la estimulación de la Formación Reticular bastaba para inducir un despertar electroencefalográfico, cada vez que el animal mostraba un EEG sincronizado antes de la estimulación. De manera importante, al dejar de estimular eléctricamente la Formación Reticular, el EEG de los animales volvía a sincronizarse. Estos resultados llevaron a Moruzzi y a Magoun a postular la existencia del 'Sistema Activador Reticular Ascendente', encargado de promover la vigilia. Asimismo, estos hallazgos sugirieron que el sueño era un estado más complejo que el que se había supuesto hasta entonces, y que no dependía de la ausencia de estimulación sensorial, sino que, de algún modo, los grupos

neuronales situados entre el cerebro anterior y el tallo cerebral, eran responsables de generar las transiciones entre los distintos estados de vigilia.

Aunque en un principio tanto Frédéric Bremer como Giuseppe Moruzzi, creían que el sueño era un estado pasivo que resultaba de la ausencia de estimulación de los sistemas sensoriales, eventualmente, apoyados en los hallazgos de Moruzzi y Magoun (1949), ambos investigadores refutaron esta noción (revisado en Kerkhofs & Lavie, 2000; Steriade, 2005).

A pesar de estos notables hallazgos, Constantine von Economo, como será mencionado en detalle en las siguientes secciones, probablemente es el investigador más influyente respecto a las estructuras cerebrales que intervienen en el control del sueño. En resumen, mientras él investigaba el virus pandémico que comenzó al final de la primera Guerra Mundial y que cobró la vida de millones de personas –al cual se denominó ‘encefalitis letárgica’–, hizo observaciones importantes en pacientes afectados por éste. von Economo correlacionó los síntomas clínicos del insomnio y de la letargia continua con dos porciones cerebrales dañadas. Las lesiones en el POA y en el hipotálamo anterior provocaban insomnio y movimientos hipercinéticos, mientras que las lesiones del hipotálamo posterior causaban somnolencia, letargia continua y anormalidades en los movimientos oculares. Ahora sabemos que la porción ventrolateral del POA (VLPO) es un componente relevante para la regulación del sueño y que las neuronas promotoras de la vigilia que sintetizan a los péptidos OX se distribuyen en las regiones posterolaterales del hipotálamo, pero alrededor de 1920, von Economo, identificó que las lesiones del hipotálamo anterior usualmente se extendían al diencefalo, i.e. a los núcleos de la base, mientras que las lesiones del

hipotálamo posterior se asociaban con lesiones en la sustancia gris periacueductal y que se extendían frecuentemente a los núcleos oculomotores (revisado en Pelayo & Guilleminaut, 2009). Estas observaciones permitieron que von Economo especulara que el hipotálamo anterior incluía un centro cerebral responsable de generar el sueño, mientras que una región situada entre las paredes posteriores del tercer ventrículo y el nervio oculomotor, i.e. el hipotálamo posterior, contenía un centro cerebral encargado de generar la vigilia. Asimismo, von Economo especuló que la patología de la narcolepsia involucraba también al hipotálamo posterior (revisado en Pelayo & Guilleminaut, 2009).

A pesar de estos hallazgos, la noción que se tenía acerca del sueño cambió drásticamente con el descubrimiento del s-MOR, puesto que hasta entonces se consideraba al sueño como un único estado. Un par de secciones adelante, se ahondará en el s-MOR.

4.1. Circuitería hipotalámica responsable de la regulación del ciclo sueño-vigilia.

Constantine von Economo, apoyado en sus notables estudios sobre encefalitis letárgica, descritos por primera vez en 1917, y que revelaron que la lesión de la porción anterior del hipotálamo provocaba un insomnio excesivo, mientras que el daño de la región posterior del hipotálamo causaba somnolencia excesiva, no sólo fue el primero en sugerir que estaban involucrados mecanismos hipotalámicos en la regulación del ciclo sueño-vigilia, sino que, además, inspirado por el estudio de estas enfermedades, fue el primero en sugerir la existencia de centros reguladores

del sueño y de la vigilia en el cerebro, y sus trabajos sentaron las bases para la neurociencia del sueño (Triarhou, 2006; Sak & Grzybowski, 2012).

De acuerdo con lo anterior, desde los hallazgos de von Economo, se ha demostrado la participación del hipotálamo en la regulación del ciclo sueño-vigilia mediante diversas aproximaciones experimentales (para leer algunas revisiones al respecto, ver Rolls et al., 2010; Saper et al., 2005; Szymusiak & McGinty, 2008).

Para empezar, se ha documentado que las neuronas del núcleo tuberomamilar (TMN), i.e. el centro cerebral responsable de promover la vigilia (junto con el hipotálamo lateral, de acuerdo con von Economo) sintetizan el neurotransmisor His, y la evidencia experimental que ha apoyado la noción de que el sistema histaminérgico promueve la vigilia (para leer una revisión al respecto, ver Goutagny et al., 2004; y Thakkar, 2011), incluye estudios farmacológicos con gatos (Lin et al., 1998), estudios de ablación de neuronas histaminérgicas en ratas (Gerashchenko et al., 2004a) y estudios con ratones *knockout* para la histidina decarboxilasa (carentes del gen para la histidina decarboxilasa), la enzima responsable de la biosíntesis de la histamina (Parmentier et al., 2002). Por otra parte, en ratas, mediante inmunohistoquímica contra la proteína c-Fos, empleada como marcador de activación neuronal, se ha reportado que el POA, en particular las neuronas del VLPO y del núcleo preóptico mediano (MnPO), ubicado en la región anterior del hipotálamo y correspondiente al centro cerebral responsable de promover el sueño según von Economo, está activo durante el SOL. De manera complementaria, estudios con trazadores anterógrados en roedores, han mostrado que las neuronas del POA proyectan al TMN (Sherin et al., 1996) y a la región perifornical del hipotálamo lateral (PeF) (Ushakov et al., 2006). En el PeF se

localizan principalmente las neuronas orexinérgicas (Nambu et al., 1999), que han sido ampliamente identificadas como promotoras de la vigilia (más adelante se describirá en detalle la participación de estas neuronas en la regulación del ciclo sueño-vigilia). En el mismo sentido, se ha reportado que la lesión con ácido iboténico de las neuronas del VLPO provoca insomnio en la rata (Lu et al., 2000). Asimismo, estudios de electrofisiología llevados a cabo en gatos, han mostrado que las neuronas del VLPO y del MnPO tienen su máxima tasa de disparo durante el SOL (Kaitin, 1984; Szymusiak & McGinty, 1986). Igualmente, ya que se ha observado tanto en ratas como en gatos que las neuronas del POA sintetizan el neurotransmisor inhibitorio GABA (Gong et al., 2004) y el neuropéptido inhibitorio galanina (Gaus et al., 2002), y que las neuronas del MnPO son responsables de la instalación del SOL mientras que las neuronas del VLPO son responsables del mantenimiento de esta fase (Gvilia et al., 2006), como un todo, esta evidencia sugiere que las neuronas del POA, activas durante el SOL, inhiben tanto al TMN como a las neuronas orexinérgicas, para instalar el SOL.

Tal y como se ilustra en la Figura 2, la regulación del ciclo sueño-vigilia no depende exclusivamente de mecanismos hipotalámicos, sino que también depende de la interacción entre las neuronas colinérgicas promotoras del s-MOR (Kayama et al., 1992) y las neuronas monoaminérgicas del tallo cerebral promotoras de la vigilia (Aston-Jones et al., 1981; Jacobs & Fornal, 1999; Takahashi et al., 2010); sin embargo, el descubrimiento de los péptidos OX y MCH, su localización exclusiva en el hipotálamo lateral, la participación de la deficiencia de orexinas en la narcolepsia y el hallazgo de que las neuronas MCHérgicas están involucradas en la generación del s-MOR, impulsaron una gran

cantidad de información relacionada con la interacción neuroanatómica y funcional de estos péptidos con el ciclo sueño-vigilia y con la ingestión de alimento. Más adelante se describirá la evidencia experimental que sustenta la participación del hipotálamo lateral y de los péptidos OX y MCH, en estos procesos.

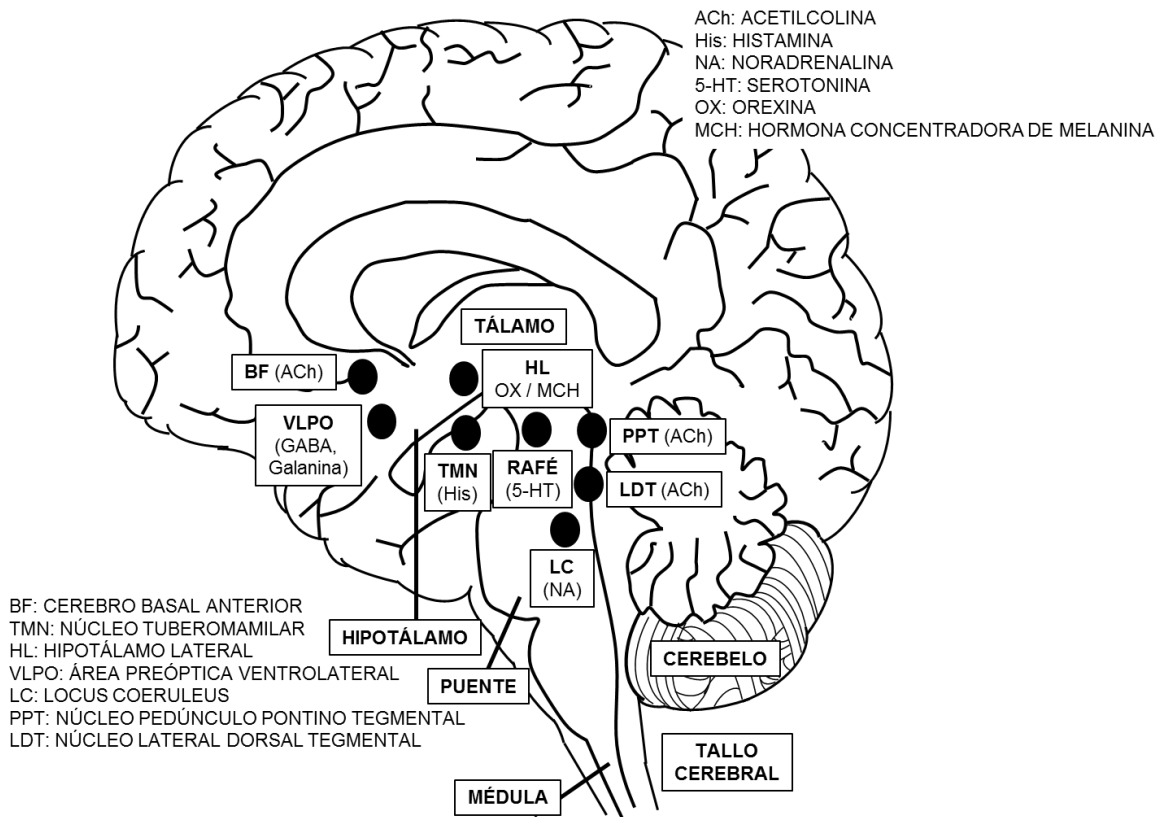


Figura 2. Esquema que corresponde a una vista sagital del cerebro humano, donde se ilustra la localización aproximada de los núcleos responsables de la regulación del ciclo sueño-vigilia, así como los neurotransmisores o los neuropéptidos que sintetizan. Los significados de las abreviaturas se incluyen en la esquina inferior izquierda. Modificado de Saper et al., 2005.

4.2. El hipotálamo lateral y su influencia sobre el ciclo sueño-vigilia.

Basado exclusivamente en observaciones de la conducta, después de realizar incisiones a diferentes niveles del hipotálamo de ratas, Nauta (1946) demostró que la región preóptica de esta estructura cerebral desempeñaba una función importante para promover el sueño, mientras que las porciones posterior y lateral eran responsables del mantenimiento de la vigilia. En el mismo sentido, Levitt y Teitelbaum (1975) documentaron un 'estupor somnoliento' después de someter a ratas a un procedimiento quirúrgico en el que se les lesionaba el hipotálamo lateral.

De manera complementaria, Shoham y Teitelbaum (1982) reportaron un estado de bajo alertamiento al que llamaron 'vigilia somnolienta', en ratas a las cuales se había lesionado electrolíticamente el hipotálamo lateral y que además habían sido implantadas con electrodos para registrar el EEG y el EMG para evaluar el ciclo sueño-vigilia.

A pesar de que este conjunto de evidencia experimental sugirió la participación del hipotálamo lateral como un centro promotor de la vigilia, los resultados no fueron del todo concluyentes, ya que el tipo de lesiones electrolíticas realizadas a los animales de estos estudios pudo también haber destruido fibras de paso, y, de este modo, involucrar a otras regiones cerebrales.

5. Sueño de movimientos oculares rápidos.

El descubrimiento del sueño de movimientos oculares rápidos (s-MOR) se atribuye a Nataniel Kleitman y a Eugene Aserinsky, quienes, al observar el sueño en infantes, obtuvieron datos que sugirieron la presencia de una 'motilidad ocular

rítmica' (revisado en Pelayo & Guilleminault, 2009). Más tarde, Aserinsky y Kleitman (1953) no sólo verificaron, mediante el empleo del EOG y del EEG, movimientos oculares rápidos durante el sueño en adultos, sino que sugirieron la existencia de ensoñaciones en estos periodos de motilidad ocular, y decidieron denominar a este estado 'sueño de movimientos oculares rápidos.' Estos movimientos oculares ocurrían de manera cíclica, aproximadamente cada 90 minutos, y estaban acompañados por una respiración irregular y una tasa cardiaca acelerada, mientras el EEG mostraba ondas de bajo voltaje y de alta frecuencia. Posteriormente, M. Jouvet y F. Michel (Jouvet & Michel, 1959; revisado en Luppi et al., 2007) identificaron en el gato un estado fisiológico similar al que habían reportado Aserinsky y Kleitman (1953) en humanos. Debido a que este estado, además de caracterizarse por movimientos oculares y atonía muscular, incluía un EEG rápido y corto, semejante al de la vigilia, mientras el gato permanecía dormido e irresponsivo, Jouvet decidió denominarlo 'sueño paradójico.'

5.1. Núcleos responsables de la generación del s-MOR.

En la década de los 60's, una serie de estudios con lesiones electrolíticas y químicas en el gato permitió identificar las estructuras del tallo cerebral que parecían necesarias y suficientes para generar y mantener el s-MOR (Jouvet, 1962; revisado en Luppi et al., 2013). De este modo, se sugirió que el Pontis Oralis (PnO) y el Pontis Caudalis (PnC), a los cuales también se conoce bajo el nombre de peri-locus coeruleus α (peri-LC α), así como el núcleo subcoeruleus (SubC), localizado ventralmente al locus coeruleus (LC), eran las regiones responsables de la generación del s-MOR (Figura 3). Más tarde, una serie de estudios

farmacológicos llevados a cabo en gatos (George et al., 1964; Velluti & Hernández-Peón, 1963) y en humanos (Sitaram et al., 1977), confirmaron la participación de estos núcleos, y sugirieron la participación de la ACh en la generación del s-MOR. Complementariamente, se mostró que los núcleos lateral dorsal tegmental (LDT) y pedúnculo pontino tegmental (PPT), contienen neuronas que disparan tónicamente durante el s-MOR (Sakai, 1985; revisado en Luppi et al., 2013). De este modo, se propuso una interacción inhibitoria entre grupos celulares colinérgicos y monoaminérgicos, responsable de la generación del s-MOR (Karczmar et al., 1970), y durante muchos años se creyó que el s-MOR dependía exclusivamente de la actividad de las neuronas colinérgicas.

En 1998 se reportó la existencia, en la rata, de una región análoga al peri-LC α y al SubC del gato; y se le llamó núcleo sublateral dorsal del tegmento (SLD) (Swanson, 1998; revisado en Luppi et al., 2007). De manera inesperada, aunque se había mostrado que la administración de carbacol, un agonista colinérgico, en el SubC del gato incrementa el s-MOR (Shiromani et al., 1986), la administración de carbacol en el SLD de la rata no produjo el mismo efecto (Boissard et al., 2002). De manera adicional, otros trabajos sugirieron que la ACh no era el único neurotransmisor involucrado en la generación del s-MOR en el tallo cerebral (Maloney et al., 1999; Verret et al., 2005). Más tarde, Lu et al. (2006) y Clément et al. (2011) mostraron, mediante hibridación *in situ* para el RNA mensajero (mRNA) del transportador vesicular de glutamato tipo 2 (VGLUT₂) e inmunohistoquímica contra c-Fos, respectivamente, la existencia de neuronas glutamatérgicas en el SLD, y las identificaron como neuronas activas durante el s-MOR.

Complementariamente a estos hallazgos, en la última década se ha postulado la participación del péptido MCH, sintetizado por neuronas del hipotálamo lateral, como una molécula involucrada en la generación del s-MOR, tal y como se describirá más adelante.

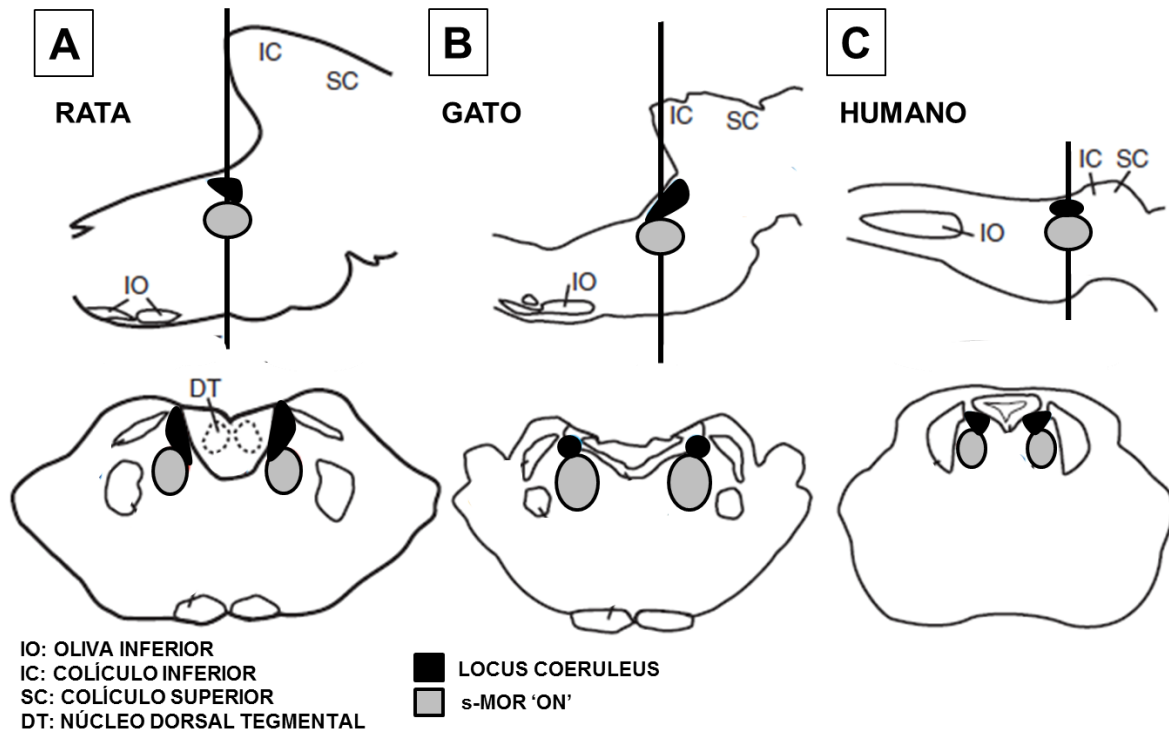


Figura 3. Vistas sagitales (arriba) y coronales (abajo) de los cerebros de rata (A), de gato (B) y de humano (C), en las cuales se ilustra la localización de los núcleos responsables de la generación del s-MOR (s-MOR 'ON') para cada especie. Se emplea como referencia anatómica el Locus Coeruleus. Los significados de las abreviaturas se incluyen en la esquina inferior izquierda. Modificado de Siegel, 2006.

5.2. Atonía muscular durante el s-MOR.

En resumen, la atonía muscular característica del s-MOR es el resultado de la inhibición de las motoneuronas alfa de la médula espinal, y es regulada por el tallo cerebral (Pace-Shott, 2009). Diversos estudios realizados en gatos y en ratas han

documentado la existencia de proyecciones glutamatérgicas de los núcleos del tallo cerebral responsables de la generación del s-MOR (peri-LC α , SubC, en el gato; y SLD, en la rata) hacia neuronas GABAérgicas y glicinérgicas de núcleos de la Formación Reticular y de la porción medial del bulbo raquídeo (revisado en Siegel, 2011). Estas proyecciones glutamatérgicas, al excitar a las neuronas inhibitoras GABAérgicas y glicinérgicas de la porción medial del bulbo raquídeo, promueven indirectamente la inhibición de motoneuronas en la médula espinal; y también inactivan a las neuronas noradrenérgicas del LC que se han asociado tradicionalmente con la facilitación del tono muscular (Mileykovskiy et al., 2000). Más detalladamente, una serie de trabajos han reportado la existencia de proyecciones glutamatérgicas del SLD hacia neuronas GABAérgicas y glicinérgicas del Rafé Magnus (RMg) y de los núcleos reticulares Gigantocelular ventral (GiV), Gigantocelular α (Gi α) y lateral paragigantocelular (LPGi) (Boissard et al., 2002; y Sirieix et al., 2012; revisado en Luppi et al., 2013). Debido a que previamente se había mostrado que la administración de agonistas glutamatérgicos en estos núcleos inducía supresión del tono muscular (Lai & Siegel, 1991) y que la lesión citotóxica del GiV y del Gi α inducía un incremento en el tono muscular en periodos de s-MOR en gatos (Holmes & Jones, 1994), actualmente se cree que las proyecciones glutamatérgicas del SLD, núcleo activo durante el s-MOR, son responsables de suprimir indirectamente el tono muscular característico de esta fase del sueño (revisado en Siegel, 2011).

Más adelante se describirán a los endocannabinoides y su participación como moduladores del sueño y promotores de la ingestión de alimento. Debido a que en la presente Tesis Doctoral se reportan efectos cannabinoides, i.e. aumento en el s-

MOR y en la ingestión de alimento, inducidos por la estimulación del receptor activado por proteínas 1 (PAR₁) en el hipotálamo lateral, en la siguiente sección se describirá brevemente la participación del hipotálamo, y en particular del hipotálamo lateral, con relación a este proceso fisiológico.

6. La ingestión de alimento: definición.

La ingestión de alimento, en mamíferos, incluyendo a los humanos, es una conducta cuya función primaria consiste en proveer los nutrientes necesarios para restablecer la continua demanda de energía de los tejidos corporales (Sainsbury et al., 2002). Asimismo, este proceso está influenciado por el apetito, la saciedad y los mecanismos fisiológicos que equilibran la alimentación con las reservas calóricas internas y con un peso corporal estable (Saper et al., 2002).

6.1. Circuitería hipotalámica responsable de la regulación de la ingestión de alimento.

El hipotálamo ha sido reconocido ampliamente como una estructura cerebral responsable de regular la ingestión de alimento (Barson et al., 2013); sin embargo, la primera evidencia que apoyó esta noción corrió a cargo de Camus y Roussy, en perros (1913, 1920 y 1922), y de Smith, en ratas (1927 y 1930), de acuerdo con Kennedy (1950). Estos autores observaron que la remoción de la pituitaria en sus sujetos de estudio no inducía obesidad, siempre y cuando la base del cerebro (i.e., el hipotálamo) no sufriera daño. Más tarde, se documentó que la lesión electrolítica del hipotálamo de ratas, gatos y monos inducía hiperfagia o afagia,

dependiendo del sitio de lesión. Básicamente, los animales sometidos al daño del VMH comían vorazmente y subían de peso (Hetherington & Ranson, 1940), mientras que los animales sometidos a lesiones del hipotálamo lateral comían menos, e incluso podían llegar a morir por inanición (Annand & Brobeck, 1951).

A partir de estos hallazgos, se postuló la hipótesis 'dual' de la ingestión de alimento, según la cual el hipotálamo lateral fungía como un centro cerebral del apetito y el VMH como un centro de saciedad (Epstein, 1960; revisado en Seeley, 2006). Desde entonces, se ha mostrado que el hipotálamo participa en la modulación de la homeostasis de los procesos fisiológicos del hambre y de la saciedad, y se ha descrito que incluye núcleos que sintetizan moléculas que promueven o inhiben la ingestión alimento (para consultar una revisión, léase Berthoud, 2002). Por ejemplo, las neuronas del ARC del hipotálamo sintetizan al NPY, a la proteína relacionada al gen agouti (AgRP), a la hormona estimulante de melanocitos-alfa (α -MSH) y al CART. Mientras que el NPY y la AgRP son moléculas orexigénicas, la α -MSH y el CART son anorexigénicas (para consultar una revisión, léase Sainsbury et al., 2002). De modo interesante, estas neuronas, así como las de otros núcleos hipotalámicos, no solamente interactúan entre ellas sino que además son sensibles a señales de la periferia que promueven –como la Ghrelina–, o que inhiben –como la leptina–, la ingestión de alimento (para leer algunas revisiones, ver Anubhuti et al., 2006; Prospéro-García et al., 2013). En la Figura 4 se ilustran en un esquema los núcleos hipotalámicos que intervienen en la regulación de la ingestión de alimento, así como las moléculas sintetizadas por las neuronas de estos núcleos.

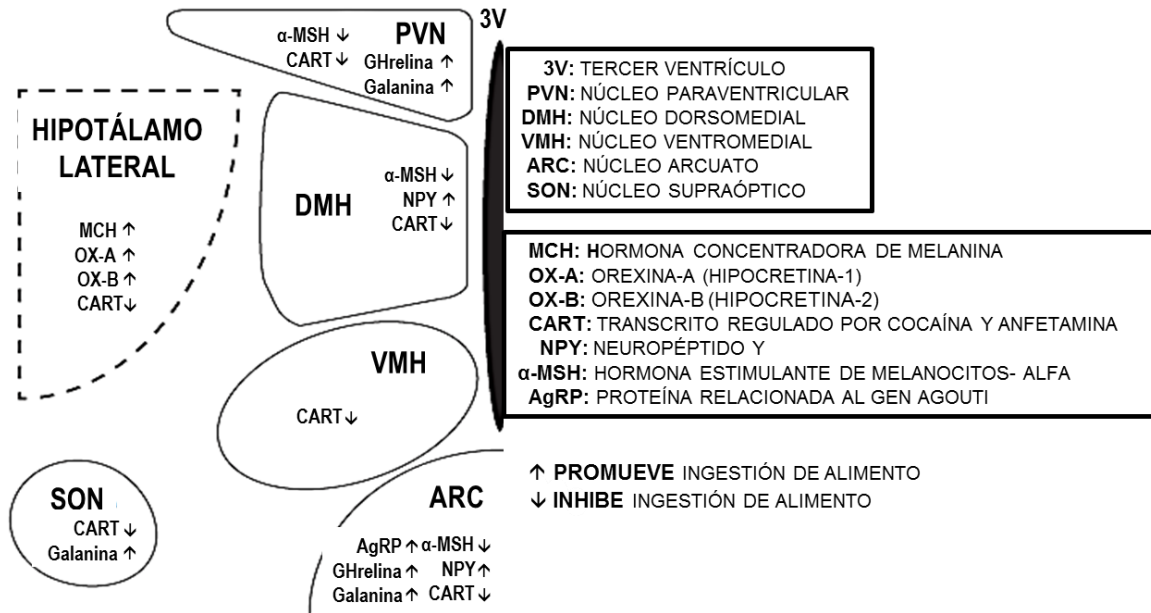


Figura 4. Esquema que corresponde a un corte coronal del cerebro (un hemisferio), en donde se muestra la localización de los núcleos hipotalámicos involucrados en la regulación de la ingestión de alimento, así como algunas de las moléculas orexigénicas o anorexigénicas que sintetizan las neuronas de estos núcleos. Los significados de las abreviaturas se incluyen en los recuadros. Modificado de Parker & Bloom, 2012.

6.2. El hipotálamo lateral y su influencia sobre la ingestión de alimento.

La ingestión de alimento, de acuerdo con Willie et al. (2001) es “una conducta compleja que integra factores metabólicos, autonómicos, endocrinos y ambientales, coordinados con un estado apropiado de alertamiento cortical.”

Con base en esta definición, el hipotálamo ha sido identificado como un complejo centro cerebral que regula el componente homeostático, i.e. “el deseo de comida”, de la ingestión de alimento (Berridge et al., 2010), al incluir núcleos que promueven o inhiben el apetito. Uno de estos núcleos hipotalámicos es el hipotálamo lateral.

Aunque se ha documentado ampliamente la participación del hipotálamo lateral en la regulación de la ingestión de alimento, no fue sino hasta mediados del siglo XX cuando Annand y Brobeck (1951) y Annand y Delgado (1953) aportaron evidencia experimental sugiriendo que el hipotálamo lateral promovía la ingestión de alimento, ya que la lesión electrolítica o la estimulación eléctrica de esta área inducía afagia o hiperfagia, respectivamente, en ratas y gatos. De modo complementario, después de los trabajos de Annand (Annand & Brobeck, 1951; Annand & Delgado, 1953), algunos reportes de experimentos *in vitro* mostraron que algunas neuronas del hipotálamo lateral eran sensibles a la glucosa (i.e., incrementaban, o reducían, sus tasas de disparo en presencia de diferentes cantidades de glucosa) en rebanadas de cerebro de roedor (Shibata et al., 1982; Orsini et al., 1992). Asimismo, Katafuchi et al. (1985) reportaron que algunas neuronas del hipotálamo lateral incrementaban sus tasas de disparo cuando la ingestión de alimento era inducida por la inhibición de glucosa y también cuando los animales comenzaban a comer de manera espontánea. Igualmente, Himmi et al. (1988) reportaron este fenómeno, al registrar la actividad unitaria de neuronas del hipotálamo lateral de ratas anestesiadas. Estos hallazgos se discutieron en términos de la teoría glucostática de la ingestión de alimento (Mayer et al., 1967), en la cual se sugería que la ingestión de alimento dependía de un estado celular de glucoprivación.

Con base en estos antecedentes, en la última parte de la década de los 90's, un par de grupos de investigación liderados por J. Gregor Sutcliffe, del Scripps Research Institute de La Jolla, California, y por Masashi Yanagizawa, del Southwestern Medical Center de la Universidad de Texas, buscaron moléculas en

el hipotálamo lateral de roedores, para aislarlas y posteriormente explorar su potencial participación en la ingestión de alimento. De este modo, ambos grupos de investigación reportaron la existencia de un par de péptidos sintetizados por neuronas del hipotálamo lateral y que participan, al menos parcialmente, en la regulación del apetito (de Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998). El grupo de Yanagisawa decidió llamar a estos péptidos “orexinas” (“orexis” significa “apetito” en griego) mientras que el grupo de Sutcliffe optó por llamarlos “hipocretinas” (porque estas moléculas, además de ser sintetizadas en el *hipotálamo*, eran semejantes estructuralmente a la secretina, la hormona del duodeno que regula el pH a través del control del ácido gástrico y de la estimulación de la secreción de bicarbonato por el páncreas).

Como se detallará en las siguientes secciones, mediante aproximaciones farmacológicas se ha demostrado que las orexinas incrementan la ingestión de alimento en animales saciados, incluyendo roedores (Sakurai et al., 1998; Edwards et al., 1999; Yamanaka et al., 1999), cerdos (Dyer et al., 1999), cabras (Nagamine et al., 2003) y ovejas (Sartin et al., 2001). Asimismo, se ha reportado que el bloqueo del receptor 1 a OX (OX₁R) decrementa la ingestión de alimento en ratas sometidas crónicamente a una dieta alta en grasas (White et al., 2005), y que la ablación de neuronas orexinérgicas resulta en hipofagia moderada en ratones, siendo más evidente este efecto en la fase de actividad de los animales (Hara et al., 2001), pero, de manera importante, con relación a las neuronas del hipotálamo lateral sensibles a la glucosa y reportadas previamente por otros autores, también se ha descrito que las neuronas orexinérgicas son sensibles a la glucosa (Muroya et al., 2001; Burdakov et al., 2005). Sin embargo, otros autores

han observado que estas neuronas no exhiben respuestas eléctricas a la glucosa (Liu et al., 2001), aunque también se ha mostrado inmunoreactividad a c-Fos en éstas durante la hipoglicemia (Cai et al., 2001). No obstante, la investigación científica con respecto al sistema conformado por las orexinas y sus receptores se ha abordado más importantemente con relación al mantenimiento de la vigilia (Ohno & Sakurai, 2008).

6.3. Las neuronas del hipotálamo lateral sintetizan péptidos orexigénicos que también modulan el ciclo sueño-vigilia.

De la misma forma en que se ha mostrado que algunas moléculas hipotalámicas participan en la modulación tanto de la ingestión de alimento como del ciclo sueño-vigilia (Méndez-Díaz et al., 2009), el hipotálamo lateral incluye los neuropéptidos OX y MCH. Éstos son sintetizados por poblaciones independientes de neuronas de esta región cerebral (Bittencourt et al., 1992; Broberger et al., 1998; Hahn, 2010; Steininger et al., 2004), y se han involucrado con la regulación de la ingestión de alimento y del ciclo sueño-vigilia. En primera instancia, una serie de estudios independientes mostraron que ambos péptidos, OX y MCH, estimulan el apetito en roedores alimentados *ad libitum* (Della-Zuana et al., 2002; Edwards et al., 1999); sin embargo, posteriormente, las neuronas que sintetizan MCH fueron identificadas como promotoras del s-MOR, mientras que las neuronas que sintetizan OX fueron identificadas como reguladoras del mantenimiento de la vigilia.

7. Los neuropéptidos OX y MCH del hipotálamo lateral.

Los estudios pioneros de lesión electrolítica y de estimulación eléctrica del hipotálamo lateral, sugirieron que esta área participaba en la regulación del hambre y en el mantenimiento de la vigilia. Desde entonces, aun cuando los mecanismos cerebrales que regulan el ciclo sueño-vigilia y la ingestión de alimento –así como las moléculas que participan en la modulación de ambos procesos– se han identificado ampliamente a través de diversas aproximaciones experimentales, incluyendo modelos animales y pacientes humanos, con el descubrimiento relativamente reciente de los péptidos MCH y OX, sintetizados por poblaciones independientes de neuronas de esta área, no sólo se ha confirmado que el hipotálamo lateral está involucrado en ambos procesos fisiológicos sino que ha sido revelada su importancia funcional, ya que a pesar de que ambos neuropéptidos promueven la ingestión de alimento, las neuronas que los sintetizan modulan diferencialmente el ciclo sueño-vigilia, como se mencionará en detalle en la siguiente sección.

7.1. Las orexinas.

Las orexinas fueron descubiertas casi simultáneamente por dos grupos de investigación, en roedores (de Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998). Desde su descubrimiento, se ha reportado la existencia de estos péptidos en humanos (Elias et al., 1998), gatos (Zhang et al., 2001), ovinos (Molik et al., 2008), porcinos (Malek et al., 2000), y también en vertebrados no mamíferos como las ranas (Shibahara et al., 1999), las aves, los reptiles y los peces (para consultar una revisión, léase Volkoff, 2012). Asimismo, se ha descrito que las orexinas existen

en dos clases, derivadas del mismo precursor, prepro-orexina (también conocido como prepro-hipocretina): orexina-A (OX-A; hipocretina-1) y orexina-B (OX-B; hipocretina-2). Estos péptidos están conformados por 33 y 28 aminoácidos, respectivamente, aunque la OX-A está totalmente conservada en mamíferos y la OX-B de rata y humano difieren en dos aminoácidos (Sakurai et al., 1998). OX-A y OX-B ejercen sus efectos biológicos a través de dos receptores acoplados a proteínas G: el receptor a orexina tipo 1 (OX₁R, el cual es selectivo para la OX-A) y el receptor a orexina tipo 2 (OX₂R, el cual es activado por OX-A y OX-B) (Marcus et al., 2001). La OX-A está totalmente conservada en mamíferos, en tanto que las OX-B de roedor y de humano son distintas, ya que la OX-B de humano incluye dos sustituciones de aminoácidos que no tiene la OX-B de roedor (Sakurai et al., 1998). Asimismo, se ha calculado que el número de neuronas que sintetizan OX en la rata es de aproximadamente 3, 000 (Peyron et al., 1998), mientras que en el humano es de aproximadamente 70, 000 (Thannickal et al., 2000). De manera general, las OX actúan primordialmente como un neurotransmisor excitador responsable de controlar las actividades neuronales de grupos monoaminérgicos y colinérgicos (revisado en Bayard & Dauvilliers, 2013). Por otra parte, se ha mostrado que las OX, además de estar involucradas con el mantenimiento de la vigilia, como se mencionará en detalle más adelante, ejercen una influencia importante en la adicción a diversas drogas de abuso y en conductas relacionadas al reforzamiento (para consultar algunas revisiones, léanse Mahler et al., 2012; y Aston-Jones et al., 2010), sugiriendo que al ser indispensables para la vigilia sostenida, las OX también están involucradas en procesos fisiológicos que requieren un nivel óptimo de alertamiento. En este contexto, también se ha

documentado que la administración de un antagonista del OX₁R en la región CA1 del hipocampo deteriora la adquisición, la consolidación y la recuperación de información en una tarea de memoria espacial en ratas (Akbari et al., 2006), y, complementariamente, que tanto la administración intra-nasal como la inyección intravenosa de OX-A a monos Rhesus privados de sueño por un periodo de 30 a 36 h mejora su desempeño en una tarea de memoria a corto plazo (Deadwyler et al., 2007). Estos datos no sólo apoyan que las OX, y en particular la OX-A, al facilitar la vigilia, modulan el nivel de alertamiento de un organismo, sino que también esta facilitación se refleja en procesos de aprendizaje.

7.2. Hormona concentradora de melanina (MCH).

MCH primero fue aislada de las pituitarias del salmón (Kawauchi et al., 1983) y se documentó que su función consistía en regular el cambio de color en los peces de la familia teleósteos, como el bagre, al promover la agregación de pigmentos (para consultar una revisión, léase Kawauchi et al., 2006), pero más tarde se identificó la existencia de este péptido en el humano (Presse et al., 1990; Shi, 2004), la rata (Nahon et al., 1989), el ratón (Breton et al., 1993) y el gato (Tortero et al., 2006). MCH es un péptido cíclico que consiste de 19 aminoácidos en mamíferos, y su precursor, preproMCH, produce dos péptidos adicionales: el neuropéptido amida isoleucina de ácido glutámico (NEI) y el neuropéptido glicina de ácido glutámico (NGE), que están conformados por 13 y por 19 aminoácidos, respectivamente.

La evidencia experimental muestra que la administración intracerebroventricular (icv) de NEI incrementa el acicalamiento y la locomoción en ratas (Sánchez et al.,

1997), mientras que existen pocos estudios relacionados con la función de NGE (para consultar una revisión, léanse Saito et al., 2008; y Bittencourt & Celis, 2008). MCH ejerce sus efectos biológicos a través de un par de receptores acoplados a proteínas G inhibitoras, los receptores a MCH tipos 1 y 2 (MCH₁R y MCH₂R, respectivamente) (Saito et al., 1999; Hawes et al., 2000), aunque se ha reportado que MCH₂R es un receptor no funcional en la rata, el ratón, el hámster, el cobayo y el conejo (Tan et al., 2002). Asimismo, se ha reportado que MCH regula diversos procesos fisiológicos en mamíferos, incluyendo la memoria y el aprendizaje (para consultar una revisión, léase Adamantidis & de Lecea, 2009), así como la ansiedad y el estrés. Por ejemplo, se ha observado que la administración bilateral de MCH en la región CA1 del hipocampo o en la amígdala de ratas facilita la retención de memoria en un paradigma de evitación pasiva (Monzón et al., 1999; Varas et al., 2002). Igualmente, otro conjunto de experimentos ha mostrado que la administración intrahipocampal o intraamigdalina de MCH revierte los efectos conductuales inducidos por el estrés inescapable, en un paradigma de condicionamiento al miedo contextual (Carlini et al., 2006); y que la administración icv de MCH ejerce un efecto ansiolítico en el laberinto elevado de brazos abiertos (Monzón & Barioglio, 1999).

7.3. OX y MCH proyectan a estructuras cerebrales involucradas en la regulación del ciclo sueño-vigilia.

Mediante el empleo de trazadores anterógrados o retrógrados, por un lado, y de hibridación *in situ*, por el otro, se ha observado que las neuronas que sintetizan OX o MCH proyectan difusamente a todo el cerebro (véase Figura 5) y que los

receptores para OX y para MCH se expresan ampliamente en el cerebro (para consultar una revisión, léase Kilduff & de Lecea, 2001).

Las proyecciones de las neuronas orexinérgicas se distribuyen dentro del hipotálamo y en todo el cerebro adulto de la rata (Nambu et al., 1999), incluyendo estructuras responsables de la regulación del ciclo sueño-vigilia (para consultar una revisión, léase Ohno & Sakurai, 2008), tales como el LC, los núcleos del rafé, el área parabraquial (Peyron et al., 1998) y la sustancia gris periacueductal ventrolateral (vIPAG). La vIPAG se ha identificado como una estructura que ejerce un control inhibitorio sobre el s-MOR (Lu et al., 2006). Asimismo, OX₁R y OX₂R se expresan en los núcleos dorsal del rafé (DRN), TMN, PPT, LDT y LC (Marcus et al., 2001) (Véase Figura 5A). Todas estas estructuras se han identificado como promotoras de la vigilia (España & Scammell, 2004).

Con respecto al sistema MCH, se ha documentado tanto la existencia de proyecciones de neuronas MCHérgicas como la expresión del MCH₁R en áreas cerebrales que controlan el sueño o la vigilia (Monti et al., 2013), de una forma semejante a aquélla del sistema orexinérgico (Bittencourt, 2011; Saito et al., 2008) (Véase Figura 5B).

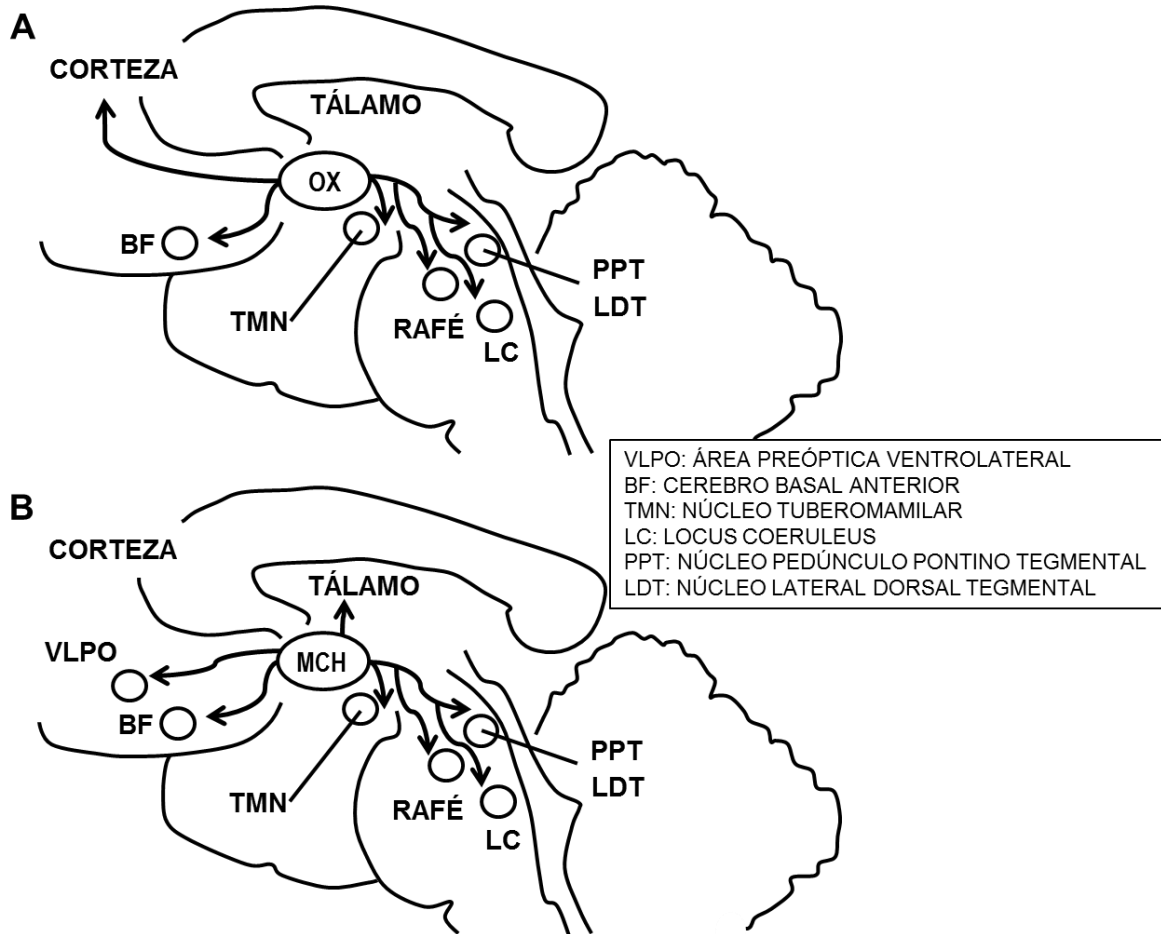


Figura 5. Esquema que corresponde a un corte sagital del cerebro humano, donde se ilustran las proyecciones orexinérgicas (A) y MCHérgicas (B), desde el hipotálamo lateral, hacia núcleos responsables de la regulación del ciclo sueño-vigilia. Las flechas indican las proyecciones orexinérgicas (A) y MCHérgicas (B). OX, orexinas; MCH, hormona concentradora de melanina. En el recuadro se incluyen los significados de las demás abreviaturas. Modificado de España & Scammell, 2004.

7.4. OX y MCH modulan componentes opuestos del ciclo sueño-vigilia.

7.4.1. Neuronas orexinérgicas y narcolepsia.

En un principio, los péptidos OX y MCH fueron estudiados en términos de su posible influencia sobre la regulación de la ingestión de alimento (revisado en Siegel et al., 2001). De esta forma, Chemelli et al. (1999) emplearon ratones

knockout para OX (carentes del gen para OX) y observaron que esta manipulación de ingeniería genética ejercía un efecto minúsculo sobre la ingestión de alimento y el peso corporal, pero que incidía en un fenotipo semejante al de la narcolepsia. Ya que este fenotipo incluye transiciones abruptas de la vigilia al s-MOR y episodios de ataques parecidos a la cataplexia, caracterizados por la pérdida repentina del tono muscular, i.e. 'arresto motor', estos hallazgos atrajeron rápidamente la atención de la comunidad científica y sugirieron que las orexinas, de algún modo, eran necesarias para el mantenimiento de la vigilia o del tono muscular, o de ambos.

Debido a que la narcolepsia está caracterizada por somnolencia excesiva diurna, latencia reducida al s-MOR, alucinaciones al inicio del sueño (conocidas como alucinaciones hipnagógicas), cataplexia (caracterizada por una pérdida repentina del tono muscular pero con una consciencia completa del medio ambiente, de acuerdo con Guilleminault & Gelb, 1995), y parálisis del sueño (Aldrich, 1998), además de los ataques de cataplexia observados en los ratones *knockout* para orexinas, en seguida se exploró en detalle la relación entre la narcolepsia y las orexinas.

De este modo, en estudios post-mortem realizados en cerebros de pacientes humanos que habían padecido narcolepsia, se observó una menor cantidad de cuerpos celulares orexinérgicos (Thannickal et al., 2000) y, por otra parte, se identificó una mutación en el gen que codifica para el OX₂R en el modelo narcoléptico canino del Doberman pinscher (Lin et al., 1999). Asimismo, se ha documentado que pacientes narcolépticos, en comparación con pacientes sanos y pares en edad y género, tienen bajos niveles de OX-A en plasma (Higuchi et al.,

2002). En este sentido, se ha documentado que el modafinil, un fármaco que se emplea para controlar la hipersomnolencia que caracteriza a los narcolépticos, induce vigilia a través de la activación de las neuronas orexinérgicas (Ishizuka et al., 2010), pero, paradójicamente, también se ha mostrado que promueve un efecto más robusto en ratones *knockout* para OX (Willie et al., 2005).

7.4.2. Neuronas orexinérgicas y cataplexia.

El hecho de que la ausencia de neuronas OX resultara en cataplexia sugirió que esta estirpe neuronal estaba involucrada en el control del tono muscular, el movimiento o ambos. En este contexto, Mileykovskiy et al. (2005) registraron la actividad unitaria de neuronas OX en ratas en libre movimiento, a lo largo de diferentes fases del ciclo sueño-vigilia, y observaron que, además de que estas neuronas tienen su máxima tasa de disparo en la vigilia y de que permanecen silentes en SOL y en periodos tónicos de s-MOR, también disparan con asociación a actividad motora intensa –como la conducta de exploración–, pero no con relación a movimientos específicos como aquellos involucrados en el acicalamiento o la locomoción. Complementariamente, con base en preparaciones *in vitro* que han demostrado que la OX-A (Hagan et al., 1999) y que la OX-B (Horvath et al., 1999) despolarizan a neuronas noradrenérgicas del LC, una serie de estudios han sugerido que el tono muscular postural podría ser modulado indirectamente por las neuronas OX a través de sus proyecciones al LC, ya que esta región cerebral se ha asociado al mantenimiento del tono muscular (Schwarz, Yee, Mir, & Peever 2008). Por ejemplo, se ha demostrado que las neuronas noradrenérgicas del LC de los Doberman pinscher narcolépticos, dejan de disparar

antes y durante un ataque de cataplexia (Wu et al., 1999). Asimismo, se ha reportado que la administración de OX-A o de OX-B en el LC de ratas descerebradas (i.e., descerebración precolicular-postmamilar), induce facilitación del tono muscular (Kiyashchenko et al., 2001). Igualmente, en ratones transgénicos que carecen de neuronas orexinérgicas, la transferencia del gen que codifica para OX, directamente al hipotálamo lateral, bloquea la cataplexia (Liu et al., 2012). En resumen, estos datos sugieren que uno de los mecanismos responsables de la regulación de la cataplexia podría ser la ausencia de la estimulación de neuronas orexinérgicas del hipotálamo lateral a neuronas noradrenérgicas del LC.

7.4.3. Neuronas orexinérgicas y vigilia.

Consistentemente, una serie de experimentos farmacológicos ha demostrado que la administración del péptido OX, icv (Akanmu et al., 2005; Yamanaka et al., 2002), o en el PnO (Watson et al., 2008), o en el TMN (Huang et al., 2001), incrementa la vigilia y reduce tanto el SOL como el s-MOR en los roedores. De modo complementario, estudios *in vitro* llevados a cabo en rebanadas de cerebro de rata también han mostrado que las orexinas ejercen un efecto neuroexcitador sobre neuronas del cerebro basal anterior (Eggerman et al., 2001), neuronas colinérgicas de los núcleos PPT y LDT (Kim et al., 2009), neuronas noradrenérgicas del LC (Hagan et al., 1999) y neuronas histaminérgicas del TMN (Huang et al., 2001), sugiriendo que, en condiciones fisiológicas, las orexinas podrían promover la vigilia e inducir activación cortical al incrementar la actividad de estos grupos neuronales.

Por otra parte, también se ha demostrado que el silenciamiento *in vivo* de las neuronas orexinérgicas mediante optogenética, induce SOL en ratas durante la fase de reposo, pero no durante la fase de actividad (Tsunematsu et al., 2011). Asimismo, la foto estimulación de las neuronas orexinérgicas aumenta las transiciones de sueño a vigilia a lo largo del ciclo sueño-vigilia, pero no después de una privación de sueño de 2 a 4 h, cuando la presión de sueño es más alta que en condiciones normales (Carter et al., 2009), sugiriendo que estas neuronas, a pesar de desempeñar una importante función en el mantenimiento de la vigilia, no están exentas de la influencia de los ritmos circádicos ni de la necesidad de sueño acumulada.

7.4.4. Neuronas MCHérgicas y la regulación del sueño.

A partir de una serie de estudios de inmunohistoquímica, se documentó que MCH regulaba aparentemente el sueño en roedores. Las neuronas MCHérgicas expresaron la proteína c-Fos en el rebote de sueño posterior a una privación total de sueño de 3 h (Modirrousta et al., 2005), o en el rebote posterior a una privación selectiva de s-MOR de 72 h (Verret et al., 2003), sugiriendo que esta estirpe neuronal estaba activa durante el sueño. Más tarde, se demostró en ratas que las neuronas MCHérgicas tienen su máxima tasa de disparo en el s-MOR y que su actividad decrece en el SOL y se silencia en la vigilia (Hassani et al., 2009). Igualmente, se ha observado que la administración del péptido MCH en el cerebro basal anterior (Lagos et al., 2012), o en el DRN (Lagos et al., 2009), incrementa el s-MOR en ratas, a expensas de una reducción en la vigilia. De modo complementario, la inmunoneutralización de MCH en el DRN incrementa la vigilia

y reduce el s-MOR en los roedores (Lagos et al., 2011). Junto con esta evidencia, también se ha demostrado que la administración del péptido MCH en el PnO –el área ejecutiva responsable de la generación y mantenimiento del s-MOR– incrementa el s-MOR en gatos (Torterolo et al., 2009). No obstante, otros estudios también han reportado que el péptido MCH incrementa tanto el s-MOR como el SOL cuando se administra icv (Verret et al., 2003), o que sólo incrementa el SOL cuando se administra en el POA (Benedetto et al., 2013). Adicionalmente, se ha documentado que la administración subcutánea de antagonistas del MCH₁R incrementa la vigilia y reduce tanto el SOL como el s-MOR en ratas (Ahnaou et al., 2008). Asimismo, los ratones *knockout* para MCH₁R tienen el sueño disminuido y la vigilia incrementada, y exhiben una supresión casi total del s-MOR cuando se someten a una privación de alimento por 24 h (Willie et al., 2008). De acuerdo con estos resultados, en comparación con ratones control, los ratones *knockout* para MCH₁R tienen la vigilia aumentada en la fase activa del ciclo y el SOL reducido en la fase de reposo (Ahnaou et al., 2011); sin embargo, algunos otros autores han reportado un fenotipo hipersomne en ratones *knockout* para MCH₁R (Adamantidis et al., 2008). En conjunto, esta evidencia experimental revela que MCH participa en la regulación del sueño, aun cuando parece ser más sensible al s-MOR.

Asimismo, en rebanadas de cerebro de rata, se ha observado que el neurotransmisor NA hiperpolariza a las neuronas que sintetizan MCH (Bayer et al., 2005), sugiriendo que, a lo largo del ciclo sueño-vigilia, aferentes que llegarían del núcleo LC (i.e., promotor de la vigilia) a las neuronas MCHérgicas del hipotálamo lateral inhibirían tónicamente la expresión del s-MOR. No obstante, también existe evidencia experimental que muestra que el carbacol, un agonista colinérgico,

hiperpolariza a neuronas MCHérgicas *in vitro* (Bayer et al., 2005), sugiriendo que los núcleos colinérgicos pontomesencefálicos, activos durante la vigilia y el s-MOR, en teoría podrían inhibir tónicamente a las neuronas MCHérgicas promotoras del s-MOR, durante la vigilia. Adicionalmente, una serie de experimentos llevados a cabo por el grupo de Saper (Lu et al., 2006) han identificado a neuronas GABAérgicas en la vIPAG (i.e., una región cerebral 'inactiva' durante el s-MOR) y han sugerido que éstas inhiben tónicamente a las neuronas glutamatérgicas del SLD (i.e., una región 'activa' durante el s-MOR) del tallo cerebral. De acuerdo con estos hallazgos, se ha demostrado que la vIPAG recibe aferentes de las neuronas MCHérgicas (Clément et al., 2012) y de este modo se especula que las neuronas MCHérgicas inhiben tónicamente a las neuronas GABAérgicas de la vIPAG para facilitar el s-MOR. De manera opuesta a lo que se ha documentado respecto a las orexinas –que ejercen una acción neuroexcitadora en diversas estirpes celulares, *in vitro*–, se ha observado que MCH ejerce una acción neuroinhibidora en células hipotalámicas de cultivo, al deprimir la actividad glutamatérgica y GABAérgica (Gao & van den Pol, 2001).

8. El sistema endocannabinérgico.

Se considera que el sistema endocannabinérgico está conformado por los receptores a cannabinoides, sus ligandos endógenos y por las proteínas que regulan las concentraciones de estos ligandos (Di Marzo, 2006), i.e. las enzimas que los sintetizan o degradan. Más detalladamente, los orígenes de la identificación de este sistema se remontan al hallazgo de la sustancia psicoactiva

más importante de la planta *Cannabis sativa*, conocida también como planta de cáñamo o marihuana.

Esta planta ha sido utilizada por la humanidad durante casi 4000 años como una droga recreativa debido a sus efectos psicotrópicos, y contiene alrededor de 400 compuestos químicos. Aproximadamente 60 de éstos pertenecen a la clase de los cannabinoides (revisado en Méndez-Díaz et al., 2008).

Asimismo, se ha documentado ampliamente, tanto en humanos como en animales, que estas moléculas inducen déficits en la memoria (Riedel & Davies, 2005), deterioros cognitivos (Crean et al., 2011), incoordinación motora (Rodríguez de Fonseca et al., 1998), somnolencia (Schierenbeck et al., 2008), alteraciones del estado de ánimo (Bhattacharyya et al., 2012) y de la percepción del tiempo (Sewell et al., 2013). También reducen la capacidad para focalizar la atención e ignorar información irrelevante (revisado en Sviženská et al., 2008).

Los primeros reportes de la utilización de estas moléculas con fines terapéuticos se remontan al siglo XIX (revisado en Mechoulam et al., 1998; para consultar una revisión acerca de los efectos psicotrópicos inducidos por los cannabinoides, léase Ameri, 1999); sin embargo, fue hasta el primer lustro de la década de los 60's cuando se identificó y se caracterizó la estructura química de la sustancia a la cual se atribuyen los efectos psicotrópicos inducidos por la *Cannabis sativa*, el Δ^9 -tetra-hidrocannabinol (Δ^9 -THC) (Gaoni & Mechoulam, 1964).

A diferencia de otras moléculas como la morfina y la cocaína, que fueron aisladas del opio y de las hojas de coca, respectivamente, en forma de sales cristalinas, el aislamiento del Δ^9 -THC representó un desafío, ya que se halló en un compuesto aceitoso y difícil de purificar. De este modo, ya que esta molécula es lipofílica, en

un principio se creía que los efectos psicotrópicos que inducía resultaban de su interferencia con la fluidez membranal y no por su unión a un receptor específico (revisado en Fonseca et al., 2013), a lo cual se denominó 'teoría de la perturbación membranal' (revisado en Mechoulam et al., 1998); sin embargo, posteriormente se sugirió la existencia de un receptor a cannabinoides, a partir del hallazgo de que el Δ^9 -THC inhibía la actividad de la adenilato ciclasa (AC) en membranas celulares de neuroblastoma (Howlett et al., 1984; Howlett et al., 1985). Más tarde, el grupo de Howlett identificó y caracterizó completamente un receptor a cannabinoides en membranas de cerebro de rata (Devane et al., 1988), y posteriormente fueron clonados los tipos 1 y 2 de receptores a cannabinoides (CB₁R y CB₂R).

8.1. Los receptores a cannabinoides tipo 1 (CB₁R) y tipo 2 (CB₂R).

El CB₁R fue clonado del cerebro de rata (Matsuda et al., 1990); y el CB₂R, a partir de células de leucemia promielocítica humana HL-60 (Munro et al., 1993). A partir de su descubrimiento, estos receptores se han descrito en mamíferos tales como la rata, el ratón, el perro, el cerdo, el mono y el humano (McPartland & Glass, 2003).

En un principio, una serie de estudios que emplearon las técnicas de autoradiografía para el pegado por radioligando del CP 55, 940, un agonista sintético del CB₁R (Herkenham et al., 1990), la hibridación *in situ* para el mRNA del CB₁R (Mailleux & Vanderhaeghen, 1992) y la inmunohistoquímica contra el CB₁R (Tsou et al., 1997), permitieron identificar que este receptor se expresa ampliamente en todo el cerebro y que exhibe altas concentraciones en el hipocampo, los núcleos de la base, el núcleo accumbens, la corteza cerebral, la

amígdala y el cerebelo (revisado en Howlett et al., 2002). Asimismo, en el hipotálamo lateral es clara la presencia del CB₁R (Mackie, 2005).

Debido a su localización, al CB₁R (véase Figura 6) se le ha llamado el receptor central de los cannabinoides, aunque otros autores han observado y reportado bajas concentraciones de éste, en tejidos periféricos incluyendo el intestino, el hígado y los tejidos reproductivos (El-Talatini et al., 2009; Fonseca et al., 2012; Galiègue et al., 1995).

Aunque en la presente Tesis Doctoral solamente se exploraron los efectos de la estimulación del CB₁R en el hipotálamo lateral, se citarán brevemente algunas características del CB₂R. Este receptor inicialmente fue identificado en el bazo (Munro et al., 1993). Se le ha denominado el receptor periférico de los cannabinoides, ya que se localiza en el corazón, los pulmones, los testículos, los ovarios, la próstata y en tejidos derivados del sistema inmune, tales como el bazo y el timo (Galiègue et al., 1995). A pesar de que esta noción ha sido largamente aceptada, también se ha mostrado la existencia del CB₂R en el tallo cerebral (Van Sickle et al., 2005) y se ha documentado que la administración de agonistas del CB₂R directamente en el parénquima cerebral inhiben la autoadministración intravenosa de cocaína en ratones (Xi et al., 2011), sugiriendo la existencia de este receptor a nivel central.

En términos generales, tanto el CB₁R como el CB₂R pertenecen a la superfamilia de receptores de siete dominios transmembranales y tienen una estructura de proteína definida por un arreglo de siete hélices membranales con bucles intracelulares y un dominio C-terminal que puede asociarse con proteínas G (Howlett, 2005), y, al menos el CB₁R, se expresa de manera pre-sináptica

principalmente en terminales GABAérgicas y glutamatérgicas (Atwood et al., 2012; Domenici et al., 2006; Marsicano & Lutz, 1999; Wilson & Nicoll, 2002).

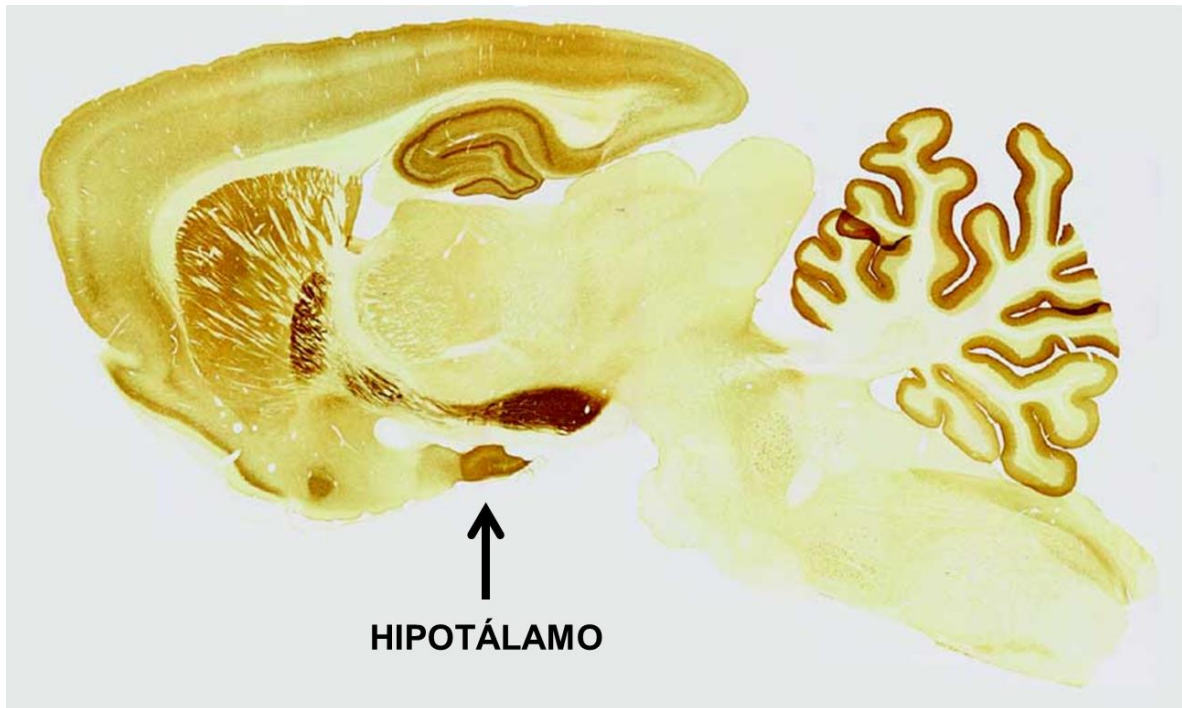


Figura 6. Inmunohistoquímica contra el CB₁R que corresponde a un corte sagital del cerebro de rata, realizada por el Grupo de Cannabinoides del Dr. Prospéro-García. Las zonas más oscuras indican mayor expresión del receptor. La flecha señala la localización del CB₁R en el hipotálamo.

En términos más particulares, tal y como lo habían sugerido los trabajos pioneros de Howlett en los 80's, estos receptores inhiben a la AC, promoviendo la inhibición de la acumulación de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP), pero además inducen la fosforilación y la activación de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), así como la estimulación de las fosfolipasas A y C (PLA y

PLC, respectivamente), mediante el señalamiento de proteínas $G_{i/o}$ (revisado en Pertwee, 2008) (Véase Figura 7).

Asimismo, mientras que la inhibición de la AC en diversos tejidos y células, inducida por la activación de este par de receptores, está mediada por la transducción de señales a través de la G_i , se ha mostrado que la estimulación del CB_1R promueve la regulación de los canales iónicos de Ca^{+2} y de K^+ , i.e., el cierre de canales de Ca^{2+} y la apertura de canales de K^+ , y se ha sugerido que lo hace mediante la G_o (Howlett, 2005).

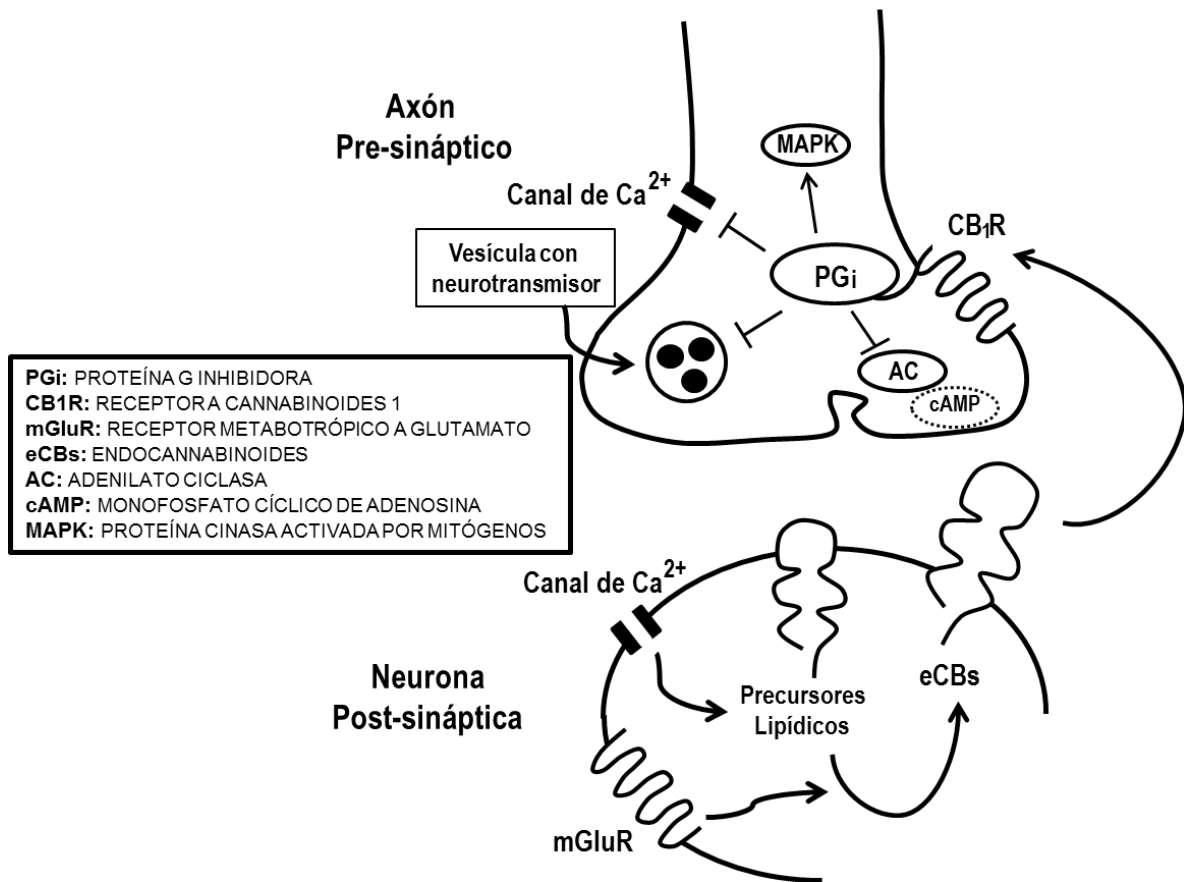


Figura 7. Señalamiento retrógrado por endocannabinoides. La despolarización post-sináptica abre canales de voltaje dependientes de Ca^{2+} . El Ca^{2+} post-sináptico activa a los precusores lipídicos que sintetizan a los endocannabinoides (eCBs). Una vez que éstos se sintetizan en la post-sinapsis, viajan a través del espacio sináptico y después activan al CB₁R en la pre-sinapsis. Puesto que este receptor está acoplado a una PGi y se localiza en la pre-sinapsis, su activación decrementa la probabilidad de liberación del neurotransmisor, al inhibir el flujo de Ca^{2+} . Asimismo, la estimulación post-sináptica de los receptores metabotrópicos a glutamato (mGluRs) promueve la generación de 2-araquidónil glicerol (2-AG), uno de los eCBs más estudiados, tal y como se detallará más adelante en el texto. Modificado de Wilson & Nicoll, 2002.

8.2. Los endocannabinoides.

A grandes rasgos, los endocannabinoides, i.e. los ligandos endógenos de los receptores a cannabinoides, son mensajeros derivados de fosfolípidos que regulan la neurotransmisión a nivel central al activar de manera pre-sináptica a sus receptores (para consultar una revisión, léase Alger, 2002). A diferencia de los neurotransmisores clásicos que se almacenan en vesículas en la pre-sinapsis, estos compuestos endógenos se sintetizan a demanda, i.e. cuándo y dónde son necesarios, por la acción de precursores lipídicos membranales, en la post-sinapsis (Kano et al., 2009). Luego, son liberados inmediatamente de la célula a través de un mecanismo que no se conoce por completo (revisado en Bisogno, 2008) y, de este modo, actúan como mensajeros retrógrados (Figura 7).

Ya que los receptores a cannabinoides están acoplados a proteínas G_i –como se mencionó en el apartado **8.1**– y a que éstos se han identificado principalmente en terminales GABAérgicas y glutamatérgicas, cuando son activados por sus ligandos pueden ser capaces de incrementar la excitabilidad de la neurona post-sináptica, por inhibición pre-sináptica de la neurotransmisión GABAérgica, o de reducir la excitabilidad de la neurona post-sináptica, por inhibición pre-sináptica de la neurotransmisión glutamatérgica (revisado en Méndez-Díaz et al., 2008). Asimismo, ya que al menos el CB_1R regula canales iónicos de Ca^{+2} y de K^+ , al activarlo, los endocannabinoides modulan la liberación de diversos neurotransmisores. De este modo, el efecto general de los endocannabinoides como mensajeros retrógrados es reducir la probabilidad de liberación del neurotransmisor (Lovinger, 2008). A nivel conductual, estas moléculas lipídicas ejercen efectos similares a los producidos por el $\Delta 9$ -THC. Entre estos efectos se

encuentran los que conforman la tétrada que se emplea comúnmente para probar si una molécula tiene actividad cannabinoide en roedores: hipomotilidad, hipolocomoción, analgesia y disminución de la temperatura corporal (revisado en Pertwee, 2006). En el Apéndice E se describen en detalle los endocannabinoides y algunas moléculas con actividad cannabinoide.

8.3. Los endocannabinoides 2-AG y Anandamida.

El 2-araquidonil glicerol (2-AG) y la N-araquidonil etanolamida, o 'anandamida' (AEA), son moléculas derivadas del ácido araquidónico (AA), conjugadas con glicerol y con etanolamina, respectivamente; y son consideradas los principales ligandos endógenos de los receptores a cannabinoides (Luchicchi & Pistis, 2012).

Asimismo, aun cuando son semejantes en estructura y por los efectos biológicos que inducen, 2-AG y AEA exhiben grandes diferencias en términos de biosíntesis y degradación enzimática. Por ejemplo, las enzimas responsables de la hidrólisis intracelular de estas moléculas, se localizan en diferentes regiones sinápticas, sugiriendo distintas propiedades de señalización para cada una (revisado en Häring et al., 2012); por ejemplo, la hidrolasa de los ácidos amidados grasos (FAAH), la enzima responsable de degradar a AEA, se expresa principalmente en la post-sinapsis (Cristino et al., 2008), mientras que la monoacilglicerol lipasa (MAG-L), la enzima responsable de la degradación de 2-AG, co-localiza principalmente con el CB₁R en la estructura pre-sináptica (Gulyas et al., 2004).

Complementariamente, mientras que se ha mostrado que AEA es agonista parcial del CB₁R (Glass & Northup, 1999), débil agonista del CB₂R (Felder et al., 1995) y que también es capaz de activar a los receptores potenciales transitorios a

vaniloides tipo 1 (TRPV₁) (Zygmunt et al., 1999), así como a la familia de los receptores activados por proliferador de peroxisomas (PPARs) (O'Sullivan, 2007), el 2-AG es agonista completo del CB₁R y del CB₂R y se le identifica como el ligando natural primario de los receptores a cannabinoides (Sugiura & Waku, 2002).

Igualmente, se ha documentado que los niveles más altos de AEA en el cerebro corresponden con las concentraciones más altas de los receptores a cannabinoides, tales como el hipocampo, el estriado, el cerebelo y la corteza (Egertova & Elphick, 2000), mientras que se ha reportado que la presencia de 2-AG en el cerebro es más abundante que la de AEA e incluye altos niveles en la corteza, el cerebro anterior límbico, el hipocampo, el hipotálamo, el diencefalo, el estriado, el mesencefalo, el cerebelo, el tallo cerebral, el bulbo raquídeo y la pituitaria (Bisogno et al., 1999).

8.4. 2-AG: vías de síntesis y de degradación.

El 2-AG es un lípido neuromodulador que se cree que actúa como una señal retrógrada en sinapsis excitadoras e inhibitoras en todo el cerebro (Gao et al., 2010; Tanimura et al., 2010). Alrededor de 1980, se describió por primera vez la generación de 2-AG en tejidos mamíferos y células [por ejemplo, en plaquetas estimuladas por trombina (Prescott & Majerus, 1983) y en neuronas de los ganglios de la raíz dorsal de la rata estimuladas por bradiquinina (Gammon et al., 1989; revisado en Sugiura et al., 2006)]; sin embargo, no fue sino hasta el descubrimiento de los receptores CB₁R y CB₂R cuando se identificó como un

ligando endógeno de éstos y comenzó a explorarse su participación en diversos procesos fisiológicos.

En primer lugar, la biosíntesis y la liberación de 2-AG puede ser inducida tanto por la despolarización como por la activación de los receptores acoplados a proteínas $G_{q/11}$, tales como los receptores metabotrópicos a glutamato del grupo I, tipos 1 y 5 (I mGluR₁ ó I mGluR₅), o los receptores muscarínicos a ACh, tipos 1 y 3 (M1 y M3) (Hashimotodani et al., 2005; Kanu et al., 2009).

En resumen, 2-AG es sintetizado post-sinápticamente en respuesta a actividad neuronal (Savinainen et al., 2012), a partir de la activación de la fosfolipasa C (PLC). La PLC entonces toma como sustrato al fosfatidil inositol 4, 5 bifosfato (PIP₂) para generar diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃); luego, mediante la diacilglicerol lipasa (DAG-L), el DAG es transformado en 2-AG (Ueda et al., 2011). Más detalladamente, existe evidencia experimental que sugiere que 2-AG es liberado de manera dependiente a un estímulo por la acción sucesiva de un par de enzimas localizadas en espinas post-sinápticas: la fosfolipasa C-β (PLC-β) y la diacilglicerol lipasa-α (DAG-Lα) (Hashimotodani et al., 2005; Stella et al., 1997). La PLC-β hidroliza al PIP₂ para generar DAG, y la DAG-Lα rompe el DAG para formar 2-AG (Jung et al., 2007). Asimismo, se ha mostrado que la PLC y la DAG-L coexisten con los receptores acoplados a proteínas $G_{q/11}$ (Kano et al., 2009). Complementariamente, aunque han sido clonadas dos isoformas de la DAG-L, la DAG-Lα y la DAG-Lβ, y se ha reportado que éstas cambian su localización de la pre- a la post-sinapsis durante el desarrollo –de tractos axonales en el embrión a campos dendríticos en el adulto–, y que su expresión refleja los sitios donde se sintetiza y se libera 2-AG (Bisogno et al., 2003), en ratones *knockout* para la DAG-

L β se ha mostrado que ésta no es necesaria para que ocurra la señalización retrógrada mediada por 2-AG (Gao et al., 2010; Hashimoto et al., 2011). Por otra parte, también se ha mostrado que la FAAH puede degradar al 2-AG (Goparaju et al., 1998), pero se considera que la MAG-L es la enzima responsable de hidrolizar al 2-AG en ácido araquidónico y glicerol (Dinh et al., 2002b) (Figura 8). La MAG-L, además de co-expresarse con el CB₁R en la pre-sinapsis, como se mencionó en el apartado **8.3**, pertenece a la superfamilia de las hidrolasas de serina y es una enzima citosólica (Lambert et al., 2005). Esta enzima se localiza en el páncreas del ratón y del humano (Starowicz et al., 2008), y aunque se expresa ampliamente en el cerebro, muestra altas concentraciones en el cerebelo, la corteza y el hipocampo; concentraciones intermedias en el estriado y en el tálamo; y bajas concentraciones en el hipotálamo y en el tallo cerebral (Dinh et al., 2002a). En el Apéndice F se describen brevemente las vías de síntesis y de degradación de AEA.

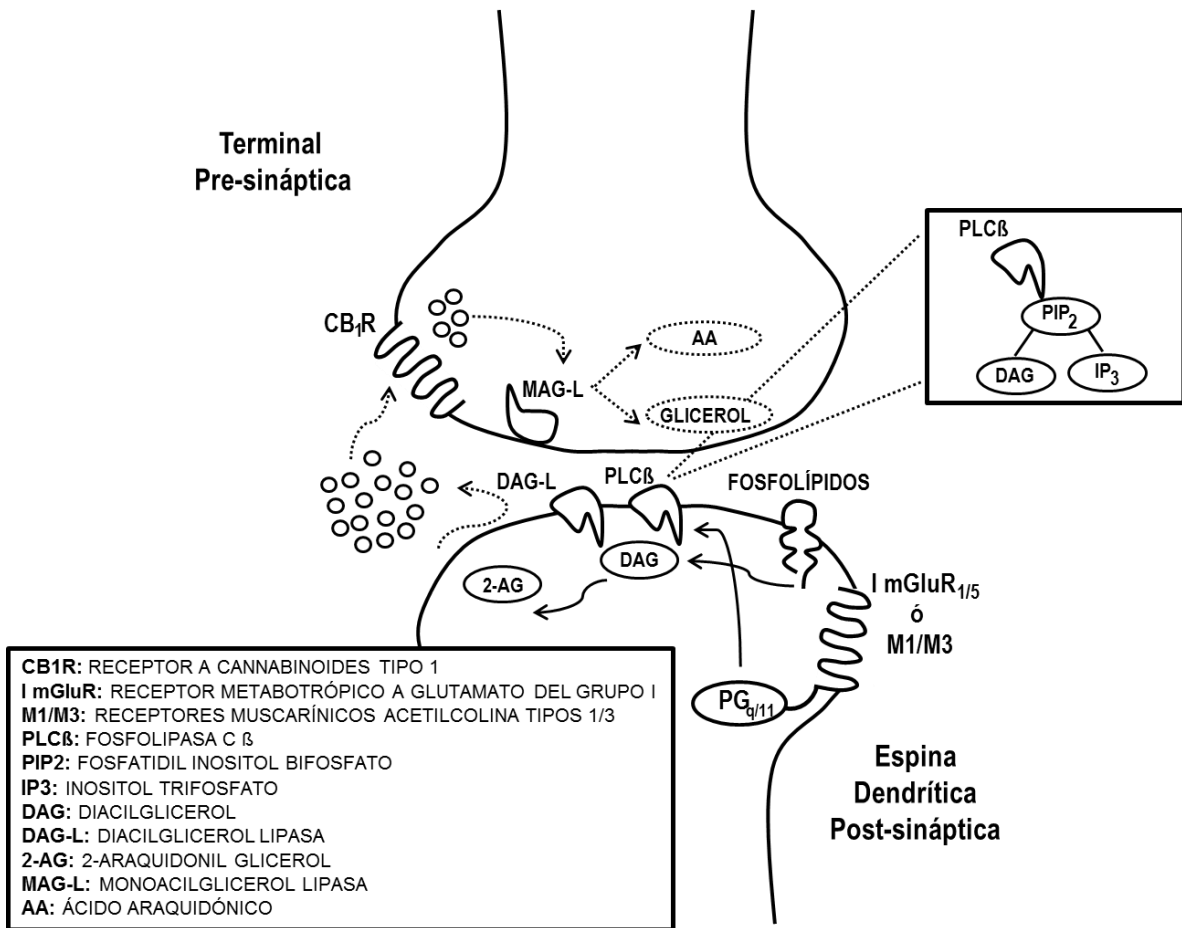


Figura 8. Vías de síntesis y de degradación del endocannabinoide 2-AG. La fosfolipasa C-β (PLC-β) toma como sustrato al fosfatidil inositol bifosfato (PIP₂) para formar diacilglicerol (DAG). Mediante la diacilglicerol lipasa (DAG-L), el DAG es convertido en 2-AG. Asimismo, la estimulación de los receptores metabotrópicos a glutamato del grupo I, tipos 1 y 5 (I mGluR_{1/5}), o de los receptores muscarínicos a ACh, tipos 1 y 3 (M1/M3), también puede generar 2-AG mediante la activación de una fosfolipasa C (PLC). Finalmente, 2-AG es degradado por la monoacilglicerol lipasa (MAG-L) en la pre-sinapsis y entonces es convertido en ácido araquidónico (AA) y glicerol. En el recuadro se incluyen las abreviaturas.

9. Los endocannabinoides y su participación en la regulación del apetito y del sueño.

De manera anecdótica, se ha sugerido que el consumo de la *Cannabis sativa* incrementa el apetito y el sueño. Formalmente, diversos estudios sistemáticos han mostrado que la administración de Δ^9 -THC, además de inducir hipomotilidad, hipolocomoción, hipotermia y analgesia, también incrementa el apetito y el sueño. Asimismo, una literatura creciente, basada principalmente en modelos animales, muestra que los endocannabinoides también promueven la ingestión de alimento y el sueño.

Los endocannabinoides más ampliamente estudiados en términos de estos dos últimos procesos fisiológicos son AEA y 2-AG. Aunque se ha documentado que AEA incrementa el apetito y el sueño, 2-AG sólo ha sido explorado en términos de la regulación de la ingestión de alimento, como se describirá en la siguiente sección.

9.1. Moléculas endocannabinoides y su participación en la modulación del sueño.

El adormecimiento o la somnolencia son efectos claramente identificados en las primeras etapas de la intoxicación por marihuana (revisado en Mechoulam et al., 1997). A pesar de que diversas complicaciones metodológicas limitan la interpretación de muchos de estos hallazgos (revisado en Schierenbeck et al., 2008), existe evidencia experimental desde la década de los 70's que documenta que la administración oral de Δ^9 -THC induce somnolencia (Davies et al., 1974) y

aumenta el s-MOR (Freemon, 1974) en humanos, y que la administración intraperitoneal de Δ^9 -THC incrementa el sueño en ratas (Buonamici et al., 1982).

Asimismo, una creciente literatura apoya la noción de que los endocannabinoides son moléculas hipnóticas, en ratas. Santucci et al. (1996) mostraron que la administración sistémica del SR141716A (conocido como Rimonabant), un antagonista del CB₁R, incrementa la vigilia y reduce tanto el SOL como el s-MOR. De manera similar, la administración icv del Rimonabant atenúa el rebote sueño inducido por la privación selectiva de s-MOR (Navarro et al., 2003). En el mismo sentido, la administración icv, tanto aguda (Murillo-Rodríguez et al., 2001) como subcrónica (Herrera-Solís et al., 2009), o incluso intrahipocampal (Rueda-Orozco et al., 2010), del endocannabinoide AEA, incrementa el s-MOR, mediante la activación del CB₁R.

Por otra parte, la administración sistémica de Cis-9-10 octadecenoamida (OLE, u oleamida), una molécula que fue extraída del líquido cefalorraquídeo de gatos privados de sueño (Lerner et al., 1994) y que tiene actividad cannabinoide (véase Apéndice E), incrementa el sueño en ratas no sometidas a ninguna manipulación experimental (Cravatt et al., 1995), y restablece el sueño en ratas adultas sometidas a privación de cuidado maternal en etapas tempranas del desarrollo y que exhiben una cantidad total de sueño reducida (Reyes Prieto et al., 2012).

Otra clase de estudios de ingeniería genética han reforzado estos hallazgos; por ejemplo, los ratones *knockout* para la FAHH, la enzima responsable de la degradación de AEA y OLE (véanse Apéndices E y F), tienen aumentado el sueño y reducida la vigilia en comparación con animales control (Huitrón-Reséndiz et al., 2004).

9.2. Moléculas endocannabinoides y su participación como promotores de la ingestión de alimento.

Quizá la primera revisión formal que exploró los efectos de la *Cannabis sativa* sobre la ingestión de alimento, en humanos y en animales, se remonta a 1975 (Abel, 1975); sin embargo, más tarde, otros autores mostraron sistemáticamente que el consumo de cigarrillos con 1.84% de marihuana activa (THC) incrementa la ingestión de alimento y el peso corporal en humanos voluntarios sanos (Foltin et al., 1986, 1988). Asimismo, existe una amplia evidencia experimental basada en roedores que sugiere la participación de los endocannabinoides AEA, 2-AG y OLE en la regulación del apetito; por ejemplo, la administración de AEA, tanto subcutánea (Williams & Kirkham, 1999) como directamente en el VMH (Jamshidi & Taylor, 2001), considerado el 'centro de saciedad' hipotalámico (Hetherington & Ranson, 1940), incrementa la ingestión de alimento, a través de la activación del CB₁R. Igualmente, se ha reportado un efecto orexigénico tras la administración de 2-AG (Kirkham et al., 2002) o de AEA (Soria-Gómez et al., 2007) en el núcleo accumbens (NAc), mediante la activación del CB₁R; y también cuando se administra OLE, de manera icv (Martínez-González et al., 2004), o directamente en el NAc, mediante la activación del CB₁R y del receptor 2C a serotonina (5HT-_{2c}). En el mismo sentido, los niveles de 2-AG en el cerebro límbico anterior (Kirkham et al., 2002) y en el hipotálamo (Hanuš et al., 2003) aumentan mientras el animal está privado de alimento hasta por 24 h y disminuyen conforme éste se alimenta.

Complementariamente, diversos estudios han documentado las propiedades anorexigénicas de los antagonistas del CB₁R, tales como el Rimonabant ó el

AM251, tanto en animales como en humanos (para consultar una revisión, léase Salamone et al., 2007), y se ha observado que los ratones *knockout* para el CB₁R son delgados e hipofágicos (Cota et al., 2003).

10. Receptores activados por proteinasas (PARs).

A grandes rasgos, los receptores activados por proteinasas (PARs) existen en cuatro tipos –PAR₁₋₄–, pertenecen a una familia de receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G (Ossovskaya & Bunnett, 2004) y se ha documentado su participación en condiciones tales como la inflamación neurogénica, la neurodegeneración y la neuroprotección (Lou et al., 2007). En particular, el receptor activado por proteinasas 1 (PAR₁) está involucrado en la trombosis, la hemostasis, la progresión del cáncer y el desarrollo embrional (Gieseler et al., 2013).

Asimismo, los PARs son activados por un mecanismo único que involucra la proteólisis de una secuencia N-terminal, por proteinasas de serina/treonina tales como la trombina, la tripsina y la triptasa. Esta proteólisis revela una nueva secuencia N-terminal que funge como ligando y activador del receptor (Vu et al., 1991) (Figura 9).

Debido a que en la presente Tesis Doctoral sólo fueron evaluados los efectos de la estimulación del PAR₁ en el hipotálamo lateral sobre el ciclo sueño-vigilia y la ingestión de alimento, en la siguiente sección se describirá este receptor.

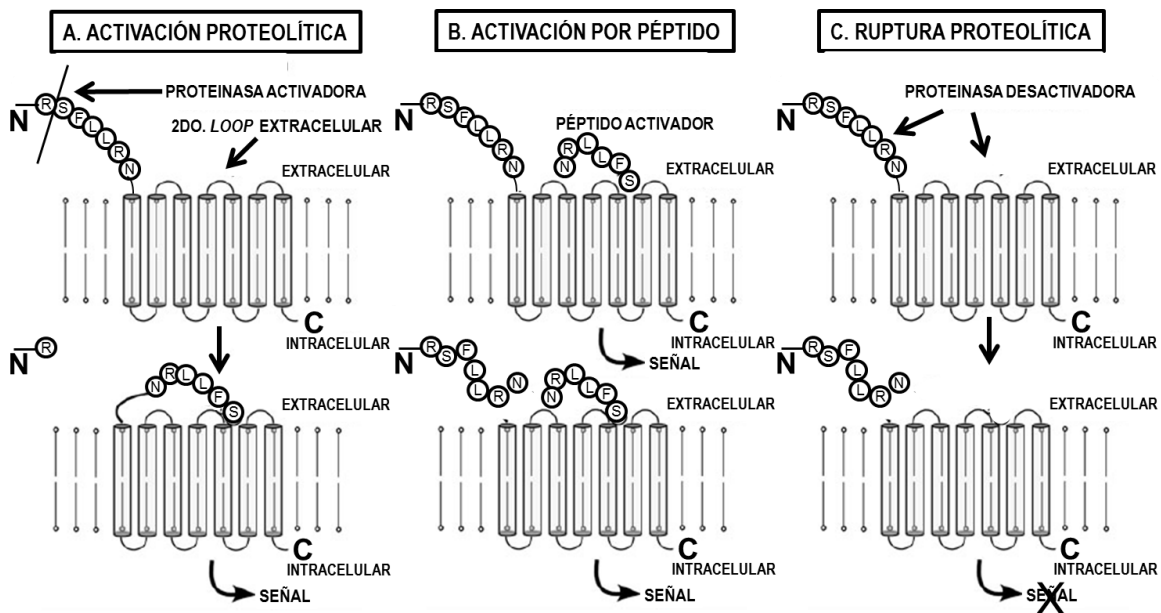


Figura 9. Activación y ruptura del PAR₁. La proteinasa activadora (A) rompe el extremo N-Terminal del receptor PAR₁ (RSFLLRN), junto con el resto de un péptido (R) (A, panel superior), y de esta forma se crea un nuevo ligando (NRLLES) (A, panel inferior) que se une al 2do. *loop* extracelular y crea una señal (A, panel inferior). Asimismo, la activación del PAR₁ por péptido (B) puede llevarse a cabo sin (B, panel superior) y con (B, panel inferior) la ruptura proteolítica que se ilustra en A. Una proteinasa desactivadora rompe al receptor en un sitio 'equivocado' (C, panel superior) y de esta forma previene su activación (C, panel inferior). Modificado de Elste & Petersen, 2010.

10.1. PAR₁ y 2-AG.

El PAR₁ se encuentra ampliamente distribuido en el sistema nervioso central, incluyendo el hipotálamo lateral (Weinstein et al., 1995), y su ligando endógeno es la trombina. Aunque a principios de los 80's, como se mencionó en la sección 9.4, ya se había reportado la generación de 2-AG por la estimulación de trombina en plaquetas (Prescott & Majerus, 1983; revisado en Sugiura et al., 2006), mucho antes del descubrimiento de los receptores a cannabinoides, no fue sino hasta el 2011 cuando se documentó una relación entre el PAR₁, el 2-AG y el CB₁R.

El grupo de Masanobu Kano, de la Universidad de Tokio, reportó en una serie de estudios *in vitro* que la estimulación del PAR₁ en neuronas hipocampales de rata, por trombina o por un agonista sintético de este receptor, suprime las corrientes post-sinápticas inhibitoras (IPSCs) y que este efecto es bloqueado tanto por el antagonista del CB₁R, AM251, como por la tetrahidrolipstatina (THL), un inhibidor de la DAG-L, la enzima responsable de la síntesis de 2-AG. Asimismo, en este estudio también se documentó que este efecto, i.e. la supresión de IPSCs inducida por la estimulación del PAR₁, no ocurre en ratones *knockout* para la DAG-L, sugiriendo que la estimulación de este receptor induce señalización retrógrada mediada por la activación del CB₁R, y a través del endocannabinoide 2-AG (Hashimotodani et al., 2011).

11. Planteamiento del problema, hipótesis y objetivos.

El ciclo sueño-vigilia es el resultado de la interacción entre sistemas que promueven la vigilia y sistemas que promueven el sueño. A grandes rasgos, estos sistemas están constituidos por estructuras cerebrales que sintetizan moléculas promotoras de la vigilia o del sueño. En este sentido, el hipotálamo lateral es una región cerebral importante, ya que contiene a los péptidos OX y MCH. Estos neuropéptidos participan en la modulación de diferentes componentes del ciclo sueño-vigilia. Las orexinas han sido involucradas con el mantenimiento de la vigilia y MCH ha sido asociado con el s-MOR. Estos hallazgos se han documentado a partir de aproximaciones experimentales que incluyen farmacología, ingeniería genética, inmunohistoquímica y electrofisiología.

Por otra parte, existe evidencia experimental que sustenta la participación del sistema endocannabinérgico –conformado por los receptores a cannabinoides, los endocannabinoides y las enzimas que los sintetizan o los degradan– en la regulación del ciclo sueño-vigilia. En roedores, se ha mostrado que la administración sistémica, o directamente en el parénquima, de los endocannabinoides OLE ó AEA incrementa el sueño, y en particular el s-MOR, mientras que el bloqueo del receptor a cannabinoides 1 (CB₁R) incrementa la vigilia y reduce el sueño. Asimismo, también se ha observado que los ratones *knockout* para la FAAH, la enzima responsable de degradar a OLE y a AEA, tienen incrementado el sueño y reducida la vigilia.

Aun cuando la literatura que apoya la noción de los endocannabinoides como moléculas hipnóticas es amplia y consistente, se desconocen los mecanismos cerebrales a través de los cuales estas moléculas inducen sueño; sin embargo, una serie de estudios *in vitro* mostró que la activación del CB₁R en el hipotálamo lateral de rebanadas de cerebro de rata despolariza a neuronas que sintetizan MCH e hiperpolariza a neuronas que sintetizan orexina, sugiriendo que esta modulación podría ser uno de los mecanismos a través de los cuales los endocannabinoides inducen sueño.

Asimismo, a pesar de que 2-AG es considerado el endocannabinóide más abundante en el sistema nervioso central, hasta ahora no se había determinado si, al igual que AEA y OLE, tiene propiedades hipnóticas. En este sentido, una serie de estudios *in vitro* ha documentado que la estimulación del receptor activado por proteinasas 1 (PAR₁), cuyo ligando endógeno es la trombina, induce supresión retrógrada sináptica mediada por la activación del CB₁R y a través del

endocannabinoide 2-AG, sugiriendo que la activación de este receptor involucra la síntesis de 2-AG. En este contexto, se plantearon las siguientes preguntas de investigación:

- 1. ¿La administración de 2-AG, agonista del receptor a cannabinoides tipo 1 (CB₁R), en el hipotálamo lateral de ratas, incrementa el s-MOR y modifica la expresión de c-Fos en las neuronas MCHérgicas y orexinérgicas?**
- 2. ¿La administración de S1820, agonista del receptor activado por proteinasas 1 (PAR₁), en el hipotálamo lateral de ratas, incrementa el s-MOR y la ingestión de alimento, a través de la activación del CB₁R?**

11.1. Hipótesis general.

El hipotálamo lateral modula el s-MOR y la ingestión de alimento, a través de los receptores a cannabinoides tipo 1 (CB₁R).

11.2. Hipótesis específicas.

1. La administración de 2-AG, agonista del CB₁R, en el hipotálamo lateral de ratas, incrementa el s-MOR a través de la activación del CB₁R y modifica la expresión de c-Fos en las neuronas MCHérgicas y orexinérgicas.
2. La administración de S1820, agonista del PAR₁, en el hipotálamo lateral de ratas, incrementa el s-MOR y la ingestión de alimento, a través de la activación del CB₁R.

11.3. Objetivos.

Hipótesis específica 1.

1. Para determinar si la administración de 2-AG, agonista del CB₁R, en el hipotálamo lateral de ratas incrementa el s-MOR:

1.1. Administrar bilateralmente 0.01, 0.1 ó 1 µg de 2-AG en el hipotálamo lateral de grupos independientes de ratas, y evaluar sus efectos sobre el ciclo sueño-vigilia.

2. Para determinar si el incremento en el s-MOR inducido por la administración de 2-AG en el hipotálamo lateral de ratas, está mediado por la activación del CB₁R:

2.1. Administrar bilateralmente 1.4 µg de AM251, agonista inverso del CB₁R, en el hipotálamo lateral de grupos independientes de ratas, y evaluar sus efectos sobre el ciclo sueño-vigilia.

2.2. Administrar bilateralmente la combinación de AM251 (1.4 µg) y de 2-AG (0.01 µg) en el hipotálamo lateral de grupos independientes de ratas, y evaluar sus efectos sobre el ciclo sueño-vigilia.

3. Para determinar si la administración de 2-AG, agonista del CB₁R, en el hipotálamo lateral de ratas, incrementa la expresión de c-Fos en las neuronas MCHérgicas:

3.1. Administrar bilateralmente 0.01 µg de 2-AG en el hipotálamo lateral de grupos independientes de ratas, y sacrificar 90 min más tarde a los sujetos experimentales, y perfundir sus cerebros con PBS y con paraformaldehído al 4%, para extraerlos y procesarlos mediante inmunofluorescencia.

3.1.1. En rebanadas de cerebro de 30 µm, realizar inmunofluorescencia para detectar c-Fos, marcador de activación neuronal, y MCH.

3.1.2. Contar las células positivas para c-Fos y MCH, así como las células que co-expresan ambas proteínas.

4. Para determinar si la administración de 2-AG, agonista del CB₁R, en el hipotálamo lateral de ratas, disminuye la expresión de c-Fos en las neuronas orexinérgicas:

4.1. Administrar bilateralmente 0.01 µg de 2-AG en el hipotálamo lateral de grupos independientes de ratas, y sacrificar 90 min más tarde a los sujetos experimentales, y perfundir sus cerebros con PBS y con paraformaldehído al 4%, para extraerlos y procesarlos mediante inmunofluorescencia.

- 4.1.1. En rebanadas de cerebro de 30 μm , realizar inmunofluorescencia para detectar c-Fos, marcador de activación neuronal, y OX-A.
- 4.1.2. Contar las células positivas para c-Fos y OX-A, así como las células que co-expresan ambas proteínas.

Hipótesis específica 2.

5. Para determinar si la administración de S1820, agonista del PAR₁, en el hipotálamo lateral de ratas, incrementa el s-MOR:

- 5.1. Administrar bilateralmente 10 ó 100 ng de S1820 en el hipotálamo lateral de grupos independientes de ratas, y evaluar sus efectos sobre el ciclo-sueño vigilia.

6. Para determinar si el incremento en el s-MOR inducido por la administración de S1820 en el hipotálamo lateral de ratas, está mediado por la activación del CB₁R:

- 6.1. Administrar bilateralmente 1.4 μg de AM251, agonista inverso del CB₁R, en el hipotálamo lateral de grupos independientes de ratas, 15 min antes de la administración de 10 ng de S1820, y evaluar sus efectos sobre el ciclo sueño-vigilia.

7. Para determinar si la administración de S1820, agonista del PAR₁, en el hipotálamo lateral de ratas, incrementa la ingestión de alimento:

7.1. Administrar bilateralmente 10 ó 100 ng de S1820 en el hipotálamo lateral de grupos independientes de ratas, y evaluar sus efectos sobre la ingestión de alimento, a lo largo de 4 h y después de 24 h.

8. Para determinar si el incremento inducido en la ingestión de alimento por la administración de S1820, está mediado por el CB₁R:

8.1. Administrar bilateralmente 1.4 µg de AM251, agonista inverso del CB₁R, en el hipotálamo lateral de grupos independientes de ratas, y evaluar sus efectos sobre la ingestión de alimento, a lo largo de 4 h y después de 24 h.

8.2. Administrar bilateralmente 1.4 µg de AM251 en el hipotálamo lateral de grupos independientes de ratas, 15 min antes de la administración de 10 ng de S1820, y evaluar sus efectos sobre la ingestión de alimento, a lo largo de 4 h y 24 h.

12. Método.

12.1. Sujetos.

Se emplearon 172 ratas macho de la cepa Wistar, con un peso de 250 a 300 g, al inicio de todos los experimentos, y se alojaron en jaulas individuales de Plexiglas (187 cm² X 20 cm de altura), con cama de viruta de madera, en un bioterio con temperatura constante y controlada (23°C). Los animales permanecieron en sus jaulas individuales a lo largo de todos los experimentos, incluyendo el registro del ciclo sueño-vigilia, en un ciclo invertido de oscuridad-luz (12: 12; las luces se encendieron a las 8:00 pm), con alimento y agua *ad libitum*. Asimismo, los animales fueron manipulados de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana sobre 'Especificaciones Técnicas para la producción, el uso y el cuidado de animales de laboratorio' (NOM-062-ZOO-1999). Se hicieron todos los esfuerzos posibles para reducir tanto el número de sujetos empleados como su potencial sufrimiento. Todas las administraciones de los fármacos fueron realizadas al inicio de la fase de oscuridad, y a partir de éstas se registró el ciclo sueño-vigilia durante 24 h o se cuantificó la cantidad de alimento, a lo largo de 4 h y después de 24 h. Antes de las administraciones de los fármacos, las ratas fueron sometidas a un periodo de habituación, dentro de sus jaulas individuales, a las cajas de registro de sueño o a la manipulación de la cuantificación de alimento.

12.2. Aparatos.

Registro electroencefalográfico y electromiográfico:

Polígrafo Grass, Modelo 7.

Amplificador Grass, Modelo 7P511.

Báscula OHAUS CS-200 con capacidad de 200g X 0.1g.

12.3. Administración de fármacos.

Bomba de micro-administración, modelo 200 (KD-Scientific, Holliston, MA, USA).

Jeringas Hamilton 10 µl (Hamilton Company, Reno, NEV, USA).

Tygon® Flexible Plastic Tubing (Cleveland, Ohio, USA).

12.4. Biología molecular.

Vórtex (Diagger, VortexGenie2).

Balanza analítica (OHAUS AS200).

Olympus phmeter (Corning-Pinnacle 530PHmeter).

Agitador (Barnsted/Thermoline, modelo PR70-115V).

Bomba de perfusión (Portable Master Flex, L/S Sampling Pump, Cole-Parmer Instrument Company).

Crióstato (Leica, CM1510-3).

Portaobjetos Fisher® Superplus (Thermo Scientific, Portsmouth, NH, USA).

Microscopio Olympus BX41, equipado con cámara Evolution VF Color, Media Cybernetics.

Microscopio laser confocal Olympus FV-100, equipado con un objetivo de inmersión para medio aceitoso 60X (N.A.1.4).

12.5. Programas.

ICELUS® (Mark Opp, Ann Arbor, MI)

SigmaPlot 11

NIH ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)

12.6. Fármacos.

2-araquidonil glicerol, 2-AG (Cayman Chemical Company; Ann Arbor, MI, USA).

Agonista del CB₁R y del CB₂R. Dosis utilizadas: 0.1, 0.01 y 1 µg.

1-(2, 4-diclorofenil)-5-(4-iodofenil)-4-metil-N1-piperidinil-1H-pirazol-3-carbomaxida, AM251 (Cayman Chemical Company; Ann Arbor, MI, USA). Agonista inverso de CB₁R. Dosis utilizada: 1.4 µg.

Dimetil Sulfóxido, DMSO (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Vehículo para 2-AG y AM251.

Sal de trifluoroacetato, Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-amida, S1820 (Sigma Aldrich, DF, México). Péptido agonista selectivo del PAR₁. Dosis utilizadas: 0.1 y 0.01 µg.

Cloruro de Sodio al 0.9% en agua inyectable (Baxter, DF, México). Vehículo para S1820.

12.7. Reactivos.

Paraformaldehído (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Albúmina de Bovino (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

4', 6-Diamino-2-fenilo, Diclorhidrato, DAPI (Invitrogen, San Diego, CA, USA).

Medio de Montaje para Fluorescencia, DAKO (Dako North America, Inc.)

12.8. Anticuerpos.

Anticuerpo policlonal anti-orexina-A (C-19), desarrollado en cabra (IgG) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).

Anticuerpo policlonal anti-promCH (E-16), desarrollado en cabra (IgG) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).

Anticuerpo policlonal anti-c-Fos (H-125), desarrollado en conejo (IgG) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).

Anticuerpo anti-IgG's de conejo, desarrollado en burro, acoplado a Alexa Fluor® 488 (Invitrogen, San Diego, CA, USA).

Anticuerpo anti-IgG's de cabra, desarrollado en burro, acoplado a Alexa Fluor® 555 (Invitrogen, San Diego, CA, USA).

13. Procedimientos generales.

13.1. Cirugía.

13.1.1. Registros electroencefalográfico y electromiográfico.

Las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de 66mg/kg de ketamina, 0.26 mg/kg de xilacina y 1.3 mg/kg de acepromacina, y con el estereotáxico se implantaron un conjunto de electrodos para registro polisomnográfico. Éste incluyó: dos electrodos de tornillo de acero inoxidable (0-80 X 1/16, Plastics One Inc, VA, USA), colocados en los huesos frontales; un electrodo bipolar de alambre de acero inoxidable cubierto de Teflon (0.013", A-M Systems Inc, WA, USA), colocado en el hipocampo (P=-4.0; L=±2; V=-2.5, con referencia a Bregma, y con base en el atlas de Paxinos y Watson, 2007), para registrar la actividad del EEG, ya que el ritmo theta es fácilmente detectado en esta estructura (Prospéro-García et al., 1993) y permite diferenciar entre las fases del ciclo sueño-vigilia; y dos electrodos retorcidos de alambre de acero inoxidable cubiertos de Teflon (0.013",

A-M Systems, WA, USA), colocados en los músculos de la nuca de las ratas, para registrar la actividad del EMG. Este conjunto estándar de electrodos fue fijado al cráneo de las ratas con cemento dental. Asimismo, para el registro del EEG y EMG se emplearon un polígrafo Grass modelo 7 y un amplificador modelo 7P511. Se utilizaron dos rangos de frecuencia: 1-30 Hz para el EEG y 30-100 Hz para el EMG. Las señales bioeléctricas del EEG y del EMG fueron capturadas digitalmente, y después calificadas *off line*, mediante el empleo del programa Icelus (Mark Opp, Ann Arbor, MI, USA; sección **12.5**) (Véanse trazos característicos del EEG y EMG, empleando este programa en la Figura 1.)

13.1.2. Cánulas guía para la administración de fármacos.

Durante el mismo tiempo quirúrgico descrito en el apartado **13.1.1** y con el estereotáxico, a las ratas les fueron implantadas un par de cánulas guía de acero inoxidable (23-G X 1.1cm, Plastics One), dirigidas bilateralmente al hipotálamo lateral (P= -1.8; L= ± 2 ; V= -6.6, con referencia a Bregma), con base en el atlas de Paxinos y Watson (2007). Estas cánulas fueron fijadas al cráneo de las ratas con cemento dental y después se sellaron con estiletes para mantenerlas permeables. Los estiletes (30G), así como los inyectores (Tygon® Flexible Plastic Tubing, Cleveland, Ohio, USA) empleados para administrar los fármacos, protruyeron 1 mm a partir de la punta de las cánulas guía.

Después de la cirugía, las ratas tuvieron un periodo de recuperación de 10 días. Durante éste, y hasta el final del experimento, los animales permanecieron bajo las condiciones mencionadas en el apartado **12.1**. Después de éste, y antes de la

administración de los fármacos, las ratas fueron sometidas a manipulación gentil durante 3 días, por 1 h diaria, para reducir el potencial estrés.

En el caso de los experimentos de inmunofluorescencia y de ingestión de alimento, las ratas sólo fueron implantadas con cánulas guía, dirigidas al hipotálamo lateral.

13.2. Administración de los fármacos.

En todos los experimentos, las administraciones de los fármacos se llevaron a cabo al inicio de la fase de oscuridad (8:00 am) en un recinto contiguo a la habitación donde se encontraban las cajas de sueño sonoamortiguadas. Durante este proceso, las ratas fueron inmovilizadas temporalmente. Como se mencionó en la sección **13.1.2**, los animales fueron sometidos a esta manipulación los 3 días previos a la administración de los fármacos, para reducir el potencial estrés que esto pudiera causarles.

La habitación donde estuvieron las cajas de sueño, incluyó las mismas características que el bioterio donde fueron alojados los animales, i. e. temperatura constante y controlada (23°C) y ciclo invertido de oscuridad-luz 12:12. Las cajas de sueño sonomaortiguadas fueron fabricadas con madera y Plexiglas y las ratas fueron alojadas dentro de éstas, en sus jaulas, los días de registro.

Los fármacos fueron administrados bilateralmente en el hipotálamo lateral, en un volumen de 0.5 µl y a una velocidad de 0.1 µl por min, mediante el empleo de una bomba de infusión (KD-Scientific, modelo 200, Holliston, MA, USA), jeringas Hamilton de 10 µl (Hamilton Company, Reno, NEV, USA) e inyectores fabricados

con aguja dental (30G) y tubo de polietileno (Tygon ® Flexible Plastic Tubing, Cleveland, Ohio, USA). Estos inyectores, al igual que los estiletes empleados para mantener permeables las cánulas guía, protruyeron 1 mm a partir de las puntas de las cánulas guía. Al cabo de los 5 min de infusión, los inyectores se dejaron por 1 min adicional en las cánulas guía, para prevenir un potencial reflujo de los fármacos.

13.3. Perfusión.

Al final de cada experimento, las ratas fueron sometidas a anestesia profunda con pentobarbital sódico (Sedalphorte, México, DF) y después fueron perfundidas por vía intracardíaca con 200 ml de búfer de fosfatos de salina (PBS) y con paraformaldehído al 4% (PFA4%). Posteriormente, los cerebros de las ratas fueron extraídos y almacenados en PFA4% por 24 h y en sacarosa al 30% por 24 h adicionales. Una vez transcurridas estas 48 h, los cerebros fueron cortados en un crióstato (Leica, CM1510-3) y se obtuvieron rebanadas coronales de 30 µm de grosor. Se colectaron entre 12 y 15 rebanadas de cerebro por rata, y éstas fueron montadas en un portaobjetos de vidrio (Fisher ® Superplus). Después, para verificar la posición de las cánulas (Figura 10), algunas de estas laminillas se tiñeron con violeta de cresilo y se observaron con un microscopio Olympus BX41 equipado con cámara Evolution VF Color Media Cybernetics. Los animales con cánulas guía en posición incorrecta fueron descartados de todos los estudios.

13.4. Evaluación del ciclo sueño-vigilia.

Veinticuatro h antes de la administración de los fármacos, las ratas fueron habituadas a las cajas de sueño, dentro de sus jaulas. Durante este periodo y hasta el final del experimento, las ratas y las señales bioeléctricas del EEG y del EMG fueron monitoreadas constantemente. Una vez transcurrido el periodo de habituación, las ratas fueron retiradas de las cajas de sueño y de sus jaulas. Luego, les fueron administrados los fármacos, como se mencionó en el apartado **13.2**. Después, las ratas fueron colocadas nuevamente en sus jaulas y enseguida en las cajas de sueño. Al cabo de este procedimiento, se comenzó a registrar el ciclo sueño-vigilia durante las siguientes 24 h. Se decidió registrar todo este tiempo porque en la literatura hasta ahora no se habían reportado las propiedades hipnóticas de 2-AG. Respecto a la evaluación del ciclo sueño-vigilia por la estimulación del PAR₁, en la presente Tesis Doctoral se documentan sólo las primeras 12 h de registro puesto que en las últimas 12 h no hubo cambios estadísticamente significativos.

Los registros del ciclo sueño-vigilia fueron capturados y analizados mediante el empleo de ICELUS® (Mark Opp, Ann Arbor, MI; sección **12.5**). Se identificaron visualmente y se calificaron *off line*, las siguientes fases: vigilia (EEG: actividad de frecuencia rápida y bajo voltaje, o actividad mixta; EMG: actividad alta), sueño de ondas lentas (SOL) (EEG: actividad de frecuencia lenta y alto voltaje; EMG: actividad baja) y sueño de movimientos oculares rápidos (s-MOR) (EEG: actividad preferentemente de frecuencia rápida y bajo voltaje; EMG: actividad nula).

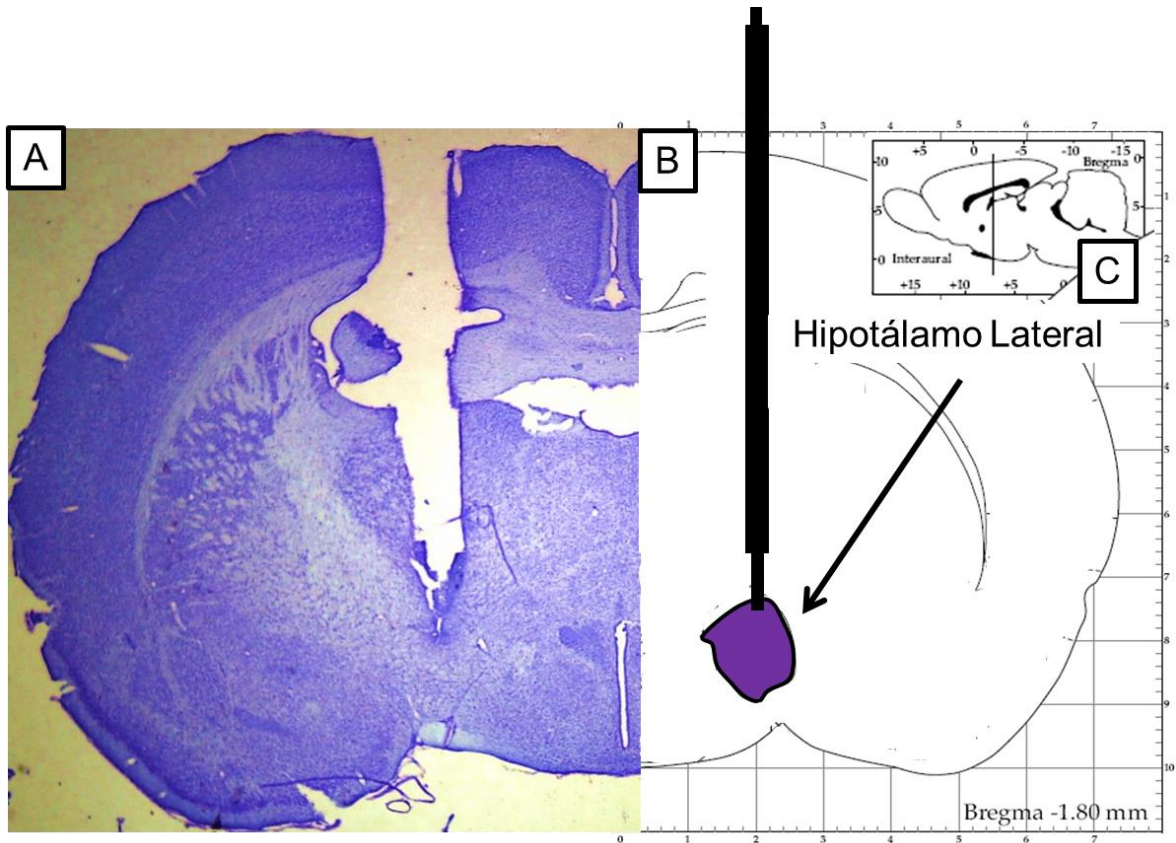


Figura 10. Ilustración representativa del sitio de inyección. A: fotografía que corresponde a un corte coronal de cerebro de rata, teñido con violeta de cresilo, en donde se aprecia el tracto de la cánula. B: esquema modificado del atlas de Paxinos y Watson (2007), en donde está ilustrada la cánula (línea negra gruesa), así como la punta del estilete y del inyector (línea negra delgada), dirigida al hipotálamo lateral. C: vista sagital de B, en donde la línea negra marca el nivel al cual se implantaron las cánulas. Detalles en los apartados **13.1.2** y **13.3**.

13.5. Evaluación de la ingestión de alimento.

A los animales se les dejó una cantidad preestablecida de alimento (50 g) en un dispositivo incluido en sus jaulas. De este modo, hora tras hora, al cabo de 4 h, y después 24 h, el alimento fue pesado con una báscula (OHAUS CS-200). Los valores se calcularon restando la cantidad de alimento inicial menos la cantidad de alimento de cada medición. Estos cálculos se corrigieron cuando se encontraron

restos de alimento en la jaula del animal. Este protocolo se llevó a cabo en dos ocasiones: 1) 24 h antes de la administración de los fármacos, para habituar a las ratas a esta manipulación, y 2) después de la administración de los fármacos.

13.6. Inmunofluorescencia de doble marcaje.

Noventa minutos después de la administración bilateral, en el hipotálamo lateral, de 0.01 µg de 2-AG ó de 0.5 µl de su vehículo (dimetil sulfóxido, DMSO), las ratas fueron sacrificadas con una sobredosis de pentobarbital sódico (Sedalphore, México, DF) y perfundidas vía intracardíaca con 200 ml de PBS y con PFA4%. Los cerebros fueron extraídos y fijados durante 24 h en PFA4%, embebidos 24 h en sucrosa al 18% y 24 h en sucrosa al 30%. Luego, los cerebros fueron cortados en un crióstato (Leica, CM1510-3) y se obtuvieron rebanadas coronales de 30 µm de grosor. Estas rebanadas fueron colocadas serialmente en un portaobjetos de vidrio Fisher® Superplus (Thermo Scientific, Portsmouth, NH, USA).

Las rebanadas de cerebro se lavaron 5 min, 3 veces, en PBS. Posteriormente, los sitios de pegado no específico fueron bloqueados con albúmina de bovino al 2.5% y Tritón X-100 en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiental. Después, los tejidos se incubaron con los anticuerpos primarios anti-orexina-A (C-19) (dilución, 1:1000) y anti-c-Fos (H-125) (dilución, 1: 100), ó en anti-proMCH (E-16) (dilución, 1: 1000) y anti-c-Fos (1: 100), durante 24 h a temperatura ambiental. Al cabo de 24 h, los tejidos se lavaron 5 min, 3 veces, en PBS. Posteriormente, se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-IgG's de cabra (dilución, 1:500), acoplados a AlexaFluor® 555, y en el anticuerpo secundario anti-IgG's de conejo (dilución 1:500), acoplado a AlexaFluor® 488. AlexaFluor® 555 fue empleado para el

marcaje de OX-A y pro-MCH. AlexaFluor® 488 fue empleado para el marcaje de c-Fos. Los anticuerpos secundarios fueron diluidos en Tritón X-100 al 0.25% y PBS, y las rebanadas se incubaron con los anticuerpos por 2 horas a temperatura ambiental. Posteriormente, los tejidos fueron lavados en PBS 5 min, 3 veces, y los núcleos se tiñeron con DAPI (Invitrogen, San Diego, CA, USA) (dilución, 1: 10000). Finalmente, después del tercer lavado en PBS, los tejidos fueron cubiertos con el medio de montaje para fluorescencia DAKO (Dako North America, Inc.) y se les dejó secar a temperatura ambiental durante 5 min. Los portaobjetos fueron cubiertos con cubreobjetos. Las preparaciones fueron observadas en un microscopio laser confocal (Olympus FV-100) equipado con un objetivo de inmersión para medio aceitoso 60X (N.A.1.4). Las imágenes fueron adquiridas con una unidad aérea con la apertura de un agujero de alfiler 1.0 y la intensidad de fluorescencia para cada pixel fue promediada tres veces durante la adquisición.

13.7. Cuantificación de c-fos.

Las neuronas positivas para OX-A, ó proMCH, y c-Fos, fueron contadas manualmente y con el empleo del método semiautomático de detección del programa "ImageJ". Para cumplir con los requisitos de este sistema estereológico, cada tercera sección hipotalámica de las ratas control y experimentales fue procesada por inmunofluorescencia para reconocer OX-A y c-Fos (seis secciones en total, por cada rata) y proMCH y c-Fos (seis secciones en total, por cada rata). Con el propósito de evitar una sobreestimación de las neuronas positivas a c-Fos, los cuerpos celulares de OX-A y proMCH positivos para c-Fos en el hipotálamo lateral fueron definidos como aquellos objetos de una dimensión mayor a $200 \mu\text{m}^2$

y que co-localizaran con DAPI nuclear y c-Fos. El número de células que co-localizaron con c-Fos fue estimado con el método de conteo tridimensional modificado, diseñado por Williams y Rakic (1988).

13.8. Análisis estadístico.

Los resultados se reportan como media \pm el error estándar de la media (MEDIA \pm EE). Las diferencias significativas fueron obtenidas empleando una t de Student para muestras independientes (experimentos de inmunofluorescencia) o un análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA) seguido de una prueba *post hoc* de Bonferroni (experimentos de ciclo sueño-vigilia y de ingestión de alimento). Se consideraron estadísticamente significativas $P < 0.05$. Para los experimentos de ciclo sueño-vigilia, fueron calculados los tiempos (min) de vigilia, SOL y s-MOR en 3 bloques de 4 h cada uno y en dos 2 bloques de 12 h cada uno, para cada grupo. Asimismo, fueron calculadas las latencias para SOL (el tiempo transcurrido desde el inicio del registro hasta el primer episodio de SOL) y para s-MOR (el tiempo transcurrido desde el primer episodio de SOL hasta el primer episodio de s-MOR), la frecuencia (número) y la duración promedio (min) de los episodios de vigilia, SOL y s-MOR, para cada grupo. Para los experimentos de ingestión de alimento, se calcularon las cantidades de alimento (g) con base en el protocolo mencionado en el apartado **13.5**.

14. Procedimientos experimentales.

14.1. Estimulación del CB₁R por 2-AG en el hipotálamo lateral.

14.1.1. Efectos de la administración de 2-AG en el hipotálamo lateral sobre el ciclo sueño-vigilia.

En las condiciones mencionadas en el apartado **13.2**, las ratas de grupos independientes (n=10, por grupo) fueron administradas bilateralmente en el hipotálamo lateral con uno de los siguientes tratamientos: 1) vehículo, 2) 0.01 µg de 2-AG, 3) 0.1 µg de 2-AG, 4) 1 µg de 2-AG, 5) 1.4 µg de AM251 y 6) 0.01 µg de 2-AG en combinación con 1.4 µg de AM251. El vehículo para todas las drogas fue DMSO al 100%. Asimismo, como se mencionó en el apartado **13.2**, todas las drogas fueron administradas en un volumen total de 0.5 µl, incluso en el caso de la combinación de 2-AG y AM251, y a una velocidad de 1 µl por minuto. Cabe señalar que las 3 dosis empleadas de 2-AG fueron seleccionadas con base en estudios previos realizados por nuestro grupo, en los cuales se reportó que otros endocannabinoides, tales como AEA y OLE, inducen efectos sobre el sueño (Herrera-Solís et al., 2010; Rueda-Orozco et al., 2010). Asimismo, puesto que hasta ahora no existían reportes científicos que documentaran las propiedades hipnóticas de 2-AG, se decidió registrar durante 24 h. Por otra parte, para evaluar si los efectos inducidos por 2-AG estaban mediados por la activación del CB₁R, la dosis empleada de AM251, antagonista del CB₁R, fue 1.4 µg. Esta dosis fue seleccionada con base en su equimolaridad con 1 µg de 2-AG. Como se detallará en la sección de resultados, 1.4 µg de AM251 no indujo cambios sobre el s-MOR y

por esta razón se decidió administrar esta dosis en combinación con la dosis de 2-AG (0.01 µg) que indujo un efecto sobre el s-MOR.

14.1.2. Efectos de la administración de 2-AG en el hipotálamo lateral sobre la expresión de c-Fos en las neuronas MCHérgicas y orexinérgicas.

En las condiciones mencionadas en el apartado **13.2**, las ratas de grupos independientes (n=6, por grupo) fueron administradas bilateralmente en el hipotálamo lateral con uno de los siguientes tratamientos: 1) vehículo y 2) 0.01 µg de 2-AG. Estos experimentos fueron realizados para evaluar si el incremento inducido en el s-MOR por la administración de 0.01 µg de 2-AG en el hipotálamo lateral, involucraba la modulación de la actividad de las neuronas OX y MCH. Para cumplir con este propósito se llevó a cabo inmunofluorescencia de doble marcaje para detectar MCH/c-Fos y OX-A/c-Fos, empleando c-Fos como marcador de activación neuronal. De este modo, 90 min después de la administración de los fármacos correspondientes, las ratas fueron sacrificadas con una dosis letal de pentobarbital sódico (Sedalphorte), tal y como se mencionó en la sección **13.3**. Posteriormente, las ratas fueron perfundidas con PBS y PFA4%, y después se comenzó con el protocolo de inmunofluorescencia de doble marcaje, detallado en las secciones **13.6** y **13.7**.

14.2. Estimulación del PAR₁ por S1820 en el hipotálamo lateral.

14.2.1. Efectos de la estimulación del PAR₁ sobre el ciclo sueño-vigilia.

En las condiciones mencionadas en la sección **13.2**, las ratas de grupos independientes (n=10, por grupo) fueron administradas bilateralmente en el hipotálamo lateral, con uno de los siguientes tratamientos: 1) vehículo, 2) 10 ng de S1820, 3) 100 ng de S1820, 4) 1.4 µg de AM251, y 5) 1.4 µg de AM251 + 10 ng de S1820.

Debido a que S1820 es un péptido selectivo para activar al PAR₁ (Figura 9B) y a que hasta ahora no se habían reportado sus efectos sobre el sueño y la ingestión de alimento, las dosis empleadas en esta propuesta experimental fueron seleccionadas con base en las dosis empleadas por otros para documentar efectos inducidos por péptidos sobre el ciclo sueño-vigilia y sobre la ingestión de alimento (para leer una revisión al respecto, ver Prospéro-García & Méndez-Díaz, 2004). Asimismo, para evaluar si los efectos inducidos por la estimulación del PAR₁ en el hipotálamo lateral estaban mediados por la activación del CB₁R se empleó la misma dosis que previno los efectos inducidos por la administración de 2-AG y que *per se*, como se mencionará en la sección de resultados, no indujo efectos sobre el s-MOR.

El vehículo para S1820 fue solución salina y para AM251 fue DMSO al 100%. Cuando se evaluó la capacidad de AM251 para prevenir los efectos inducidos por S1820, AM251 fue administrado 15 min antes de S1820.

Al igual que en los experimentos de la sección **14.1**, las drogas fueron disueltas en un volumen total de 0.5 µl y fueron administradas a una velocidad de 0.1 µl por

minuto, incluso en el caso de la administración de 1.4 µg de AM251 y 10 ng de S1820. Una vez concluida la administración de los fármacos, se registró durante las siguientes 24 h, aunque en la presente Tesis Doctoral sólo se reportan las primeras 12 h puesto que no hubo cambios significativos en las últimas 12 h de registro.

14.2.2. Efectos de la estimulación del PAR₁ sobre la ingestión de alimento.

En las condiciones mencionadas en la sección **13.2**, las ratas de grupos independientes (n=10, por grupo) fueron administradas bilateralmente en el hipotálamo lateral, con uno de los siguientes tratamientos: 1) vehículo, 2) 10 ng de S1820, 3) 100 ng de S1820, 4) 1.4 µg de AM251, y 5) 1.4 µg de AM251 + 100 ng de S1820.

Cuando se evaluó la capacidad de AM251 para prevenir los efectos inducidos por S1820, AM251 fue administrado 15 min antes de S1820.

Asimismo, las drogas fueron disueltas en un volumen total de 0.5 µl y fueron administradas a una velocidad de 0.1 µl por minuto, incluso en el caso de la administración de 1.4 µg de AM251 y 100 ng de S1820. Una vez concluida la administración de los fármacos, se comenzó con el protocolo detallado en la sección **13.5**.

15. Resultados.

15.1. La administración de 2-AG (0.01 µg), agonista del receptor a cannabinoides tipo 1, en el hipotálamo lateral, incrementa el s-MOR y la frecuencia de episodios de s-MOR, mediante la activación del receptor a cannabinoides tipo 1.

15.1.1. Primeras 12 h de registro (fase de oscuridad).

La administración de 0.01 µg de 2-AG en el hipotálamo lateral, incrementó el s-MOR (min), a lo largo de todo este periodo [1-4 h: $F(5, 59) = 6.46$, $P = 0.001$; 5-8 h: $F(5, 59) = 4.51$, $P = 0.002$; 9-12 h: $F(5, 59) = 2.56$, $P = 0.037$; y total 12 h: $F(2, 29) = 20.17$, $P = 0.001$; 31.8 ± 5.7 vs. 59.7 ± 4.9 min] (Figura 11C; Tabla 1, izquierda), y también incrementó el número de episodios de s-MOR [$F(5, 59) = 5.26$; $P = 0.001$] (Tabla 2), pero no indujo cambios ni en la vigilia ni en el SOL (Figuras 11A y 11B, respectivamente; Tabla 1, izquierda). Por otra parte, ni 0.1 µg ni 1 µg de 2-AG ni 1.4 µg de AM251 indujeron cambios significativos en ninguna fase del ciclo sueño-vigilia, aunque AM251, antagonista del CB₁R, incrementó la vigilia [1-4 h: $F(5, 59) = 5.95$, $P = 0.001$] y redujo el SOL [1-4 h: $F(5, 59) = 5.43$, $P = 0.001$], durante las primeras 4 h de registro (Figuras 11A y 11B; Tabla 1, izquierda). AM251 también alargó las latencias a SOL [$F(5, 59) = 52.03$, $P = 0.001$] y a s-MOR [$F(5, 59) = 75.47$, $P = 0.001$], y aumentó la frecuencia de episodios de vigilia [$F(5, 59) = 27.34$, $P = 0.001$] (Tabla 2). Cuando se administró en conjunto con 0.01 µg de 2-AG, AM251 (1.4 µg) previno el incremento inducido en el s-MOR por 0.01 µg de 2-AG a lo largo de todo este periodo [1-4 h: $F(3, 39) =$

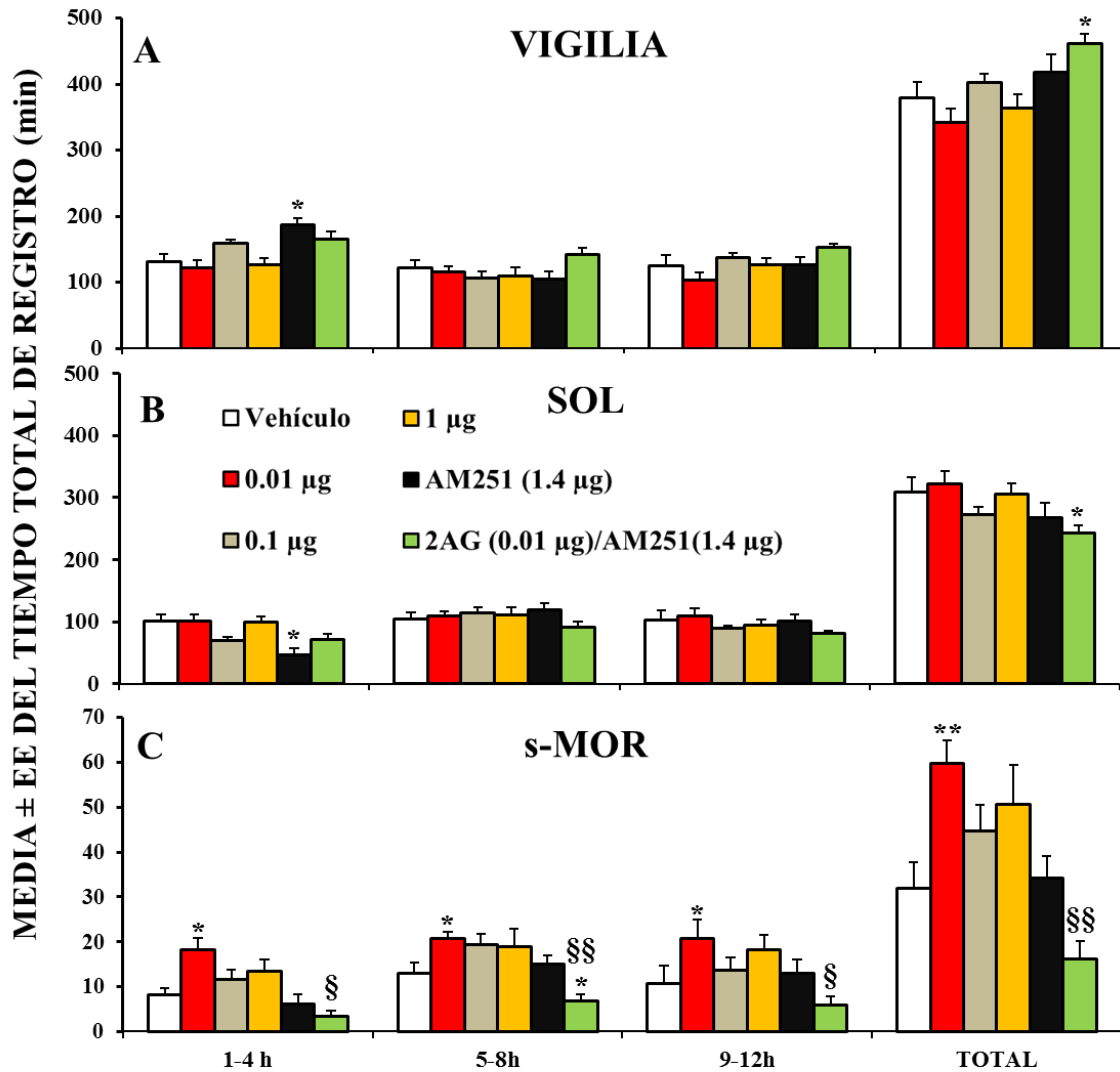
10.57, $P = 0.001$; 5-8 h: $F(3, 39) = 9.06$, $P = 0.001$; 9-12 h: $F(3, 39) = 3.32$, $P = 0.030$; y total 12 h: $F(3, 39) = 13.46$; $P = 0.001$; 59.7 ± 4.9 min vs. 16.2 ± 3.8 min] (Figura 11C; Tabla 1, panel izquierdo). Igualmente, cuando se administró en conjunto con $0.01 \mu\text{g}$ de 2-AG, AM251 ($1.4 \mu\text{g}$) previno el incremento inducido por $0.01 \mu\text{g}$ de 2-AG en la frecuencia de episodios de s-MOR [$F(2, 29) = 7.49$, $P = 0.003$] (Tabla 2).

Tabla 1. Media \pm EE del tiempo total (min) de las fases del ciclo sueño-vigilia, correspondientes a la administración de los fármacos 2-AG, AM251 y 2-AG + AM251 en el hipotálamo lateral.

		OSCURIDAD			LUZ		
		1-4 h	5-8 h	9-12 h	13-16 h	17-20 h	21-24 h
V	Vehículo	131.2 \pm 12.4	122 \pm 12.1	125.9 \pm 15.6	82.5 \pm 12	77.2 \pm 10.3	100.2 \pm 7.7
	0.01 μ g	122 \pm 11.8	116.4 \pm 8.4	103.6 \pm 11.1	77 \pm 9.7	87.5 \pm 11.2	134.5 \pm 9.8*
	0.1 μ g	158.6 \pm 5.9	105.8 \pm 10.1	137.4 \pm 7.4	56.8 \pm 6.7	76.2 \pm 11.4	99.9 \pm 9.6
	1 μ g	126.8 \pm 9.9	109.5 \pm 13.7	126.9 \pm 10	72.1 \pm 11.5	60.6 \pm 9	89.5 \pm 10.8
	1.4 μ g (AM251)	186.6 \pm 10.9*	105.7 \pm 11.1	126 \pm 12	83.1 \pm 5.6	120.4 \pm 10.9*	141.7 \pm 7.7*
	2AG+AM251	165.8 \pm 10.9	142.2 \pm 10.3	152.8 \pm 5.1	116 \pm 10.6*	120.5 \pm 11.2*	169.3 \pm 10.7*§
SOL	Vehículo	100.5 \pm 11.8	104.8 \pm 10.7	103 \pm 14.9	135.7 \pm 11.2	139.1 \pm 10.3	122.2 \pm 7.8
	0.01 μ g	101.8 \pm 10.2	109.4 \pm 7.7	110 \pm 11.5	132.4 \pm 7.4	130.5 \pm 9.8	90.5 \pm 7.4*
	0.1 μ g	69.7 \pm 5.2	114.7 \pm 8.7	88.7 \pm 5.6	154.9 \pm 5.5	138.5 \pm 9.2	120.8 \pm 9.1
	1 μ g	99.6 \pm 8.7	111.4 \pm 11.7	94.8 \pm 8.2	141.3 \pm 9.7	147.6 \pm 8.4	124.4 \pm 8.8
	1.4 μ g (AM251)	47.1 \pm 10.1*	119.2 \pm 10.2	100.9 \pm 10.5	142.1 \pm 3.3	105.6 \pm 9.2*	88.5 \pm 6.6*
	2AG+AM251	70.6 \pm 10.5	90.8 \pm 9.3	81.2 \pm 4.9	114.7 \pm 10	110.3 \pm 11.9	65.6 \pm 10.6**
s-MOR	Vehículo	8.2 \pm 1.5	13 \pm 2.3	10.6 \pm 4.1	21.7 \pm 3.7	23.5 \pm 2.5	17.5 \pm 1.6
	0.01 μ g	18.2 \pm 2.6*	20.7 \pm 1.5*	20.7 \pm 4*	30.4 \pm 5.9	21.8 \pm 4	14.9 \pm 4.5
	0.1 μ g	11.5 \pm 2.2	19.4 \pm 2.4	13.7 \pm 2.8	28.2 \pm 4.2	25.1 \pm 4.5	19.1 \pm 4.1
	1 μ g	13.5 \pm 2.4	18.9 \pm 3.9	18.2 \pm 3.3	26.5 \pm 3.7	31.7 \pm 3.3	25.9 \pm 3.3
	1.4 μ g (AM251)	6.1 \pm 2	14.9 \pm 2	13 \pm 3	14.6 \pm 3	13.8 \pm 2.6*	9.6 \pm 1.7*
	2AG+AM251	3.4 \pm 1.3§	6.9 \pm 1.4*§§	5.9 \pm 1.7§	9.1 \pm 1.7*§	9 \pm 1.9*§	4.9 \pm 1.1**

A ratas de grupos independientes se les administró, bilateralmente, en el hipotálamo lateral: Vehículo; el agonista del CB₁R, 2-AG (0.01, 0.1 ó 1 μ g); el antagonista del CB₁R, AM251 (1.4 μ g); ó 2-AG (0.01 μ g) + AM251 (1.4 μ g). Los datos están agrupados en bloques de 4 h, correspondientes a las primeras (OSCURIDAD) y a las últimas (LUZ) 12 h de registro. *p<0.05, **p<0.001 vs. Vehículo; §p<0.05, §§p<0.001 vs. 2-AG (0.01 μ g); n=10, por grupo. V: vigilia; SOL: sueño de ondas lentas; s-MOR: sueño de movimientos oculares rápidos.

Figura 11. Efectos de la administración de 2-AG, AM251 y 2-AG + AM251 en el hipotálamo lateral, sobre el ciclo sueño-vigilia, en las primeras 12 h de registro (fase de oscuridad).



Estos datos son los que se muestran en la Tabla 1, a excepción de la última barra (TOTAL), y corresponden a las primeras 12 h de registro (OSCURIDAD). Se grafica el tiempo (min) en bloques de 4 h y en el total de 12 h. 2-AG: agonista del CB₁R (0.01, 0.1 ó 1 µg); AM251: antagonista del CB₁R (1.4 µg). *p<0.05, **p<0.001 vs. Vehículo; §p<0.05, §§p<0.001 vs. 2-AG (0.01µg); n=10, por grupo. V: vigilia (A); SOL: sueño de ondas lentas (B); s-MOR: sueño de movimientos oculares rápidos (C).

Tabla 2. Media \pm EE de las latencias al sueño, duración y frecuencia de episodios, correspondientes a la administración de 2-AG, AM251 y 2-AG+AM251 en el hipotálamo lateral.

	OSCURIDAD							
	LATENCIAS		FRECUENCIA DE EPISODIOS			DURACIÓN DE EPISODIOS		
	SOL	s-MOR	V	SOL	s-MOR	V	SOL	s-MOR
Vehículo	37.7 \pm 4.4	23.9 \pm 4.8	29.8 \pm 1.2	28.9 \pm 1.3	18.1 \pm 2.9	12.7 \pm 0.6	10.7 \pm 0.7	1.7 \pm 0.2
0.01 μ g	29.3 \pm 2.4	19.4 \pm 1.7	*22 \pm 1.3	**48.9 \pm 5	*31.4 \pm 4.1	*15.6 \pm 0.4	**6.6 \pm 0.6	1.8 \pm 0.1
0.1 μ g	53.8 \pm 2.9*	22.8 \pm 2.7	32.1 \pm 1	34.5 \pm 1.5	14 \pm 1	12.6 \pm 0.4	*7.9 \pm 0.2	*3.1 \pm 0.2
1 μ g	36.7 \pm 4	19.9 \pm 3.2	27.9 \pm 1.3	34.8 \pm 1.6	26.7 \pm 4.5	13 \pm 0.5	8.8 \pm 0.3	1.9 \pm 0.1
1.4 μ g (AM251)	**105.3 \pm 4.3	**56.7 \pm 3.1	*37.7 \pm 1.1	32.6 \pm 1.9	22.6 \pm 2.3	11 \pm 0.6	*8.1 \pm 0.5	1.5 \pm 0.1
2-AG + AM251	**63.5 \pm 4.3	**122.1 \pm 8.7	*§40 \pm 1.4	*35.8 \pm 1.2	§13 \pm 3.2	§11.5 \pm 0.3	**6.8 \pm 0.3	1.2 \pm 0

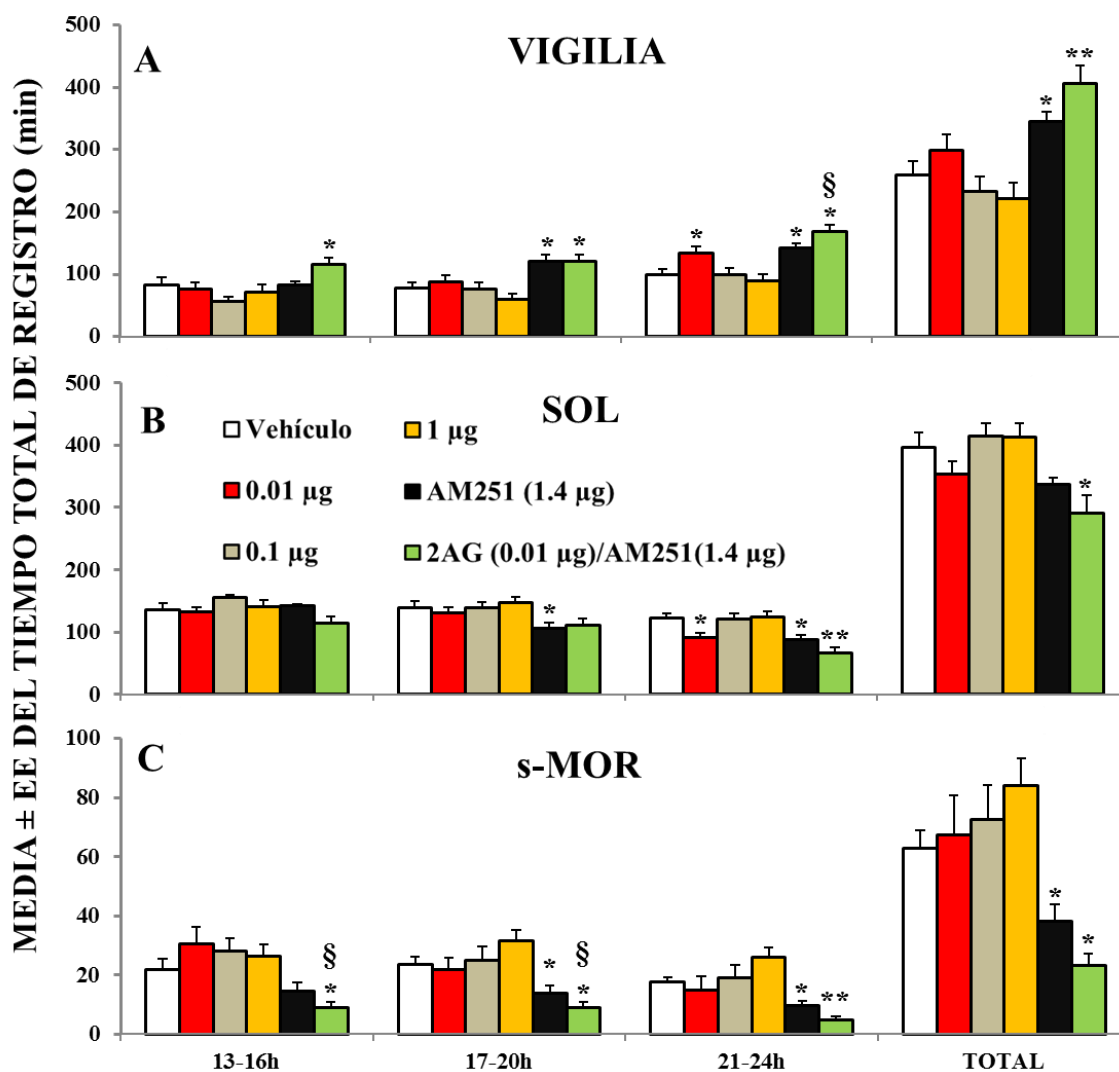
Las latencias y la duración de episodios están en minutos (min), mientras que la frecuencia se muestra en número (de episodios). Los datos corresponden a las primeras 12 h de registro (fase de oscuridad), posteriores a la administración de: Vehículo; 2-AG (0.01, 0.1 ó 1 μ g), agonista del CB₁R; AM251 (1.4 μ g), antagonista del CB₁R; ó 2-AG (0.01 μ g) + AM251 (1.4 μ g). * p <0.05, ** p <0.001 vs. Vehículo; § p <0.05, §§ p <0.001 vs. 2-AG (0.01 μ g); n =10, por grupo. V: vigilia; SOL: sueño de ondas lentas; s-MOR: sueño de movimientos oculares rápidos.

15.1.2. Últimas 12 h de registro (fase de luz).

Durante este periodo, 0.01 μ g de 2-AG no indujo cambios significativos en los tiempos totales de vigilia, SOL y s-MOR (min), aunque incrementó la vigilia [21-24h: F (5, 59) = 10.62, P = 0.001] y decrementó el SOL [21-24 h: F (3, 39) = 3.71, P = 0.001], en las últimas 4 h de registro (Figuras 12A y 12B, respectivamente; Tabla 1, derecha). Ni 0.1 μ g ni 1 μ g de 2-AG indujeron cambios en el ciclo sueño-vigilia, durante este periodo. Por otra parte, AM251 (1.4 μ g) incrementó la vigilia [17-20 h: F (5, 59) = 5.32, P = 0.001; 21-24 h: F (5, 59) = 10.62, P = 0.001; y total 12 h: F (5, 59) = 8.87, P = 0.001; 260 \pm 21.8 min vs. 345.4 \pm 15.6 min] (Figura 12A;

Tabla 1, derecha) y decrementó tanto el SOL [17-20 h: $F(5, 59) = 2.91, P = 0.021$; 21-24 h: $F(5, 59) = 8.01, P = 0.001$] (Figura 12B; Tabla 1, panel derecho) como el s-MOR [17-20 h: $F(2, 29) = 9.67, P = 0.001$; 21-24 h: $F(2, 29) = 16.61, P = 0.001$; y total 12 h: $F(3, 39) = 8.92, P = 0.008$; 62.9 ± 6 min vs. 38.1 ± 5.6 min] (Figura 12C; Tabla 1, derecha). Asimismo, AM251 en combinación con $0.01 \mu\text{g}$ de 2-AG, incrementó la vigilia [13-16 h: $F(2, 29) = 3.81, P = 0.035$; 17-20 h: $F(5, 59) = 5.32, P = 0.001$; 21-24 h: $F(5, 59) = 10.62, P = 0.001$; y total 12 h: $F(5, 59) = 8.87, P = 0.001$; 260 ± 21.8 min vs. 405.9 ± 28.6 min] (Figura 12A; Tabla 1, derecha) y decrementó el SOL [21-24 h: $F(5, 59) = 8.01, P = 0.001$; y total 12 h: $F(5, 59) = 5.02, P = 0.001$; 397 ± 23 min vs. 290 ± 29.6 min] (Figura 12B; Tabla 1, derecha) y el s-MOR [13-16 h: $F(2, 29) = 4.57, P = 0.019$; 17-20 h: $F(3, 39) = 5.57, P = 0.003$; 21-24 h: $F(3, 39) = 4.52, P = 0.009$; y total 12 h: $F(5, 59) = 6.48, P = 0.001$; 62.9 ± 6 min vs. 23.2 ± 4.1 min] (Figura 12C; Tabla 1, derecha).

Figura 12. Efectos de la administración de 2-AG, AM251 y 2-AG + AM251 en el hipotálamo lateral, sobre el ciclo sueño-vigilia, en las últimas 12 h de registro (fase de luz).



Estos datos son los que se muestran en la Tabla 1, a excepción de la última barra (TOTAL), y corresponden a las últimas 12 h de registro (LUZ). Se grafica el tiempo (min) en bloques de 4 h y en el total de 12 h. 2-AG: agonista del CB₁R (0.01, 0.1 ó 1 µg); AM251: antagonista del CB₁R (1.4 µg). *p<0.05, **p<0.001 vs. Vehículo; §p<0.05 vs. 2-AG (0.01µg); n=10, por grupo. V: vigilia (A); SOL: sueño de ondas lentas (B); s-MOR: sueño de movimientos oculares rápidos (C).

15.2. La administración de 2-AG (0.01 µg), agonista del receptor a cannabinoides tipo 1, en el hipotálamo lateral, incrementa la expresión de c-Fos en las neuronas MCHérgicas.

Para evaluar si el incremento en el s-MOR inducido por la administración de 0.01 µg de 2-AG en el hipotálamo lateral podía ser asociado con la actividad de las neuronas OX y MCH, las células de esta región cerebral se tiñeron con los anticuerpos OX-A (ó pro-MCH) y c-Fos (Figuras 13 y 14), después de la administración de esta droga o de su vehículo.

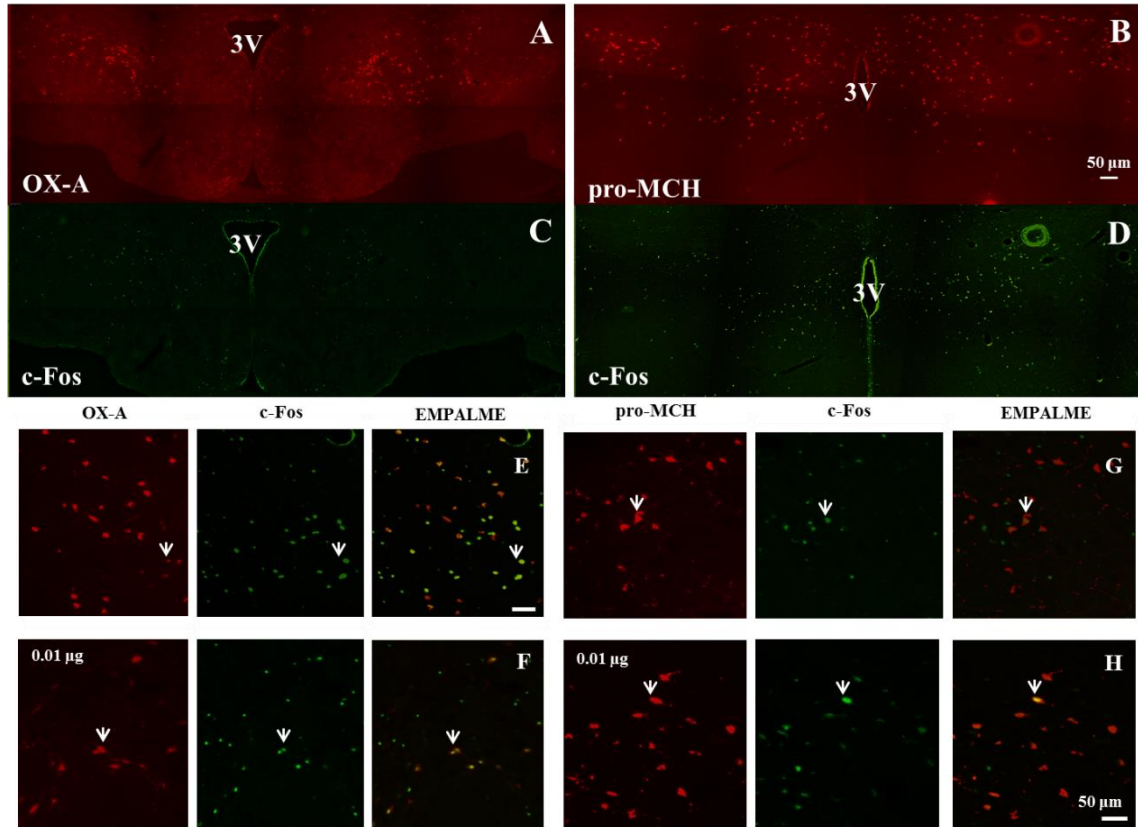
El 17.4% del total de células positivas a pro-MCH y el 51.9% del total de células positivas a OX-A, también fueron positivas a c-Fos en el grupo al que se le administró vehículo, mientras que el 88.8% del total de células positivas a pro-MCH y el 43.7% del total de células positivas a OX-A, también fueron positivas a c-Fos en el grupo al que se le administró 2-AG. De esta forma, 2-AG indujo un incremento significativo en la expresión de c-Fos en las neuronas MCH [$t(8) = -4.72$; $P = 0.001$; 272.2 ± 9.6 vs. 1189.2 ± 193.7] y un decremento no significativo en la expresión de c-Fos en las neuronas OX-A ($p > 0.05$) (Figura 15; Tabla 3).

Tabla 3. Cuantificación del número de células inmunoreactivas a OX-A, pro-MCH, c-Fos, OX-A/c-Fos y pro-MCH/c-Fos, posteriores a la administración de 2-AG, agonista del receptor a cannabinoides tipo 1, en el hipotálamo lateral.

	Vehículo	2-AG (0.01µg)
Células + a c-Fos	1079.9 ± 125.367	1234.7 ± 147.532
Células + a OX-A	1159.6 ± 134.596	935.8 ± 53.096
Células + a pro-MCH	1564 ± 183.28	1337.8 ± 196.841
Células + a c-Fos / OX-A	602.8 ± 83.044	409 ± 29.184
Células + a c-Fos / pro-MCH	272.2 ± 9.646	**1189 ± 193.715

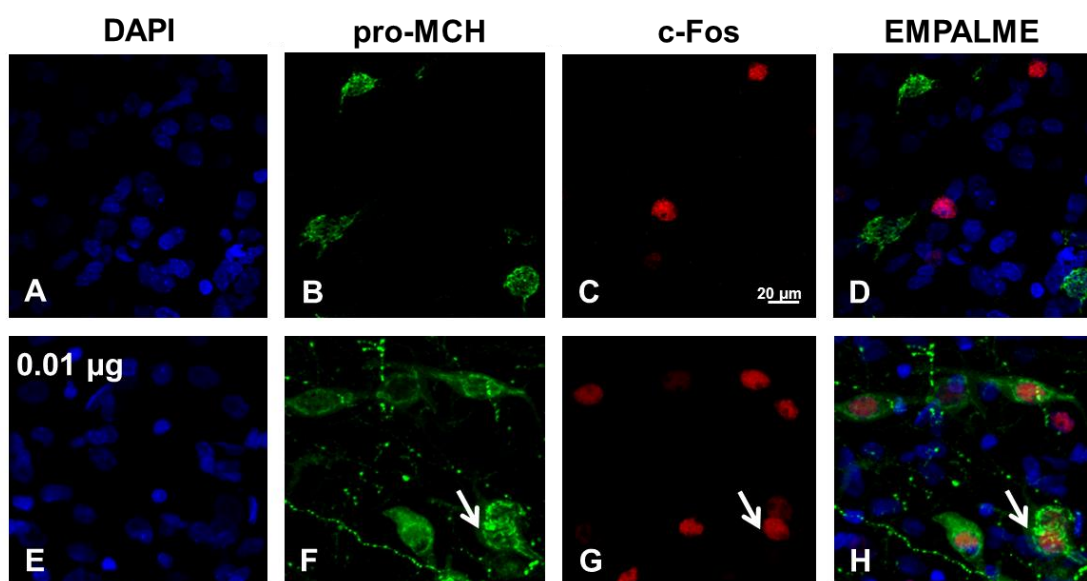
Media ± EE del número de células positivas (+) a: c-Fos, OX-A, pro-MCH, c-Fos/OX-A y c-Fos/pro-MCH, correspondientes a la administración bilateral intra-hipotálamo lateral de 0.01 µg de 2-AG ó su vehículo. (n=6, por grupo). **p<0.001 vs. Vehículo.

Figura 13. Inmunofluorescencia de doble marcaje para OX-A/c-Fos y pro-MCH/c-Fos en el hipotálamo lateral.



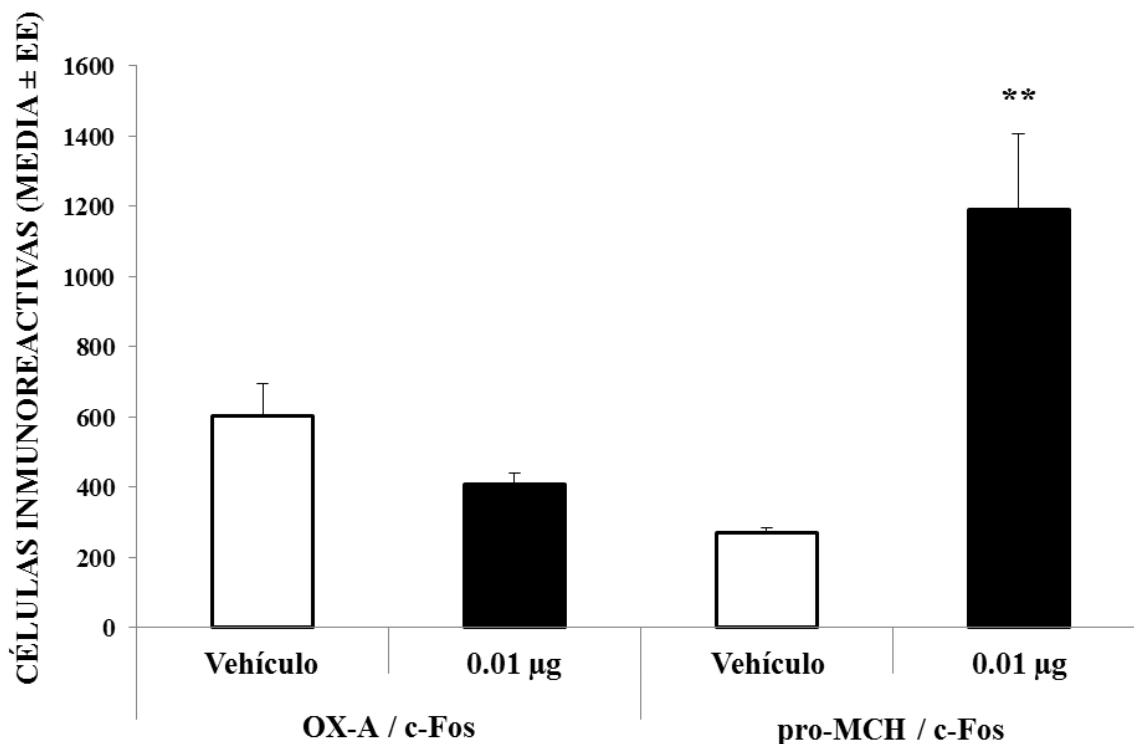
Distribución de OX-A/pro-MCH y expresión de c-Fos en el hipotálamo lateral, después de la administración de 0.01 µg de 2-AG, o su vehículo, en esta región cerebral. Fotomicrografías representativas de secciones coronales de cerebro de rata, teñidas con el método de inmunofluorescencia de doble marcaje, con el anticuerpo OX-A (A), o con el anticuerpo pro-MCH (B), y con el anticuerpo c-Fos, para ambos casos (C, D). Abajo (E, F, G y H), se muestran ampliaciones para OX-A, c-Fos y el empalme para OX-A y c-Fos, respectivamente (panel izquierdo), correspondientes al vehículo (E) ó 0.01 µg de 2-AG (F); y para pro-MCH, c-Fos y el empalme para pro-MCH y c-Fos, respectivamente (panel derecho), correspondientes al vehículo (G) ó 0.01 µg de 2-AG (H). Las flechas señalan células positivas para cada anticuerpo. La escala (50 µm) en B es aplica para A, C y D. La escala en H (50 µm) aplica para E, F y G. 3V: tercer ventrículo.

Figura 14. Expresión de DAPI, pro-MCH y c-Fos en el hipotálamo lateral, por inmunofluorescencia de doble marcaje, correspondiente a la administración de 2-AG, agonista del receptor a cannabinoides tipo 1.



Fotomicrografías representativas de cortes coronales de cerebro de rata, teñidas con el método de inmunofluorescencia de doble marcaje, con los anticuerpos pro-MCH y c-Fos, después de la administración de 0.01 µg de 2-AG, o su vehículo, en esta región cerebral. Imágenes de microscopio confocal para DAPI (A, E), pro-MCH (B, F), c-Fos (C, G) y el empalme para DAPI, pro-MCH y c-Fos (D, H), correspondientes al vehículo (arriba) ó 0.01 µg de 2-AG (abajo). Las flechas señalan células positivas para cada anticuerpo. Nótese la co-expresión de pro-MCH y c-Fos para 0.01 µg de 2-AG. La escala en C (20 µm), aplica para todas las fotomicrografías. Amplificación (A-H): 1X.

Figura 15. Cuantificación del número de células positivas a OX-A/c-Fos y pro-MCH/c-Fos en el hipotálamo lateral, correspondiente a la administración de 2-AG, agonista del receptor a cannabinoides tipo 1.



Estos datos son los que se muestran en la Tabla 3. Se grafica el número de células positivas a OX-A/c-Fos y pro-MCH/c-Fos, después de la administración bilateral intra-hipotálamo lateral de 2-AG (0.01 µg), o su vehículo, con base en los experimentos ilustrados en las Figuras 13 y 14. **p<0.001 vs. Vehículo; n=6, por grupo.

15.3. La estimulación del receptor activado por proteinasas 1 en el hipotálamo lateral, incrementa el s-MOR y la frecuencia de episodios de s-MOR, a través de la activación del receptor a cannabinoides tipo 1.

15.3.1. 12 h de registro (fase de oscuridad).

En los antecedentes se mencionó que una serie de experimentos *in vitro*, reportaron que la estimulación del receptor activado por proteinasas 1 (PAR₁) induce señalización retrógrada sináptica, a través del receptor a cannabinoides tipo 1 (CB₁R) y del endocannabinoide 2-AG, en células hipocámpales de roedor (sección **10.1**). En este contexto, ya que mostramos que la administración de 2-AG en el hipotálamo lateral, incrementa el s-MOR, a través del CB₁R (sección **15.1**), en este experimento evaluamos si la estimulación del PAR₁ en esta región cerebral promueve cambios en el s-MOR.

La administración de 10 ng de S1820, agonista del PAR₁, en el hipotálamo lateral, incrementó el s-MOR (min), a partir del segundo bloque de registro [5-8h: $F(2, 27) = 6.47$, $P = 0.005$; 9-12h: $F(2, 27) = 25.06$, $P = 0.001$; y total 12 h: $F(2, 27) = 17.82$, $P = 0.001$] (Figura 16C; Tabla 4). Estos cambios en el s-MOR, inducidos por 10 ng de S1820, fueron acompañados por un incremento en la frecuencia de episodios de s-MOR [$F(2, 27) = 18.88$, $P = 0.001$] (Tabla 5). Asimismo, la administración de 10 ng de S1820 acortó las latencias a SOL (min) [$F(2, 27) = 6.53$, $P = 0.005$] y a s-MOR [$F(2, 27) = 5.26$, $P = 0.012$] (Tabla 5), pero no indujo cambios en la vigilia (Figura 16A; Tabla 4) ni en el SOL (Figura 16B; Tabla 4), aunque incrementó la frecuencia de episodios de SOL [$F(2, 27) = 9.88$, $P = 0.001$]

y disminuyó la duración promedio de episodios de SOL [$F(2, 27) = 5.37, P = 0.011$] (Tabla 5).

Por otra parte, 100 ng de S1820 produjeron un incremento en la vigilia [9-12h: $F(2, 27) = 9.72, P = 0.001$; y total 12h: $F(2, 27) = 9.04, P = 0.032$] (Fig. 16A; Tabla 4) y un decremento en el SOL [9-12h: $F(2, 27) = 6.342, P = 0.037$; y total 12h: $F(2, 27) = 5.80, P = 0.036$] (Figura 16B; Tabla 4). Estos cambios fueron acompañados por un incremento en la frecuencia de episodios de vigilia [$F(2, 27) = 28.19, P = 0.001$] y por un decremento en la duración promedio de episodios de SOL [$F(2, 27) = 5.37, P = 0.01$] (Tabla 5).

Asimismo, AM251 (1.4 μg) alargó la latencia a SOL [$F(2, 27) = 39.586, P = 0.001$] y a s-MOR [$F(2, 27) = 17.576, P = 0.001$] (Tabla 5); y produjo un incremento en la vigilia [1-4h: $F(2, 27) = 6.221, P = 0.008$] (Figura 16A; Tabla 4) y redujo el SOL [1-4h: $F(2, 27) = 7.700, P = 0.003$] (Figura 16B; Tabla 4), durante las primeras 4 h de registro, pero no promovió cambios en el s-MOR (Figura 16C; Tabla 4).

Complementariamente, la administración de AM251 (1.4 μg), 15 min antes de 10 ng de S1820, previno el incremento en el s-MOR (min) [5-8h: $F(2, 27) = 12.17, P = 0.001$; 9-12h: $F(2, 27) = 14.20, P = 0.001$; y total 12h: $F(2, 27) = 19.68, P = 0.001$] (Figura 16C; Tabla 4), así como el incremento en la frecuencia de episodios de s-MOR [$F(2, 27) = 19.68, P = 0.001$] (Tabla 5), inducido por 10 ng de S1820.

Igualmente, la administración de AM251 antes de 10 ng de S1820 incrementó la vigilia [5-8h: $F(2, 27) = 12.33, P = 0.025$; y total 12h: $F(2, 27) = 11.55, P = 0.002$] (Figura 16A; Tabla 4), y redujo el SOL [5-8h: $F(2, 27) = 10.74, P = 0.035$; 9-12h: $F(2, 27) = 10.90, P = 0.089$; y total 12h de registro: $F(2, 27) = 10.34, P = 0.003$] (Figura 16B; Tabla 4). Estos cambios fueron acompañados por un incremento

significativo en la frecuencia de episodios de vigilia [F (2, 27) = 9.67, P = 0.0013] (Tabla 5).

Tabla 4. Media \pm EE del tiempo total (min) de las fases del ciclo sueño-vigilia, correspondientes a la administración de los fármacos S1820, AM251 y AM251 + S1820 en el hipotálamo lateral.

		1-4 h	5-8 h	9-12 h	TOTAL
V	Vehículo	151.5 \pm 5.3	148.5 \pm 9	156.8 \pm 7	456.9 \pm 16.7
	10 ng	159.4 \pm 7	125.1 \pm 7.2	139.1 \pm 9.5	423.8 \pm 11.4
	100 ng	159.8 \pm 8.8	167.7 \pm 7.6	**191.9 \pm 9	*519.4 \pm 19.3
	AM251 (1.4 μ g)	*193.9 \pm 18	111.8 \pm 10.7	125.6 \pm 15	431.5 \pm 15.2
	AM251 /S1820 (10 ng)	175.6 \pm 6.6	*183.3 \pm 8.5	185.3 \pm 7.7	*544.3 \pm 16.9
SOL	Vehículo	81 \pm 5.4	81.8 \pm 9.3	73.7 \pm 7.1	236.5 \pm 18
	10 ng	68.5 \pm 5.8	96.5 \pm 6.1	81.4 \pm 8.6	246.6 \pm 9.7
	100 ng	72.3 \pm 7.9	61.5 \pm 6.7	*43 \pm 8.3	*177 \pm 17.5
	AM251 (1.4 μ g)	*39 \pm 14.9	114 \pm 10.8	101.3 \pm 10.4	254.4 \pm 9.2
	AM251 /S1820 (10 ng)	57.9 \pm 5.6	*50 \pm 7.4	*47.1 \pm 6.6	*155.1 \pm 14.5
s-MOR	Vehículo	7.4 \pm 1.3	9.6 \pm 1.3	9.3 \pm 1.3	26.4 \pm 2.4
	10 ng	11.9 \pm 1.7	*18.2 \pm 2.1	**19.3 \pm 1.9	**49.5 \pm 4.3
	100 ng	7.8 \pm 1.3	10.6 \pm 1.8	4.9 \pm 0.9	23.4 \pm 3.1
	AM251 (1.4 μ g)	6.9 \pm 3.1	14 \pm 2.6	12.9 \pm 5.7	34 \pm 8.7
	AM251 /S1820 (10 ng)	6.4 \pm 1.2	§§6.6 \pm 1.5	§§7.4 \pm 1.7	§§20.5 \pm 3.3

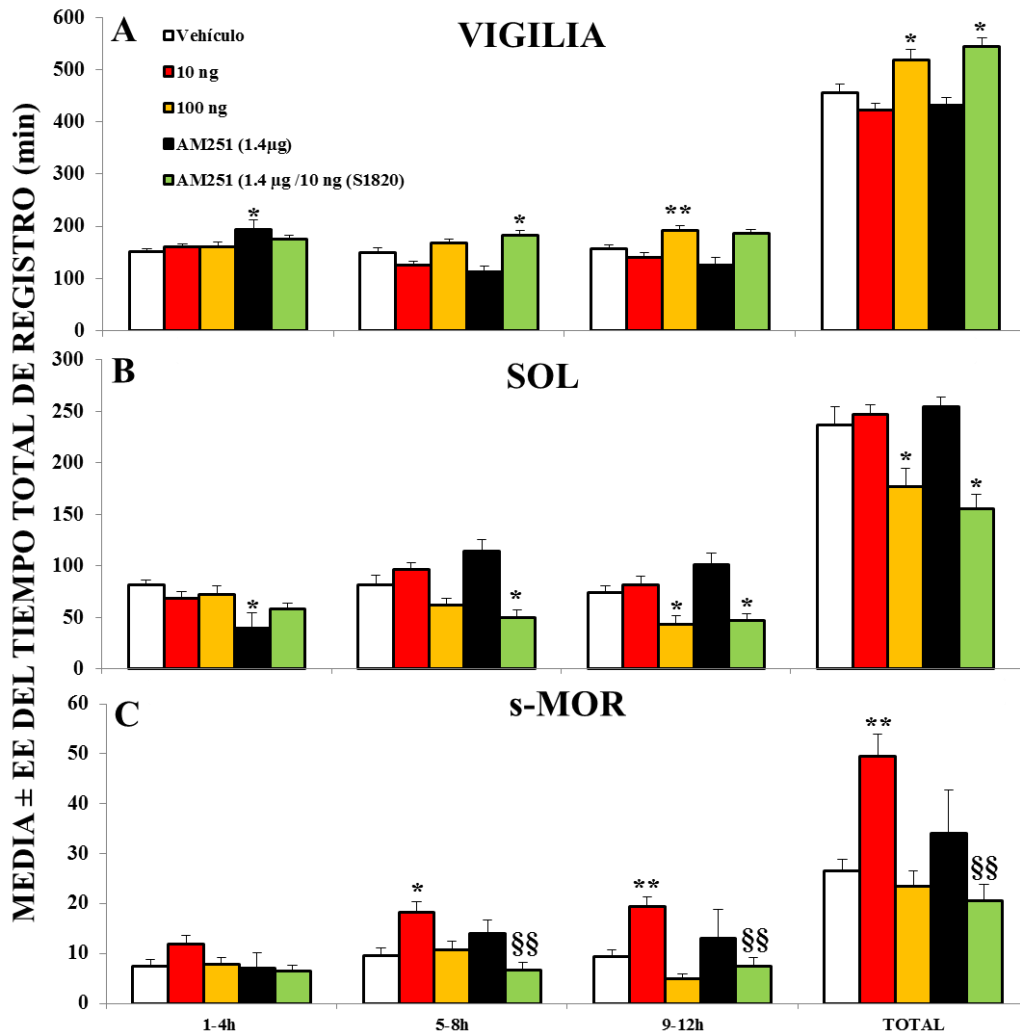
A ratas de grupos independientes se les administró, bilateralmente, en el hipotálamo lateral: Vehículo; el agonista del receptor activado por proteinasas 1 (PAR₁), S1820 (10 ó 100 ng); el antagonista del CB₁R, AM251 (1.4 μ g); ó AM251 (1.4 μ g), 15 min antes de S1820 (10 ng). Los datos se muestran en bloques de 4 h y en el total de las 12 h de registro, correspondientes a la fase oscuridad. *p<0.05, **p<0.001 vs. Vehículo; §§p<0.001 vs. 10 ng (S1820); n=10, por grupo. V: vigilia; SOL: sueño de ondas lentas; s-MOR: sueño de movimientos oculares rápidos.

Tabla 5. Media \pm EE de las latencias al sueño, duración y frecuencia de episodios, correspondientes a la administración de S1820, AM251 y AM251 + S1820 en el hipotálamo lateral.

	OSCURIDAD							
	LATENCIAS			FRECUENCIA DE EPISODIOS			DURACIÓN DE EPISODIOS	
	SOL	s-MOR	V	SOL	s-MOR	V	SOL	s-MOR
Vehículo	35.5 \pm 3.9	25.1 \pm 2.8	30 \pm 0.9	33.3 \pm 1.8	17.1 \pm 1.3	15.2 \pm 0.4	7.1 \pm 0.4	1.5 \pm 0.1
10 ng	*20.3 \pm 2	*12.1 \pm 2	28 \pm 0.4	*42.5 \pm 1.5	*31.7 \pm 2.4	15.1 \pm 0.4	*5.8 \pm 0.2	1.5 \pm 0.06
100 ng	44.6 \pm 7	21.8 \pm 3.7	**36 \pm 0.9	31.8 \pm 2	17 \pm 1.8	14.4 \pm 0.5	*5.5 \pm 0.4	1.3 \pm 0.05
AM251 (1.4 μ g)	*110.9 \pm 8.3	**61.1 \pm 6.1	**36.8 \pm 1	31.6 \pm 0.5	24.6 \pm 5.1	**11.7 \pm 0.6	8 \pm 0.4	1.3 \pm 0.2
AM251 / 10 ng	44.3 \pm 11.7	20 \pm 7.3	*36.1 \pm 2.8	25.9 \pm 3.3	§§14.5 \pm 2.5	15.1 \pm 0.5	6 \pm 0.6	1.3 \pm 0.1

Las latencias y la duración de episodios están en minutos (min), mientras que la frecuencia se muestra en número (de episodios). Los datos corresponden a las 12 h de registro (fase de oscuridad), posteriores a la administración de: Vehículo; S1820 (10 ó 100 ng), agonista del receptor activado por proteinasas 1 (PAR₁); AM251 (1.4 μ g), antagonista del CB₁R; ó AM251 (1.4 μ g) 15 min antes de S1820 (10 ng). *p<0.05, **p<0.001 vs. Vehículo; §§p<0.001 vs. S1820 (10 ng); n=10, por grupo. V: vigilia; SOL: sueño de ondas lentas; s-MOR: sueño de movimientos oculares rápidos.

Figura 16. La estimulación del receptor activado por proteinasas 1, en el hipotálamo lateral, incrementa el s-MOR, a través de la activación del receptor a cannabinoides tipo 1.



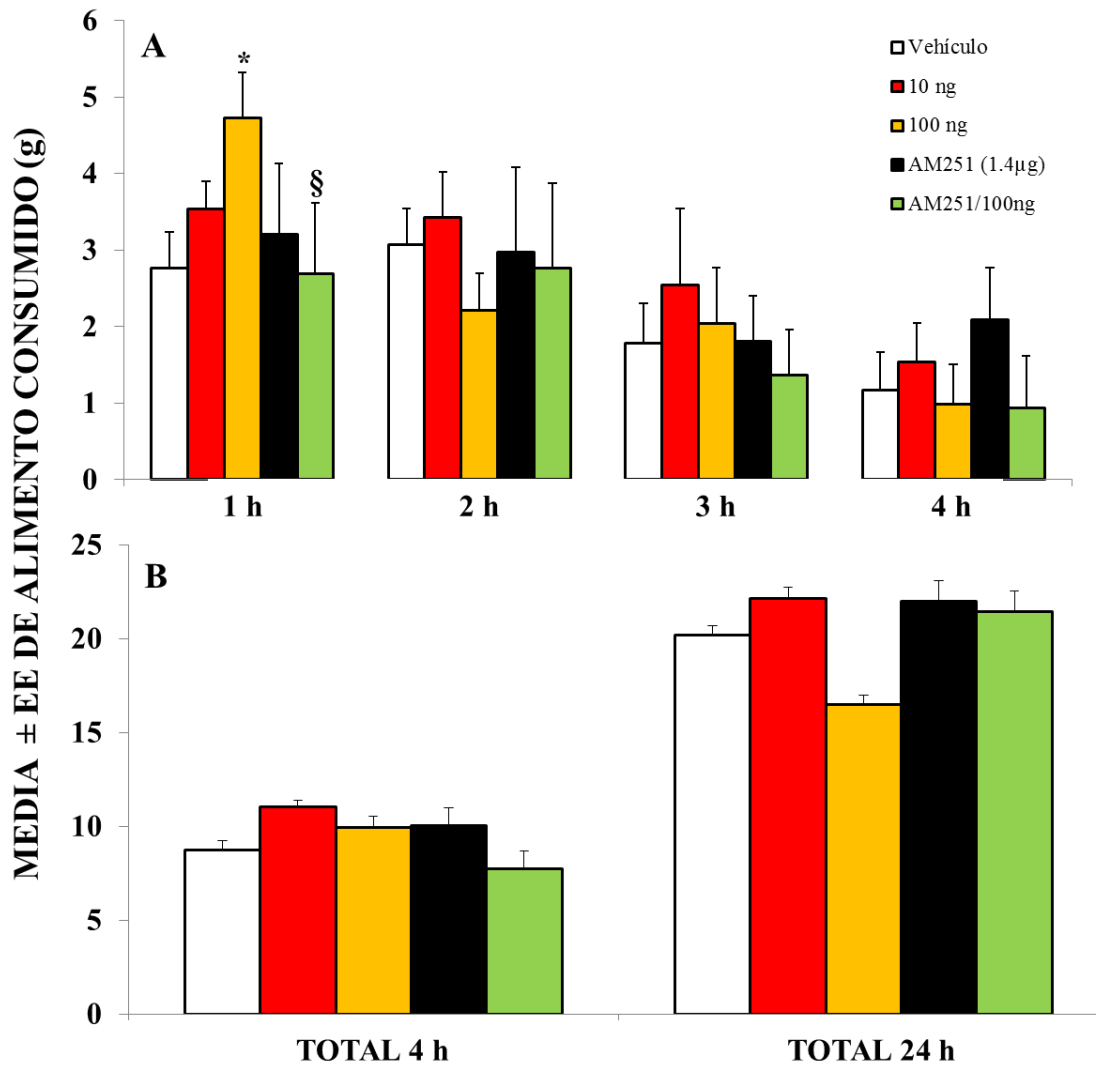
Estos datos son los que se muestran en la Tabla 4. Se grafica el tiempo (min) en bloques de 4 h y en el total de 12 h de registro. Se administró, a ratas de grupos independientes: Vehículo; S1820 (10 ó 100 ng), agonista del receptor activado por proteinasas 1 (PAR₁); AM251 (1.4 µg), antagonista del CB₁R; ó AM251 15 min antes de S1820 (10 ng). *p<0.05, **p<0.001 vs. Vehículo; §§p<0.001 vs. S1820 (10 ng); n=10, por grupo. V: vigilia (A); SOL: sueño de ondas lentas (B); s-MOR: sueño de movimientos oculares rápidos (C).

15.4. La estimulación del receptor activado por proteinasas 1 en el hipotálamo lateral, incrementa la ingestión de alimento, a través de la activación del receptor a cannabinoides tipo 1.

Como se mencionó en las secciones **10.1** y **15.3.1**, la estimulación *in vitro* del receptor activado por proteinasas 1 (PAR₁) induce señalización retrógrada sináptica mediada por la activación del receptor a cannabinoides tipo 1 (CB₁R) y por el endocannabinoide 2-AG. Ya que los endocannabinoides, además de incrementar el s-MOR, también promueven el apetito (sección **9.2**), en esta parte de la Tesis Doctoral, se evaluó si la administración de S1820, agonista del PAR₁, en el hipotálamo lateral, incrementa la ingestión de alimento.

La administración de 100 ng de S1820 incrementó la ingestión de alimento una hora después, pero no produjo cambios significativos en las siguientes 3 h ni al cabo de 24 h (Figuras 17A y 17B, respectivamente). Ni 10 ng (S1820) ni 1.4 µg indujeron cambios sobre la ingestión de alimento, a lo largo de las 4 y 24 h post-administración. Cuando AM251, antagonista del CB₁R, se administró 15 min antes de 100 ng de S1820, el efecto hiperfágico inducido por esta droga fue bloqueado (Figura 17A).

Figura 17. La estimulación del receptor activado por proteinasas 1 en el hipotálamo lateral, incrementa la ingestión de alimento, a través de la activación del receptor a cannabinoides tipo 1.



A ratas de grupos independientes se les administró, bilateralmente, en el hipotálamo lateral: Vehículo; S1820 (10 ó 100 ng), agonista del receptor activado por proteinasas 1 (PAR₁); AM251 (1.4 µg), antagonista del receptor a cannabinoides tipo 1 (CB₁R); ó AM251 15 min antes de S1820 (100 ng). *p<0.05 vs. Vehículo; § p<0.05 vs. 2-AG (0.01µg); n=10, por grupo.

16. Discusión.

16.1. Efectos de la administración de 2-AG, agonista del receptor a cannabinoides tipo 1, en el hipotálamo lateral, sobre el ciclo sueño-vigilia y la expresión de c-Fos en las neuronas MCHérgicas y orexinérgicas.

En resumen, los datos obtenidos en la presente Tesis Doctoral sugieren que la administración de 2-AG, agonista del receptor a cannabinoides tipo 1 (CB₁R), en el hipotálamo lateral de ratas, incrementa el s-MOR y la frecuencia de episodios de s-MOR, al facilitar la actividad de las neuronas MCHérgicas del hipotálamo lateral, sugiriendo que el CB₁R participa en los mecanismos de instalación del s-MOR, en esta región cerebral.

La dosis de 2-AG más baja que se empleó en este trabajo (0.01 µg) incrementó el s-MOR (Figura 11C; Tabla 1, izquierda) y la frecuencia de episodios de s-MOR (Tabla 2), mediante la activación del CB₁R, puesto que ambos efectos fueron bloqueados por AM251, antagonista de este receptor (Figura 11C; Tabla 1, panel izquierdo; Tabla 2); y también incrementó la expresión de c-Fos, indicador de activación neuronal, en las neuronas MCHérgicas (Figura 15; Tabla 3).

Aunque resulta interesante el hecho de que sólo la dosis más baja de 2-AG haya inducido un efecto en este estudio, esto no es novedoso. Se ha reportado que otros endocannabinoides inducen, o inhiben, un efecto, dependiendo de las dosis empleadas. Por ejemplo, se ha documentado que la administración icv de AEA induce efectos bifásicos, sobre el ciclo sueño-vigilia (Herrera-Solís et al., 2010); y que la administración de una dosis baja de araquidonil-2'-cloroetilamida (ACEA), un agonista del CB₁R, en la corteza prelímbica medial de ratas, induce efectos ansiolíticos, mientras que una dosis alta promueve ansiogénesis (Fogaça et al.,

2012). Asimismo, se ha mostrado que dosis bajas de agonistas del CB₁R ejercen un efecto antinociceptivo, mientras que dosis altas decremantan el umbral al dolor en humanos voluntarios sanos (para una revisión, ver Manzanares et al., 2006).

Por otra parte, el incremento en el s-MOR inducido por 2-AG fue observable a lo largo de las primeras 12 h de registro (Figura 11C), correspondientes a la fase de actividad, y, a pesar de esto, en las posteriores 12 h de registro –correspondientes a la fase de reposo, cuando el s-MOR aumenta espontáneamente–, el s-MOR no cambió (Figura 12C), aunque la vigilia aumentó y el SOL disminuyó en el último bloque de 4 h (21-24 h) (Figuras 12A y 12B; Tabla 1, derecha). Respecto a este efecto a largo plazo, existen reportes científicos que documentan efectos semejantes. Por ejemplo, en gatos se ha mostrado que la administración de carbacol en la región parabraquial incrementa el s-MOR durante 6 días (Datta et al., 1991), o durante 5 días cuando se administra en el núcleo central de la amígdala (Calvo et al., 1996). Igualmente, la administración del polipéptido activador de la adenilil ciclasa pituitaria (PACAP) en el PnO incrementa el s-MOR por 11 días en las ratas (Ahnaou et al., 1999).

Asimismo, este efecto a largo plazo puede ser explicado, al menos en parte, por el hecho de que 2-AG haya afectado selectivamente mecanismos de s-MOR. Respecto a este punto, en otros estudios con ratas, se ha reportado que las neuronas MCHérgicas expresan c-Fos en el rebote de s-MOR posterior a una privación selectiva de s-MOR de 72 h (Verret et al., 2003) y que estas neuronas tienen su máxima tasa de disparo durante el s-MOR (Hassani et al., 2009). Con base en estos hallazgos, se ha propuesto que las neuronas MCHérgicas son fundamentales para la instalación del s-MOR (Peyron et al., 2009; Torterolo et al.,

2011). Los datos obtenidos en la presente Tesis Doctoral sugieren que uno de los mecanismos de s-MOR afectado selectivamente por la administración de 2-AG, pueden ser las neuronas MCHérgicas del hipotálamo lateral, ya que esta droga indujo un incremento en la expresión de c-Fos en esta estirpe neuronal (Figura 15; Tabla 3).

Adicionalmente, los datos obtenidos en esta Tesis muestran que el endocannabinoide 2-AG también tiene propiedades hipnóticas, al igual que los endocannabinoides AEA y OLE, pero también sugieren un mecanismo a través del cual esta droga –y, potencialmente, AEA y OLE–, induce sueño. Aun cuando se ha mostrado ampliamente que AEA y OLE incrementan el s-MOR en ratas (Murillo-Rodríguez et al., 2001; Herrera-Solís et al., 2010; Rueda-Orozco et al., 2010), los mecanismos exactos por los cuales lo hacen permanecen sin conocerse. En este sentido, una serie de estudios *in vitro* mostraron que la activación del CB₁R en el hipotálamo lateral de ratas despolariza a las neuronas MCHérgicas (Huang et al., 2007). En esta Tesis Doctoral, se mostró, por primera vez, una interacción *in vivo* entre estos sistemas, i.e., las neuronas MCHérgicas y el CB₁R en el hipotálamo lateral, en términos de la regulación del ciclo sueño-vigilia.

En el mismo contexto, aunque existe evidencia *in vitro* que muestra que la activación del CB₁R en el hipotálamo lateral de ratas hiperpolariza a las neuronas orexinérgicas (Huang et al., 2007), en este estudio 2-AG sólo indujo un decremento no significativo en la expresión de c-Fos en las neuronas orexinérgicas (Figura 15; Tabla 3). Aunque estas neuronas se han asociado con el mantenimiento de la vigilia (Sakurai, 2007), este hallazgo sugiere que, al menos a nivel del hipotálamo lateral, la estimulación de las neuronas MCHérgicas por la

activación del CB₁R, por su agonista 2-AG, parece ser suficiente para inducir s-MOR. En apoyo a lo anterior, se ha mostrado recientemente que las neuronas orexinérgicas están involucradas en la modulación de componentes específicos de la vigilia. Por ejemplo, McGregor y su grupo (2011) observaron en ratones un incremento en la expresión de c-Fos en células orexinérgicas sólo en un paradigma de reforzamiento positivo –cuando los animales respondían a una palanca para obtener alimento–, pero no en un paradigma de reforzamiento negativo –cuando los animales respondían a una palanca para evitar choques eléctricos–, a pesar de que en ambos paradigmas se identificó una actividad del EEG característica de la vigilia, i.e. los animales estaban despiertos. Asimismo, Blouin y su grupo (2013) observaron que los niveles de orexina-A en la amígdala de pacientes humanos con focos epilépticos localizados en el lóbulo temporal, no cambian a lo largo de la vigilia en general, respecto a niveles basales, sino que incrementan con relación a emociones positivas, interacción social y enojo, sugiriendo que esta molécula está involucrada en la modulación de aspectos específicos de la vigilia.

16.2. Efectos de la estimulación del receptor activado por proteinasas 1 (PAR₁), en el hipotálamo lateral, por S1820, agonista del PAR₁, sobre el ciclo sueño-vigilia y la ingestión de alimento.

Una serie de estudios *in vitro* sugirieron que el endocannabinoide 2-AG forma parte de una cascada de señalización, inducida por la estimulación del receptor activado por proteinasas 1 (PAR₁) (Hashimoto et al., 2011). Ya que la administración de 2-AG en el hipotálamo lateral incrementó el s-MOR en ratas, en

esta parte de la Tesis Doctoral se decidió evaluar si la estimulación del PAR₁ en el hipotálamo lateral incrementa el s-MOR. Asimismo, a pesar de que la administración de 2-AG –las dosis que fueron empleadas para documentar el ciclo sueño-vigilia– en el hipotálamo lateral, no indujo cambios sobre la ingestión de alimento (véase Apéndice G), se decidió evaluar si la estimulación del PAR₁ en el hipotálamo lateral modifica la ingestión de alimento, puesto que se ha reportado ampliamente que la administración, sistémica o directamente en el parénquima cerebral, de endocannabinoides como AEA (Soria-Gómez et al., 2007), OLE (Soria-Gómez et al., 2010), e incluso 2-AG (Kirkham et al., 2002), promueve el apetito.

En este contexto, los datos obtenidos en la presente Tesis Doctoral muestran que la estimulación del PAR₁ en el hipotálamo lateral de ratas incrementa el s-MOR y facilita la ingestión de alimento, a través de la activación del receptor a cannabinoides tipo 1 (CB₁R), ya que ambos efectos fueron prevenidos por AM251, antagonista del CB₁R (Figuras 16C y 17A).

En general, estos hallazgos apoyan la noción de los endocannabinoides como parte de una cascada de señalización inducida por la activación del PAR₁, tal y como sugieren los datos de Hashimoto et al. (2011).

De manera más particular, la administración de S1820 (10 ng), agonista del PAR₁, en el hipotálamo lateral, incrementó el s-MOR (Figura 16C), redujo la latencia al sueño (Tabla 5) y no promovió cambios sobre la ingestión de alimento (Figura 17), mientras que la administración de 100 ng incrementó la ingestión de alimento (Figura 17) y no indujo cambios sobre el s-MOR (Figura 16C), pero aumentó la vigilia y redujo el SOL (Figuras 16A y 16C). Asimismo, AM251, antagonista del

CB₁R, previno los efectos inducidos por el agonista del PAR₁, sugiriendo que ambos efectos están mediados por la activación del CB₁R (Figuras 16C y 17) y que éstos pueden ser dependientes de la facilitación, y por lo tanto de la biodisponibilidad, de endocannabinoides, o de 2-AG en particular, tal y como ha sido sugerido por estudios *in vitro* (Hashimoto et al., 2011).

En conjunto, estos datos sugieren que las dosis del agonista del PAR₁ probadas en este estudio, podrían estar activando diferentes sistemas cerebrales, directamente o a través de la síntesis de endocannabinoides, al ser administradas en el hipotálamo lateral, para promover efectos sobre el s-MOR o la ingestión de alimento.

En particular, es posible que el aumento en el s-MOR esté mediado por un incremento en la actividad de las neuronas MCHérgicas promotoras de s-MOR (Verret et al., 2003; Hassani et al., 2009), ya que la estimulación del PAR₁ aparentemente involucra la síntesis del endocannabinoide 2-AG y, como se mencionó en el apartado **16.1**, 2-AG incrementó el s-MOR y la expresión de c-Fos en esta estirpe neuronal.

Por otra parte, respecto al efecto hiperfágico, es posible que la estimulación del PAR₁, por la administración de 100 ng de su agonista, haya inducido un incremento mayor en la síntesis de endocannabinoides –o de 2-AG en particular– que aquél inducido por la administración de 10 ng. Así pues, tentativamente, esta cantidad de endocannabinoides –o de 2-AG–, pudo facilitar la ingestión de alimento al activar subconjuntos específicos de moléculas orexinérgicas hipotalámicas, tales como el NPY y el AgRP del ARC. En apoyo a lo anterior, se ha documentado que tanto la estimulación del CB₁R por OLE (Soria-Gómez et al.,

2010) como el bloqueo del CB₁R por su antagonista SR141716A (Verty et al., 2009), incrementan la expresión de c-Fos en núcleos hipotalámicos asociados a la regulación de la ingestión de alimento. Asimismo, este efecto hiperfágico pudo involucrar la estimulación de otros receptores, tales como los receptores a glutamato. En este contexto, existe una amplia literatura que documenta que la administración de glutamato, o de agonistas de los receptores del tipo NMDA o del tipo no-NMDA, en el hipotálamo lateral (para ver una revisión, leer Stanley et al., 2011; véase Apéndice C), incrementa la ingestión de alimento en roedores. En este sentido, algunos estudios *in vitro* han reportado que la estimulación de los receptores metabotrópicos del glutamato tipo 5 (mGluR₅) interviene en la cascada de señalización que involucra la síntesis de 2-AG (Seif et al., 2011) y también *in vivo* se ha observado que la estimulación de los mGluR₅ promueve efectos analgésicos a través de la síntesis de 2-AG, en las ratas (Gregg et al., 2012). Estos efectos antinociceptivos, como se mencionó en la introducción, también forman parte de los efectos inducidos por endocannabinoides. Esta serie de datos sugieren que la estimulación del PAR₁ por 100 ng de S1820 probablemente involucre la participación de otros receptores, tales como los mGluR₅.

En resumen, los datos obtenidos en este experimento sugieren que la estimulación del PAR₁ induce actividad endocannabinoide en el hipotálamo lateral, y que ésta, a su vez, modula el ciclo sueño-vigilia y la ingestión de alimento, pero se requieren estudios más exhaustivos que permitan determinar si estos efectos son exclusivos de esta región cerebral y si dependen de la participación de un endocannabinoide en particular.

Finalmente, cabe señalar que aun cuando Kirkham y su grupo (2002) mostraron que la administración del endocannabinoide 2-AG en el NAcS incrementa el apetito en roedores, y de que se ha reportado que MCH es una molécula orexigénica (Ludwig et al., 1998), resulta interesante que 2-AG, con las dosis de que fueron empleadas para evaluar el ciclo sueño-vigilia, no promoviera cambios sobre la ingestión de alimento, aun cuando también indujo un incremento en la expresión de c-Fos en las neuronas MCHérgicas. Una posible explicación para este resultado es que haya subconjuntos de neuronas MCHérgicas especializados en promover el s-MOR o la ingestión de alimento, así como se ha reportado que ocurre con las neuronas orexinérgicas. Una población de estas neuronas, situada alrededor del área perifornical, intervienen en la modulación de los estados de vigilia, mientras que otra población, situada medialmente en el hipotálamo lateral, interviene en la ingestión de alimento y en el procesamiento de estímulos reforzantes, tales como la comida y las drogas de abuso (Aston-Jones et al, 2010; Satoh et al., 2006; véase Apéndice H). Hasta ahora no ha sido reportada una división semejante para las neuronas MCHérgicas, pero es una posibilidad que debe estudiarse. Es probable que en este trabajo, la administración de 2-AG haya estimulado a neuronas MCHérgicas responsables de regular el s-MOR y no la ingestión de alimento (en la Figura 18 se resumen los antecedentes y los resultados de la presente Tesis Doctoral).

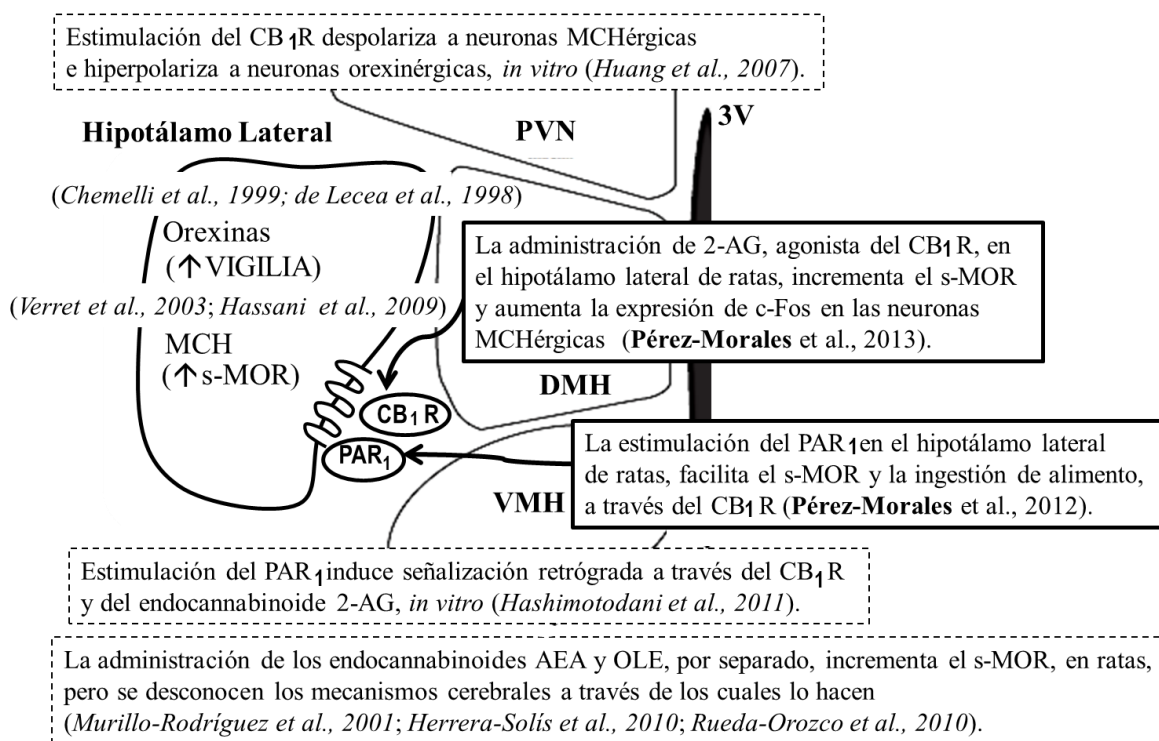
17. Conclusiones.

La administración del endocannabinoide 2-araquidonil glicerol en el hipotálamo lateral de ratas, incrementa el sueño de movimientos oculares rápidos, mediante la activación del receptor a cannabinoides tipo 1, y aumenta la expresión del marcador de activación neuronal c-Fos, en las neuronas MCHérgicas.

La administración de S1820, agonista del receptor activado por proteínasas 1, en el hipotálamo lateral de ratas, incrementa el sueño de movimientos oculares rápidos y la ingestión de alimento, a través de la activación del receptor a cannabinoides tipo 1.

Figura 18. Resumen de antecedentes y resultados de la presente Tesis

Doctoral.



Tomando como referencia al hipotálamo, se muestran en un esquema los antecedentes y los resultados discutidos en la sección 16. En los recuadros con líneas discontinuas, y en cursivas, se mencionan algunas de las referencias citadas, y en los recuadros con líneas continuas se señalan los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral. Las orexinas aumentan la vigilia y MCH aumenta el sueño de movimientos oculares rápidos (s-MOR). PVN, núcleo paraventricular; 3V, tercer ventrículo; DMH, hipotálamo dorsomedial; VMH, hipotálamo ventromedial; CB₁R, receptor a cannabinoides tipo 1; PAR₁, receptor activado por proteínas tipo 1; 2-AG, 2-araquidonil glicerol; AEA, anandamida; OLE, oleamida.

18. APÉNDICES.

APÉNDICE A.

Anatomía del hipotálamo.

En un principio, el hipotálamo fue dividido anatómicamente en tres secciones, quiasmática, tuberal y mamilar, con base en sus asociaciones con el quiasma óptico, la eminencia tuberal y los cuerpos mamilares, respectivamente. Más tarde, se dividió en tres columnas longitudinales, situadas a cada lado del tercer ventrículo, a las cuales se llamó periventricular, medial y lateral. Estas columnas longitudinales se extienden de manera rostrocaudal a través del hipotálamo.

Con mayor detalle, el hipotálamo se ha subdividido en diversos núcleos anatómicamente distintos, como se muestra en la Figura A. Brevemente, estos núcleos incluyen el núcleo arcuato (ARC), el núcleo paraventricular hipotalámico (PVN), el núcleo ventromedial hipotalámico (VMH), el núcleo dorsomedial hipotalámico (DMH), el hipotálamo lateral, el área preóptica (POA) y el núcleo tuberomamilar (TMN). De acuerdo con esta clasificación, POA se subdivide en área preóptica ventrolateral (VLPO) y en el núcleo preóptico mediano (MnPO).

Estudios con trazadores retrógrados y anterógrados, en roedores, han permitido observar que los distintos núcleos que conforman al hipotálamo envían proyecciones a todo el al hipotálamo y al sistema nervioso central (revisado en Saper, 2004).

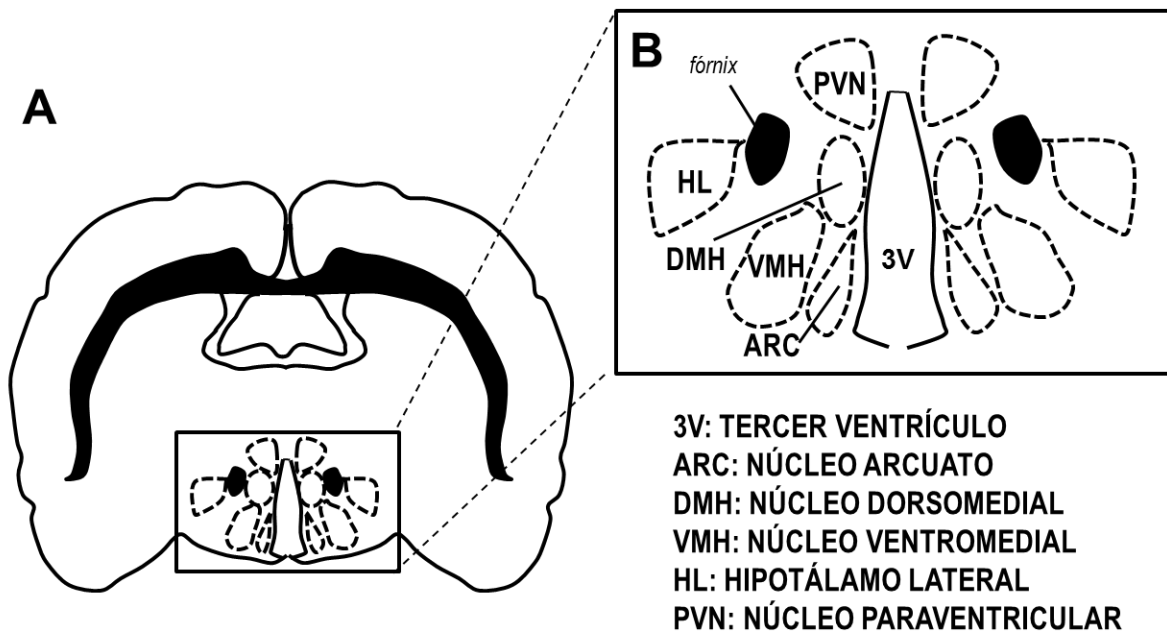
Por otra parte, en esta región cerebral existen moléculas que participan en la regulación del ciclo sueño-vigilia, en la ingestión de alimento, o en ambos procesos; por ejemplo, la hormona estimulante de melanocitos-alfa (α -MSH), la hormona adrenocorticotropa (ACTH), el péptido del lóbulo intermedio semejante a

corticotropina (CLIP) y la beta endorfina, que son derivados de la pro-opiomelanocortina (POMC). Mientras que estudios farmacológicos han demostrado que la ACTH incrementa la vigilia, que la MSH- α aumenta el sueño de ondas lentas y que el CLIP aumenta el sueño de movimientos oculares rápidos (s-MOR) (revisado en Prospéro-García & Méndez-Díaz, 2004), en el cerebro, el sistema melanocortinérgico está conformado por neuronas que expresan los receptores a melanocortina subtipos 3 y 4 (MC3R y MC4R, respectivamente). El MC4R se localiza ampliamente en el hipotálamo, particularmente en el PVN, el ARC y el DMH, así como en la amígdala, el tálamo, la corteza, el estriado, el hipocampo y el tallo cerebral (Mountjoy et al., 1994; Kishi et al., 2003). El MC3R se expresa en el ARC, el DMH, en el tálamo, en el área ventral tegmental, en los núcleos del rafé y en el hipocampo (Roselli-Rehfuss et al., 1993). La MSH- α es agonista de estos receptores, mientras que la proteína relacionada al gen agouti (AgRP) es su antagonista (revisado en Warne & Xu, 2013).

La expresión de la POMC se restringe principalmente al ARC y estas neuronas proyectan a las mismas regiones cerebrales que las neuronas que expresan AgRP, incluyendo el hipotálamo (para consultar una revisión, léase Warne & Xu, 2013). Asimismo, se ha documentado que MSH- α es una molécula anorexigénica y que algunas de las neuronas que expresan POMC, también expresan el transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART) (Barsh et al., 2002), la cual se considera también una molécula anorexigénica (revisado en Parker & Bloom, 2012). Igualmente, se ha documentado que la pérdida de la función de la POMC y del MC4R resulta en obesidad e hiperfagia en roedores y en humanos (Tallam et al., 2005). EL MC4R regula la ingestión de alimento en el PVN (Balthasar et al.,

2005), y se ha sugerido que el MC3R participa en conductas asociadas a la alimentación, tales como la actividad de anticipación al alimento y las adaptaciones conductuales a la restricción de alimento (Sutton et al., 2008).

Figura A. El hipotálamo.



Dibujo que corresponde a un corte coronal de cerebro de rata (A), donde se esquematizan algunos de los núcleos que conforman el hipotálamo (B). Los significados de las abreviaturas se incluyen en la esquina inferior derecha.

APÉNDICE B.

Tabla A. Efectos de moléculas sintetizadas por el hipotálamo lateral, sobre el ciclo sueño-vigilia.

Molécula	Efectos	Vía de/lugar de administración	Sujetos	Autores
Sustancia P	Incrementa la vigilia y la latencia al s-MOR	iv	Hombres jóvenes sanos	Lieb et al., 2002.
Nesfatina-1	Incrementa s-MOR	icv	Ratas	Jego et al., 2012.
Neurotensina	Incrementa la vigilia y el s-MOR	Cerebro basal anterior	Ratas	Cape et al., 2002.
NMDA; AMPA	Incrementa la vigilia y reduce el SOL	Núcleo Basal de Meynert	Ratas	Manfridi et al., 1999.
MK-801 (antagonista de NMDA)	Incrementa el SOL	ip	Ratas	Campbell and Feinberg, 1996.
Muscimol (agonista de GABA _A)	Suprime el s-MOR	Reticularis Pontis Oralís; Reticularis Pontis Caudalis	Ratas	Sanford et al., 2003.
Bicuculina (antagonista de GABA _A)	Incrementa el s-MOR	Reticularis Pontis Oralís; Reticularis Pontis Caudalis	Ratas	Sanford et al., 2003.
GABA o muscimol	Incrementa la vigilia y suprime el s-MOR	Reticularis Pontis Oralís	Gatos	Xi et al., 1999.

(continúa en la siguiente página)

Tabla A (continúa)

Molécula	Efectos	Vía de/lugar de administración	Sujetos	Autores
Bicuculina	Incrementa el s-MOR	Reticularis Pontis Oralís	Gatos	Xi et al., 1999.
Bicuculina	Incrementa el s-MOR	Subcoeruleus Dorsal	Ratas	Pollock and Mistlberger, 2003.
CART	Incrementa la vigilia	icv	Ratas	Keating et al., 2010.
CART	Incrementa la vigilia y reduce la ingestión de alimento	icv	Ratas	Méndez-Díaz et al., 2008.
GHRH	Incrementa el SOL	icv	Ratas	Zhang et al., 1999.
DSIP	Incrementa SOL	icv	Gatos	Šušić et al., 1986.
DSIP	Incrementa SOL	iv	Ratas	Kafi et al., 1979.
DSIP	Incrementa SOL	iv	Conejos	Monnier et al., 1977.

GABA_A, receptor ionotrópico al ácido-γ-aminobutírico; NMDA, N-metil-D-aspartato (agonista del receptor ionotrópico a glutamato); AMPA, α-amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato (agonista del receptor ionotrópico a glutamato); CART, transcrito regulado por cocaína y anfetamina; GHRH, hormona liberadora de la hormona de crecimiento; DSIP, péptido inductor de sueño delta; s-MOR, sueño de movimientos oculares rápidos; SOL, sueño de ondas lentas; iv, intravenosa; icv, intracerebroventricular; ip, intraperitoneal.

APÉNDICE C.

Tabla B. Efectos de moléculas sintetizadas por el hipotálamo lateral, sobre la ingestión de alimento.

Molécula	Efectos	Vía de/lugar de administración	Sujetos	Autores
Sustancia P	Incremento moderado en la ingestión de alimento	ip	Ratones	Karagiannides et al., 2008.
Dinorfina	Incrementa la ingestión de alimento	icv	Perros	Inui et al., 1991.
Nesfatina-1	Reduce la ingestión de alimento	icv	Ratas	Oh-I et al., 2006.
Neurotensina	Reduce la ingestión de alimento	icv	Ratas	Luttinger, 1982.
Glutamato	Incrementa la ingestión de alimento	Hipotálamo lateral	Ratas	Stanley et al., 1993.
Muscimol (agonista de GABA _A)	Incrementa la ingestión de alimento	NAcS	Ratas	Richard et al., 2013.
Muscimol	Incrementa la ingestión de alimento	NAcS	Ratas	Stratford and Kelley, 1997.
Baclofen (agonista de GABA _B)	Incrementa la ingestión de alimento	NAcS	Ratas	Stratford and Kelley, 1997.

(continúa en la siguiente página)

Tabla B (continúa)

Molécula	Efectos	Vía de/lugar de administración	Sujetos	Autores
CART	Reduce la ingestión de alimento	NAcS	Ratas	Yang et al., 2005.
CART	Reduce la ingestión de alimento	icv	Ratas	Méndez-Díaz et al., 2008.
GHRH	Incrementa la ingestión de alimento	icv (dosis picomolares)	Ratas privadas de alimento	Vaccarino et al., 1985.
GHRH	Reduce la ingestión de alimento	icv (dosis nanomolares)	Ratas privadas de alimento	Imaki et al., 1985.

GABA_A, receptor ionotrópico al ácido- γ -aminobutírico; GABA_B, receptor metabotrópico al ácido- γ -aminobutírico; CART, transcrito regulado por cocaína y anfetamina; GHRH, hormona liberadora de la hormona de crecimiento; NAcS, núcleo accumbens shell; icv, intracerebroventricular; ip, intraperitoneal.

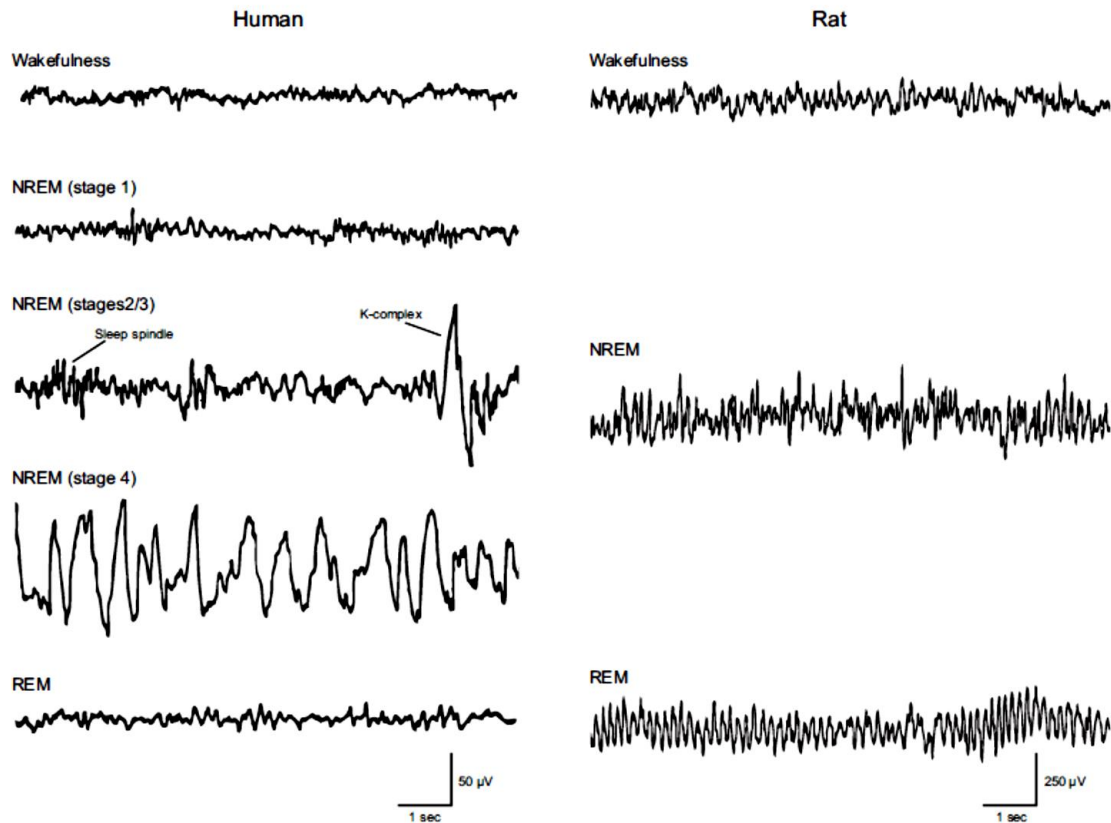
APÉNDICE D.

El Electroencefalograma.

El EEG se caracteriza de acuerdo con tres variables: frecuencia, amplitud y morfología. Debido a que el EEG mide cambios en el potencial eléctrico en el cráneo y a que estos cambios, capturados por los electrodos de registro, reflejan la fluctuación de los potenciales de membrana integrados a lo largo de diversas neuronas corticales o hipocampales, tales fluctuaciones, i.e. ondas cerebrales eléctricas, son rítmicas, y sus características reflejan los grados de variación de sincronía en los cambios del potencial de membrana entre esas neuronas corticales o hipocampales.

Con estos antecedentes, la 'frecuencia' se refiere a la rapidez de la fluctuación entre el potencial eléctrico de las ondas cerebrales, y se mide en ciclos por segundo (cps; ó Hertz, Hz). La 'amplitud' se refiere a la magnitud del cambio del potencial eléctrico entre las ondas cerebrales, y se mide en microvolts (μV). La 'morfología' se refiere a la forma particular de una onda cerebral, o de un conjunto de ondas cerebrales, y que reflejan tanto la frecuencia como la amplitud, tales como los husos de sueño o los complejos K.

Figura B. Trazos electroencefalográficos.



Se ilustran trazos electroencefalográficos del humano (derecha) y de la rata (izquierda). Wakefulness, vigilia; NREM, sueño no-MOR o sueño de ondas lentas; REM, s-MOR; Sleep spindle, huso de sueño; K-complex, complejo K (Tomado de Brown et al., 2012).

APÉNDICE E.

Los endocannabinoides y las moléculas con actividad endocannabinoide.

Cronológicamente, una vez que fueron identificados los receptores a cannabinoides tipo 1 y tipo 2 (CB₁R y CB₂R), la comunidad científica se dio a la tarea de buscar los ligandos endógenos de estos receptores, siguiendo la misma lógica que siguieron Hans Kosterlitz y John Hughes en la década de los 70's al

suponer que si el cerebro mamífero contenía receptores a morfina, tal y como lo habían mostrado otros investigadores previamente, también debía contener los ligandos endógenos responsables de su activación, ya que resultaría difícil considerar que tales receptores habrían sido seleccionados por la evolución solamente para ser activados por el producto de una planta (revisado en Di Marzo, 2006). De esta forma, mediante el empleo de la técnica estándar para la identificación de nuevos agonistas para un receptor, se descubrió al primero de los ligandos endógenos de los receptores a cannabinoides. En esta técnica se observa la capacidad de desplazamiento del pegado al receptor por un potencial agonista en una sonda radiomarcada con un agonista de ese mismo receptor, y Devane et al. (1992) extrajeron del cerebro de cerdo una molécula que fue capaz de desplazar al HU-210, un agonista sintético del CB₁R. A esta molécula la llamaron N-araquidonil etanolamida, o 'anandamida' (AEA), cuya traducción proviene de la palabra sánscrita 'ananda' que significa 'la que trae bendición y tranquilidad' (revisado en Méndez-Díaz et al., 2008). Posteriormente, gracias a la identificación de un receptor a cannabinoides en el sistema inmune (Munro et al., 1993), se buscaron ligandos endógenos para este receptor en el intestino y en el bazo. De este modo, extraído del intestino de perro, fue identificado un segundo ligando endógeno de los receptores a cannabinoides, el 2-araquidonil glicerol (2-AG) (Mechoulam et al., 1995) y más tarde otros grupos lo extrajeron del cerebro de rata (Sugiura et al., 1995; Stella et al., 1997).

Por otra parte, también se ha reportado que el cerebro mamífero al menos sintetiza otros cuatro compuestos que son capaces de activar a los receptores a cannabinoides: 2-araquidonil gliceril éter (2-AGE, o noladin éter), 0-araquidonil

etanolamida, N-araquidonil dopamina (NADA) y Cis-9-10 octadecenoamida (OLE, u oleamida).

El 2-AGE fue extraído del cerebro de cerdo y se ha mostrado que tiene mayor afinidad por el CB₁R que por el CB₂R y también que induce sedación, hipotermia y analgesia en ratones (Hanus et al., 2001). La 0-araquidonil etanolamida, también llamada 'virodhamina', cuyo nombre proviene del sánscrito 'virodha' que significa 'oposición', fue extraída del cerebro de rata y actúa como antagonista del CB₁R, en presencia de AEA, y como agonista completo del CB₂R, y además induce hipotermia en ratones (Porter et al., 2002). NADA fue identificada en el cerebro de bovino y en el cerebro de rata, y se mostró que induce hiperalgesia en ratas (Huang et al., 2002), y que, al igual que AEA, es agonista del CB₁R y del receptor potencial transitorio a vaniloides tipo 1 (TRPV₁) (Ralevic, 2003). OLE fue extraída del líquido cefalorraquídeo de gatos privados de sueño (Lerner et al., 1994) y, además de activar al CB₁R (Legget et al., 2004), también se ha mostrado que induce hipomotilidad, hipolocomoción, analgesia e hipotermia en roedores (Mechoulam et al., 1997), justo como lo hacen las moléculas con actividad cannabinoide.

Existen también otras moléculas incluidas en esta familia de lípidos y que tienen actividad cannabinoide, pero que no activan a los CB₁R y/o CB₂R. Un par de estas moléculas son la N-oleoyletanolamida (OEA) y la N-palmitoyletanolamida (PEA) (Lambert et al., 1999). Tanto PEA (Lo Verme et al., 2005) como OEA (Guzmán et al., 2004) activan a los receptores activados por proliferador de peroxisomas, tipo alfa (PPAR- α); PEA promueve la analgesia (Calignano et al., 1998) y OEA decreta la ingestión de alimento (Soria-Gómez et al., 2010) y el peso corporal

(Fu et al., 2003) en roedores. Se ha descrito que PEA y OEA incrementan la biodisponibilidad de AEA para activar a los receptores a cannabinoides, porque compiten como sustratos por la enzima que se encarga de la degradación de ésta, aunque respecto a OEA la información existente es escasa (revisado en Fonseca et al., 2013).

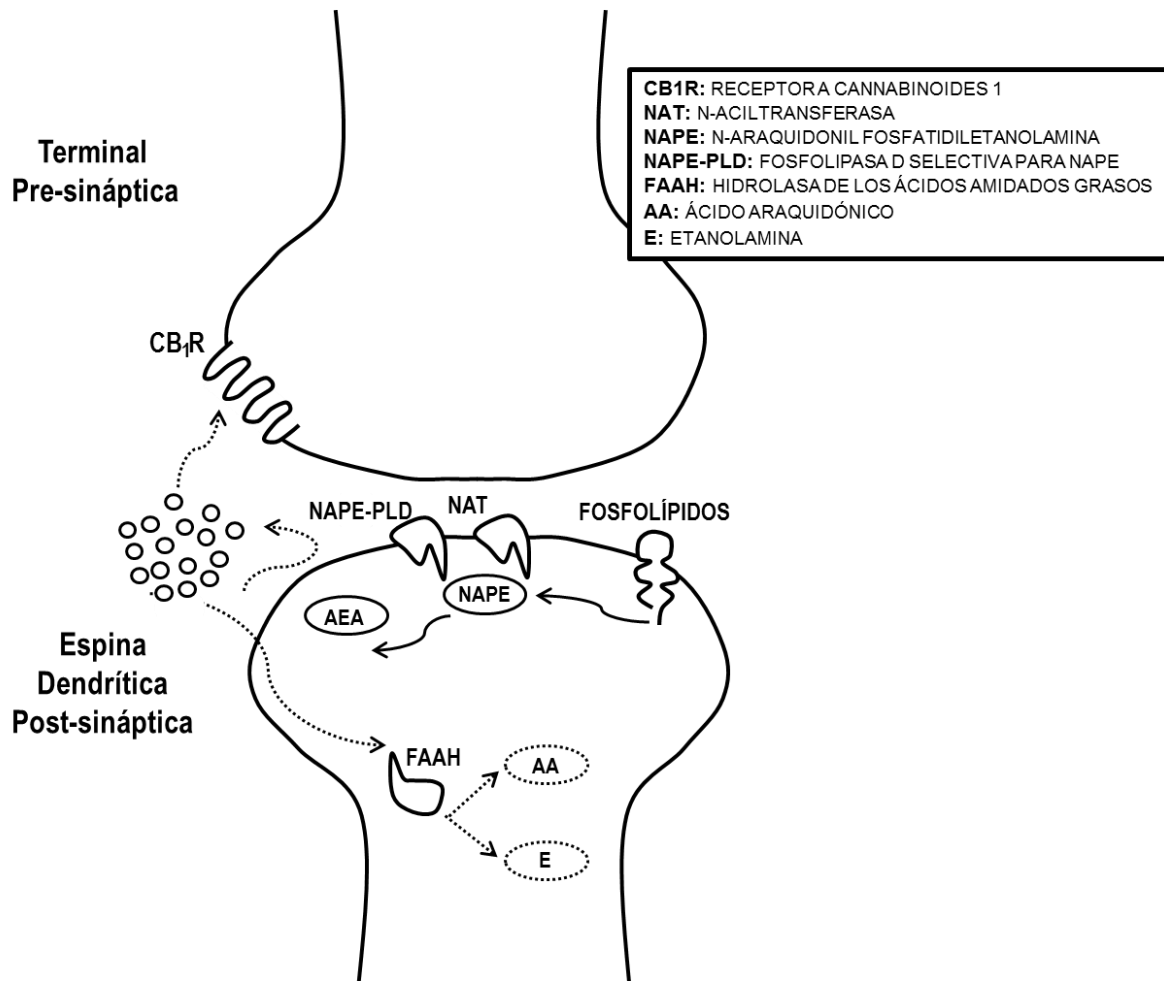
APÉNDICE F.

Anandamida: vías de síntesis y de degradación.

En primer lugar, aunque se ha aceptado ampliamente que los endocannabinoides se sintetizan a demanda y que no se almacenan en vesículas, se ha mostrado que AEA puede almacenarse dentro de la célula, por un mecanismo que no se conoce por completo (Oddi et al., 2008). Esta molécula se deriva del ácido araquidónico conjugado con etanolamina, y su síntesis involucra dos reacciones enzimáticas, dependientes de fosfolípidos. A grandes rasgos, AEA se genera a través de un mecanismo dependiente de la fosfolipasa D selectiva para la N-araquidonil fosfatidiletanolamina (NAPE-PLD), la cual a su vez es el producto de la activación de la N-aciltransferasa (NAT) (revisado en Bisogno, 2008). Inicialmente, la despolarización celular o la movilización de Ca^{2+} intracelular, al facilitar las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} , promueven la activación de la NAT (Cadas et al., 1996). La NAT entonces toma como sustrato a la fosfatidiletanolamina (PE) y a la fosfatidilcolina (PC). Después, la hidrólisis enzimática de la N-araquidonil fosfatidiletanolamina (NAPE), el precursor de AEA, por la NAPE-PLD, produce AEA (Okamoto et al., 2004). Finalmente, la FAAH es la responsable de degradar a

AEA en ácido araquidónico y etanolamina (Cravatt et al., 1996) (Figura C). Esta enzima, además de localizarse principalmente en la post-sinapsis, como se mencionó en la sección **9.3**, está unida a la membrana intracelular, pertenece a la familia de las hidrolasas de serina y está ampliamente distribuida en todo el cuerpo, con altas concentraciones en el cerebro y en el hígado (revisado en Fonseca et al., 2013).

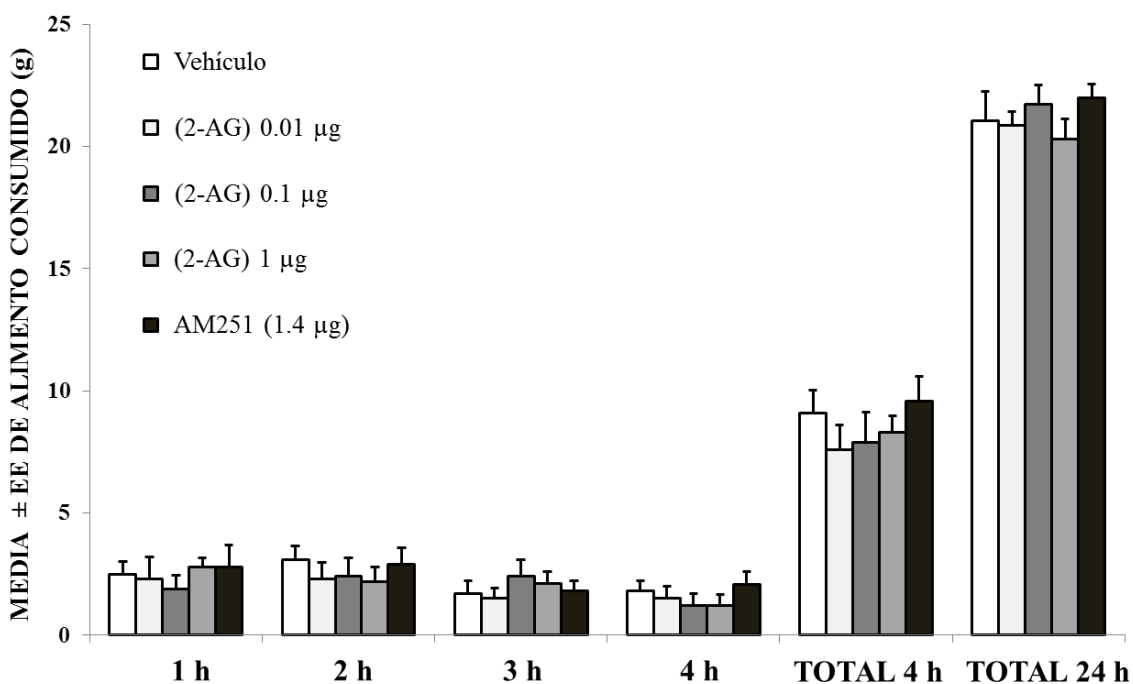
Figura C. Vías de síntesis y degradación del endocannabinoide anandamida.



La NAT convierte a la NAPE en AEA mediante la NAPE-PLD y la FAAH degrada a AEA en AA y E en la post-sinapsis. Se ha sugerido que este mecanismo de degradación está mediado por difusión simple o por una proteína acarreadora o un transportador membranal de AEA (AMT) (Lovinger, 2008). Los significados de las abreviaturas se muestran en el recuadro superior derecho.

APÉNDICE G.

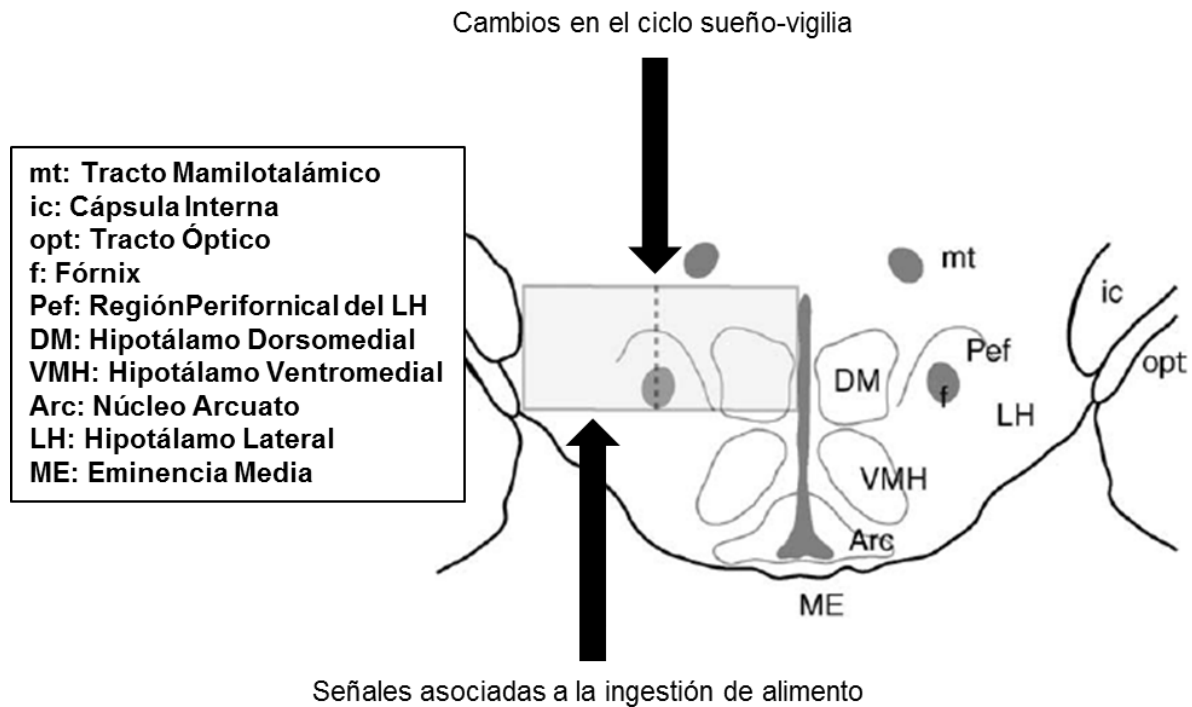
Evaluación de la ingestión de alimento por la administración del endocannabinoide 2-AG en el hipotálamo lateral de ratas.



Se muestran los gramos de alimento consumidos por los animales, después de la administración bilateral intra-hipotálamo lateral de: Vehículo, 2-AG (0.01, 0.1 ó 1 µg) y AM251 (1.4 µg), al cabo de 4 h y 24 h. Nótese que ninguna dosis ejerció efecto alguno.

APÉNDICE H.

Poblaciones de neuronas orexinérgicas relacionadas con la modulación del ciclo sueño-vigilia o con la ingestión de alimento.



Dibujo que representa la localización de poblaciones de neuronas orexinérgicas, asociadas a la modulación del ciclo sueño-vigilia o a la regulación de la ingestión de alimento, con base en estudios de inmunohistoquímica contra c-Fos. Los significados se muestran en el recuadro. Modificado de Satoh et al., 2006.

19. Bibliografía.

Abel, E. L. (1975). Cannabis: Effects on hunger and thirst. *Behavioral Biology*, 15(3), 255-281.

Adamantidis, A., & de Lecea, L. (2008). Physiological arousal: a role for hypothalamic systems. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(10), 1475-88.

Adamantidis, A., & de Lecea, L. (2009). A role for Melanin-Concentrating hormone in learning and memory. *Peptides*, 30(11), 2066-70.

Adamantidis, A., Salvert, D., Goutagny, R., Lakaye, B., Gervasoni, D., Grisar, T., Luppi, P. H., & Fort, P. (2008). Sleep architecture of the melanin-concentrating hormone receptor 1-knockout mice. *European Journal of Neuroscience*, 27(7), 1793-800.

Ahnaou, A., Dautzenberg, F. M., Huysmans, H., Steckler, T., & Drinkenburg, W. H. (2011). Contribution of melanin-concentrating hormone (MCH1) receptor to thermoregulation and sleep stabilization: evidence from MCH (-/-) mice. *Behavioural Brain Research*, 218(1), 42-50.

Ahnaou, A., Drinkenburg, W. H., Bouwknecht, J. A., Alcazar, J., Steckler, T., & Dautzenberg, F. M. (2008). Blocking melanin-concentrating hormone MCH1 receptor affects rat sleep-wake architecture. *European Journal of Pharmacology*, 579(1-3), 177-88.

Akanmu, M. A., & Honda, K. (2005). Selective stimulation of orexin receptor type 2 promotes wakefulness in freely behaving rats. *Brain Research*, 1048, 138-45.

Akbari, E., Naghdi, N., & Motamedi, F. (2006). Functional inactivation of orexin 1 receptors in CA1 region impairs acquisition, consolidation and retrieval in Morris water maze task. *Behavioural Brain Research*, 173(1), 47-52.

- Aldrich, M. S. (1998). Diagnostic aspects of narcolepsy. *Neurology*, 50(2 Suppl 1), S2-7.
- Alger, B. E. (2002). Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Progress in Neurobiology*, 68(4), 247-86.
- Ameri, A. (1999). The effects of cannabinoids on the brain. *Progress in Neurobiology*, 58, 315-348.
- Aston-Jones, G., & Bloom F. E. (1981). Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *Journal of Neuroscience*, 1, 876-886.
- Aston-Jones, G., Smith, R. J., Sartor, G. C., Moorman, D. E., Massi, L., Tahsili-Fahadan, P., & Richardson, K. A. (2010). Lateral hypothalamic orexin/hypocretin neurons: A role in reward-seeking and addiction. *Brain Research*, 16(1314), 74-90.
- Atwood, B. K., Straiker, A., & Mackie, K. (2012). CB₂ cannabinoid receptors inhibit synaptic transmission when expressed in cultured autaptic neurons. *Neuropharmacology*, 63(4): 514-23.
- Allen G. V., & Cechetto, D. F. (1995). Neurotensin in the lateral hypothalamic area: origin and function. *Neuroscience*, 69, 533-544.
- Annand, B. K., & Brobeck, J. R. (1951). Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 24(2), 123-40.
- Annand, B. K., & Delgado, J. M. (1953). Increase of food intake induced by electrical stimulation of the lateral hypothalamus. *American Journal of Physiology*, 172(1), 162-68.
- Anubhuti, A.S. (2006). Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity—a review. *Neuropeptides*, 40(6), 375-401.

Aserinsky, E., & Kleitman, N. (1953). Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science*, *118*(3062), 273-274.

Aston-Jones, G., Smith, R. J., Sartor, G. C., Moorman, D. E., Massi, L., Tahsili-Fahadan, P., & Richardson, K. A. (2010). Lateral hypothalamic orexin/hypocretin neurons: A role in reward-seeking and addiction. *Brain Research*, *1314*, 74-90.

Balthasar, N., Dalgaard, L. T., Lee, C. E., Yu, J., Funahashi, H., Williams, T., Ferreira, M., Tang, V., McGovern, R. A., Kenny, C. D., Christiansen, L. M., Edelstein, E., Choi, B., Boss, O., Aschkenasi, C., Zhang, C. Y., Mountjoy, K., Kishi, T., Elmquist, J. K., & Lowell, B. B. (2005). Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell*, *123*(3), 493-505.

Barsh, G. S., & Schwartz, M. W. (2002). Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. *Nature Review Genetics*, *3*(8), 589-600. doi:10.1038/nrg862.

Barson, J. R., Morganstern, I., & Leibowitz, S. F. (2013). Complementary roles of orexin and melanin-concentrating hormone in feeding behavior. *International Journal of Endocrinology*, *2013*, 983964. doi: 10.1155/2013/983964.

Bhattacharyya, S., Atakan, Z., Martin-Santos, R., Crippa, J. A., & McGuire, P. K. (2012). Neural mechanisms for the cannabinoid modulation of cognition and affect in man: a critical review of neuroimaging studies. *Current Pharmaceutical Design*, *18*(32), 5045-54.

Bayard, S., & Dauvilliers, Y. A. (2013). Reward-based behaviors and emotional processing in human with narcolepsy with cataplexy. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *7*(50), 1-7.

Bayer, L., Eggemann, E., Serafin, M., Grivel, J., Machard, D., Muhlethaler, M., &

Jones, B. E. (2005). Opposite effects of noradrenaline and acetylcholine upon hypocretin/orexin versus melanin concentrating hormone neurons in rat hypothalamic slices. *Neuroscience*, 130(807-811).

Benedetto, L., Rodríguez-Servetti, Z., Lagos, P., D'Almeida, V., Monti, J. M., & Torterolo, P. (2013). Microinjection of melanin concentrating hormone into the lateral preoptic area promotes non-REM sleep in the rat. *Peptides*, 39, 11-5. doi: 10.1016/j.peptides.2012.10.005.

Berridge, K. C., Ho, C. Y., Richard, J. M., & DiFeliceantonio, A. G. (2010). The tempted brain eats: pleasure and desire circuits in obesity and eating disorders. *Brain Research*, 1350, 43-64.

Berthoud, H. R. (2002). Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 26(4), 393-428.

Berthoud, H. R., & Münzberg, H. (2011). The lateral hypothalamus as integrator of metabolic and environmental needs: from electrical self-stimulation to optogenetics. *Physiology & Behavior*, 104(1), 29-39.

Bisogno, T. (2008). Endogenous cannabinoids: structure and metabolism. *Journal of Neuroendocrinology*, 20, Suppl 1: 1-19. doi: 10.1111/j. 1365-2826.2008.01676.x.

Bisogno, T., Berrendero, F., Ambrosino, G., Cebeira, M., Ramos, J. A., Fernandez-Ruiz, J. J., & Di Marzo, V. (1999). Brain regional distribution of endocannabinoids: implications of their biosynthesis and biological function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 256(2), 377-80.

Bisogno, T., Howell, F., Williams, G., Minassi, A., Cascio, M. G., Ligestri, A., Matias, I., Schiano-Moriello, A., Paul, P., Williams, E. J., Gangadharan, U., Hobs, C., Di Marzo, V., & Doherty, P. (2003). Cloning of the first sn1-DAG lipases points

to the spatial and temporal regulation of the endocannabinoid signaling in the brain. *Journal of Cell Biology*, 163, 463-468.

Bittencourt, J. C. (2011). Anatomical organization of the melanin-concentrating hormone peptide family in the mammalian brain. *General and Comparative Endocrinology*, 172(2), 185-97.

Bittencourt, J. C., & Celis, M. E. (2008). Anatomy, function and regulation of neuropeptide EI (NEI). *Peptides*, 29(8), 1441-50.

Bittencourt, J. C., Presse, F., Arias, C., Peto, C., Vaughan, J., Nahon, J. L., Vale, W., & Sawchenko, P. E. (1992). The melanin-concentrating hormone system in the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *Journal of Comparative Neurology*, 319(2), 218-45.

Burdakov, D., Karnani, M. M., & Gonzalez, A. (en prensa). Lateral hypothalamus as a sensor-regulator in respiratory and metabolic control. *Physiology & Behavior*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.03.023>.

Burdakov, D., Luckman, S. M., & Verkhatsky, A. (2005). Glucose-sensing neurons of the hypothalamus. *Philosophical Transactions of the Royal Society Series B: Biological Sciences*, 360, 2227-35.

Buonamici, M., Young, G. A., & Khazan, N. (1982). Effects of acute Δ^9 -THC administration on EEG and EEG power spectra in the rat. *Neuropharmacology*, 21, 825-829.

Blouin, A. M., Fried, I., Wilson, C. L., Staba, R. J., Behnke, E. J., Lam, H. A., Maidment, N. T., Karlsson, KÆ., Lapierre, J. L., & Siegel, J. M. (2013). Human hypocretin and melanin-concentrating hormone levels are linked to emotion and social interaction. *Nature Communications*, 4, 1547. doi: 10.1038/ncomms2461.

- Bremer, F. (1935). Cerveau isolé et physiologie du sommeil. *Comptes Rendus des Société de Biologie, Paris, 40*, 160-179.
- Breton, C., Presse, F., Hervieu, G., & Naon, J. L. (1993). Structure and regulation of the mouse melanin-concentrating hormone mRNA and gene. *Molecular and Cell Neuroscience, 4*(3), 271-284.
- Broberger, C., de Lecea, L., Sutcliffe, J. G., & Hökfelt, T. (1998). Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *Journal of Comparative Neurology, 402*(4), 460-74.
- Brown, R. E., Basheer, R., McKenna, J. T., Strecker, R. E., & McCarley, R. W. (2012). Control of sleep and wakefulness. *Physiological Reviews, 92*(3), 1087-187. doi: 10.1152/physerv.00032.2011.
- Cadas, H., Gaillet, S., Beltramo, M., Venance, M., & Piomelli, D. (1996). Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *Journal of Neuroscience, 16*, 3934-92.
- Calignano, A., La Rana, G., Giufrida, A., & Piomelli, D. (1998). Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature, 394*, 277-81.
- Calvo, J. M., Simón-Arceo, K., & Fernández-Mas, R. (1996). Prolonged enhancement of REM sleep produced by carbachol microinjection into the amígdala. *Neuroreport, 7*(2), 577-80.
- Campbell, I. G., & Feinberg, I. (1996). Noncompetitive NMDA channel blockade during waking intensely stimulates NREM delta. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 276*(2), 737-42.

Cape, E. G., Manns, I. D., Alonso, A., Beaudet, A., & Jones, B. E. (2002). Neurotensin-induced bursting of cholinergic basal forebrain neurons promotes gamma and theta cortical activity together with waking and paradoxical sleep. *Journal of Neuroscience*, 20(22), 8452-61.

Card J. P., Swanson, L. W., & Moore R. Y. (2008). The Hypothalamus: An Overview of Regulatory Systems. En L. R. Squire, D. Berg, F. Bloom, S. du Lac, A. Ghosh & N. Spitzer (eds.), *Fundamental Neuroscience* (pp. 795-806). San Diego, CA: Academic Press.

Carlini, P. V., Schiöth, H. B., & de Barioglio, S. R. (2006). Melanin-concentrating hormone (MCH) reverts the behavioral effects induced by inescapable stress. *Peptides*, 27, 2300-2306.

Carter, M. E., Adamantidis, A., Ohtsu, H., Deisseroth, K., & de Lecea, L. (2009). Sleep homeostasis modulates hypocretin-mediated sleep-to-wake transitions. *Journal of Neuroscience*, 29(35): 10939-49.

Cota, D., Marsicano, G., Tschöp, M., Grübler, Y., Flachskamm, C., Schubert, M., Auer, D., Yassouridis, A., Thöne-Reineke, C., Ortman, S., Tomassoni, F., Cervino, C., Nisoli, E., Linthorst, A. C. E., Pasquali, R., Lutz, B., Stalla, G. K., & Pagotto, U. (2003). The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 112, 423-431.

Clément, O., Sapin, E., Berod, A., Fort, P., & Luppi, P. H. (2011). Evidence that neurons of the sublateralodorsal tegmental nucleus triggering paradoxical (REM) sleep are glutamatergic. *Sleep*, 34, 419-423.

Clément, O., Sapin, E., Libourel, P. A., Arthaud, S., Brischoux, F., Fort, P., & Luppi,

- P. H. (2012). The lateral hypothalamic area controls paradoxical (REM) sleep by means of descending projections to brainstem GABAergic neurons. *Journal of Neuroscience*, 32(47), 16763-64.
- Chambers, A. P., & Woods, S. C. (2012). The role of neuropeptide Y in energy homeostasis. En Hans-Georg Joost (ed.), *Appetite Control, Handbook of Experimental Pharmacology* (pp. 23-45). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. doi: 10.1007/978-3-642-24716-3_2.
- Charnay, Y., Bouras, C., Vallet, P. G., Golaz, J., Guntern, R., & Constantinidis, J. (1989). Immunohistochemical distribution of delta sleep inducing peptide in the rabbit brain and hypophysis. *Neuroendocrinology*, 49, 169-75.
- Chemelli, R. M., Willie, J. T., Sinton, C., Elmquist, J., Scammell, T., Lee, C., Richardson, J., Williams, S., Xiong, Y., Kisanuki, Y., Fitch, T., Nakazato, M., Hammer, R., Saper, C., & Yanagisawa, M. (1999). Narcolepsy in orexin *knockout* mice: Molecular genetics of sleep regulation. *Cell*, 98, 437-451.
- Chou, T. C., Lee, C. E., Lu, J., Elmquist, J. K., Hara, J., Willie, T., et al. (2001). Orexin (hypocretin) neurons contain dynorphin. *Journal of Neuroscience*, 21(19): RC168.
- Guilleminault, C., & Gelb, M. (1995). Clinical aspects and features of cataplexy. *Advances in Neurology*, 67, 65-77.
- 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, 83-7.
- Cravatt, B. F., Prospéro-García, O., Siuzdak, G., Gilula, N. B., Henriksen, S. J., Boger, D. L., & Lerner, R. A. (1995). Chemical characterization of a family of brain

lipids that induce sleep. *Science*, 268(5216), 1506-9.

Crean, R. D., Crane, N. A., & Mason, B. J. (2011). An evidence based review of acute and long-term effects of cannabis use on executive cognitive functions. *Journal of Addiction Medicine* 5(1): 1-8. doi: 10.1097/ADM.0b013e31820c23fa.

Cristino, L., Starowicz, K., De Petrocellis, L., Morishita, J., Ueda, N., Guglielmotti, V., & Di Marzo, V. (2008). Immunohistochemical localization of anabolic and catabolic enzymes for anandamide and other putative endovanilloids in the hippocampus and cerebellar cortex of the mouse brain. *Neuroscience*, 151, 955-968.

Datta, S., Calvo, J. M., Quattrochi, J. J., & Hobson, J. A. (1991). Long-term enhancement of REM sleep following cholinergic stimulation. *Neuroreport*, 2(10), 619-22.

de Lecea, L., Kilduff, T. S., Peyron, C., Gao, X., Foye, P. E., Danielson, P. E., Fukuhara, C., Battenberg, E. L., Gautvik, V. T., Bartlett, F. S. 2nd, Frankel, W. N., van den Pol, A. N., Bloom, F. E., Gautvik, K. M., & Sutcliffe, J. G. (1998). The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 95(1), 322-7.

Deadwyler, S. A., Porrino, L., Siegel, J. M., & Hampson, R. E. (2007). Systemic and nasal delivery of Orexin-A (Hypocretin-1) reduces the effects of sleep deprivation on cognitive performance in nonhuman primates. *Journal of Neuroscience*, 27(52), 14239-14247.

Della-Zuana, O., Presse, F., Ortola, C., Duhault, J., Nahon, J. L., & Levens, N. (2002). Acute and chronic administration of melanin-concentrating hormone enhances food intake and body weight in Wistar and Sprague-Dawley rats.

International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders, 26(10), 1289-95.

Devane, W. A., Dysarz, F. A. 3rd, Johnson, M. R., Melvin, L. S., & Howlett, A. C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular Pharmacology*, 34(5), 605-13.

Devane, W. A., Hanuš, 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 Marzo, V. (2006). A brief history of cannabinoid and endocannabinoid pharmacology as inspired by the work of British scientists. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(3), 134-40.

Dihn, T. P., Carpenter, D., Leslie, F. M., Freund, T. F., Catona, I., Sensi, S. L., Kathuria, S., & Piomelli, D. (2002). Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 99(16), 10819-24.

Dihn, T. P., Freund, T. F., & Piomelli, D. (2002). A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation. *Chemistry & Physics of Lipids*, 121, 149-158.

Domenici, M. R., Azad, S. C., Marsicano, G., Schierloh, A., Wotjak, C. T., Dodt, H. U., Zieglgänsberger, W., Lutz, B., & Rammes, G. (2006). Cannabinoid receptor type 1 located on presynaptic terminals of principal neurons in the forebrain controls glutamatergic synaptic transmission. *Journal of Neuroscience*, 26(21), 5794-9.

Dyer, C. J., Touchette, K. J., Carroll, J. A., Alle, G. L., & Matteri, R. L. (1999). Cloning of porcine prepro-orexin cDNA and effects of an intramuscular injection of

synthetic porcine orexin-B on feed intake in young pigs. *Domestic Animal Endocrinology*, 16(3), 145-48.

Dyzma, M., Boudjeltia, K. Z., Faraut, B., & Kerkhofs, M. (2010). Neuropeptide Y and sleep. *Sleep Medicine Reviews*, 14(3), 161-5.

Edwards, C. M., Abusnana, S., Sunter, D., Murphy, K. G., Ghatei, M. A., Bloom, S. R. (1999). The effect of orexins on food intake: comparison with neuropeptide Y, melanin-concentrating hormone and galanin. *Journal of Endocrinology*, 160(3), R7-12.

Eggermann, E., Serafin, M., Bayer, L., Machard, D., Saint-Mleux, B., Jones, B. E., & Muhlethaler, M. (2001). Orexins/hypocretins excite basal forebrain cholinergic neurons. *Neuroscience*, 108(2), 177-81.

Egertova, M., & Elphick, M. R. (2000). Localisation of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies of the intracellular C-terminal tail of CB1. *Journal of Comparative Neurology*, 422(2), 159-171.

El-Talatini, M. R., Taylor, A. H., Elson, J. C., Brown, L., Davidson, A. C., & Konje, C. J. (2009). Localisation and function of the endocannabinoid system in the human ovary. *PLoS One* 4(2): e4579. doi: 10.1371/journal.pone.0004579.

Elias, C. F., Lee, C. E., Kelly, J. F., Ahima, R. S., Kuhar, M., Saper, C. B., & Elmquist, J. K. (2001). Characterization of CART neurons in the rat and human hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology*, 432(1), 1-19.

Elias, C. F., Saper, C. B., Maratos-Flier, E., Tritos, N. A., Lee, C., Kelly, J., Trato, J. B., Hoffman, G. E., Ollmann, M. M., Barsh, G. S., Sakurai, T., Yanagisawa, M., & Elmquist, J. K. (1998). Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *Journal of Comparative*

Neurology, 402(4), 442-59.

Epstein, A. N. (1960). Reciprocal changes in feeding behavior produced by intrahypothalamic chemical injections. *American Journal of Physiology*, 199, 969-974.

España, R., Scammell, T. E. (2004). Sleep neurobiology for the clinician. *Sleep*, 27(4), 811-20.

Felder, C. C., Joyce, K. E., Briley, E. M., Mansouri, J., Mackie, K., Blond, O., Lai, Y., Ma, A. L., & Mitchell, R. L. (1995). Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Molecular Pharmacology*, 48, 443-450.

Fogaça, M. V., Aquiar, D. C., Moreira, F. A., & Guimarães, F. S. (2012). The endocannabinoid and endovanilloid systems interact in the rat prelimbic medial prefrontal cortex to control anxiety-like behavior. *Neuropharmacology*, 63(2), 202-10.

Foltin, R. W., Brady, J. V., & Fischman, M. F. (1986). Behavioral analysis of marihuana effects on food intake in humans. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 25, 577-582.

Foltin, R. W., Fischman, M. W., & Byrne, M. F. (1988). Effects of smoked marihuana on food intake and body weight of humans living in a residential laboratory. *Appetite*, 11, 1-14.

Fonseca, B. M., Correia-da-Silva, G., Taylor, A. H., Lam, P. M., Marczylo, T. H., Konje, J. C., & Texeira, N. A. (2012). Characterisation of the endocannabinoid system in rat haemochorial placenta. *Reproductive Toxicology*, 34, 347-56.

Fonseca, B. M., Costa, M. A., Almada, M., Correia-da-Silva, G., & Texeira, N. A.

(2013). Endogenous cannabinoids revisited: A biochemistry perspective. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 102-103, 13-30. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2013.02.002.

Fu, J., Gaetani, S., Oveisi, F., Lo Verme, J., Serrano, A., Rodríguez de Fonseca, F., Rosengarth, A., Luecke, H., Di Giacomo, B., Tarzia, G., & Piomelli, D. (2003). Oleoylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR- α . *Nature*, 425(6593), 90-3.

Freemon, F. R. (1974). The effect of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol on sleep. *Psychopharmacologia*, 35, 39-44.

Galiègue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carrière, D., Carayon, P., Bouaboula, M., Shire, D., Le Fur, G., & Casellas, P. (1995). Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte. *European Journal of Biochemistry*, 15, 232(1): 54-61.

Gammon, C. M., Allen, A. C., & Morell, P. (1989). Bradykinin stimulates phosphoinositide hydrolysis and mobilization of arachidonic acid in dorsal root ganglion neurons. *Journal of Neurochemistry*, 53, 95-101.

Gao, X. B., van den Pol, A. N. (2001). Melanin concentrating hormone depresses synaptic activity of glutamate and GABA neurons from rat lateral hypothalamus. *Journal of Physiology*, 533(Pt 1), 237-52.

Gaoni, Y., & Mechoulam, R. (1964). Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *Journal of the American Chemical Society*, 86, 1646-7.

García-García, F., & Drucker-Colín, R. (1999). Endogenous and exogenous factor on sleep-wake cycle regulation. *Progress in Neurobiology*, 58(4), 297-314.

Gaus, S. E., Strecker, R. E., Tate, B. A., Parker, R. A., & Saper, C. B. (2002). Ventrolateral preoptic nucleus contains sleep-active, galaninergic neurons in multiple mammalian species. *Neuroscience*, *115*(1), 285-94.

George, R., Haslett, W. L., & Jenden, D. J. (1964). A cholinergic mechanism in the brainstem reticular formation: induction of paradoxical sleep. *International Journal of Neuropharmacology*, *3*, 541-52.

Geraschenko, D., Chou, T. C., Blanco-Centurión, C. A., Saper, C. B., & Shiromani, P. J. (2004). Effects of lesions of the histaminergic tuberomammillary nucleus on spontaneous sleep in rats. *Sleep*, *27*(7), 1275-81.

Gerashchenko, D., & Shiromani, P. J. (2004). Different neuronal phenotypes in the lateral hypothalamus and their role in sleep and wakefulness. *Molecular Neurobiology*, *29*(1), 41-59.

Goebel-Stengel, M., Wang, L., Stengel, A., & Taché, Y. (2011). Localization of nesfatin-1 neurons in the mouse brain and functional implication. *Brain Research*, *1396*, 20-34.

Gieseler, F., Ungefroren, H., Settmacher, U., Hollenberg, M. D., Kauffman, R. (2013). Proteinase-activated receptors (PARs) – focus on receptor-receptor-interactions and their physiological and pathophysiological impact. *Cell Communication and Signaling*, *11*: 86, 1-26.

Gong, H., McGinty, D., Guzman-Marin, R., Chew, K. T., Stewart, D., & Szymusiak, R. (2004). Activation of c-fos in GABAergic neurons in the preoptic area during sleep and in response to sleep deprivation. *Journal of Physiology*, *556*(Pt 3), 935-46.

Goutagny, R., Verret, L., Fort, P., Salvert, D., Léger, L., Luppi, P. H., & Peyron, C.

(2004). Posterior hypothalamus and regulation of vigilance states. *Archives Italiennes de Biologie*, 42(4), 487-500.

Goparaju, S. K., Ueda, N., Yamaguchi, H., & Yamamoto, S. (1998). Anandamide amidohydrolase reacting with 2-arachidonoylglycerol, another cannabinoid receptor ligand. *Federation of Biochemical Societies Letters*, 422, 69-73.

Guzmán, M., Lo Verme, J., Fu, J., Oveisi, F., Blázquez, C., & Piomelli, D. (2004). Oleoylethanolamide stimulates lipolysis by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR- α). *Journal of Biological Chemistry*, 279, 27849-54.

Glass, M., & Northup, J. K. (1999). Agonist selective regulation of G proteins by cannabinoid CB(1) and CB(2) receptors. *Molecular Pharmacology*, 324, 187-92.

Gulyas, A. L., Cravatt, B. F., Bracey, M. H., Dinh, T. P., Piomelli, D., Boscia, F., & Freund, D. F. (2004). Segregation of two endocannabinoid hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *European Journal of Neuroscience*, 20(2), 441-58.

Gregg, L. C., Jung, K. M., Spradley, J. M., Nyilas, R., Suplita, R. L. 2nd, Zimmer, A., Watanabe, M., Mackie, K., Katona, I., Piomelli, D., & Hohmann, A. G. (2012). Activation of type 5 metabotropic glutamate receptors and diacylglycerol lipase- α initiates 2-arachidonoylglycerol formation and endocannabinoid-mediated analgesia. *Journal of Neuroscience*, 32(28), 9457-68.

Gvilia, I., Xu, F., McGinty, D., & Szymusiak, R. (2006). Homeostatic regulation of sleep: a role for preoptic area neurons. *Journal of Neuroscience*, 26, 9426-9433.

Haas, L. F. (2003). Hans Berger (1873-1941), Richard Caton (1842-1926), and electroencephalography. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 74(1),

9.

Hagan, J. J., Leslie, R.A., Patel S., Evans, M. L., Wattam, T. A., Holmes, S., Benham, C. D., Taylor, S. G., Routledge, C., Hemmati, P., Munton, R. P., Ashmeade, A. S., Hatcher, J. P., Hatcher, P. D., Joines, D. N. C., Smith, M. I., Piper, D. C., Hunter, A. J., Porter, R. A., & Upton, N. (1999). Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 96, 10911-10916.

Hahn, J. D. (2010). Comparison of melanin-concentrating hormone and hypocretin/orexin peptide expression patterns in a current parcelling scheme of the lateral hypothalamic zone. *Neuroscience Letters*, 468, 12-17.

Hanuš, L., Avraham, Y., Ben-Shushan, D., Zolotarev, O., Berry, E. M., & Mechoulam, R. (2003). Short-term fasting and prolonged semistarvation have opposite on 2-AG levels on mouse brain. *Brain Research*, 983, 144-151.

Hanuš, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 98(7), 3662-5.

Häring, M., Guggenhuber, S., & Lutz, B. (2012). Neuronal populations mediating the effects of endocannabinoids on stress and emotionality. *Neuroscience*, 204, 145-158.

Hashimoto, Y., Ohno-Shosaku, T., Tsubokawa, H., Ogata, H., Emoto, K., Maejima, T., Araishi, K., Shin, H. S., & Kano, M. (2005). Phospholipase C β serves as a coincidence detector through its Ca²⁺ dependency for triggering retrograde endocannabinoid signal. *Neuron*, 45(2), 257-268.

Hashimotodani, Y., Ohno-Shosaku, T., Yamasaki, M., Sakimura, K., & Kano, M. (2011). Neuronal protease-activated receptor 1 drives synaptic retrograde signaling mediated by the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Journal of Neuroscience*, *31*, 3104-3109.

Hassani, O. K., Lee, M. G., Henny, P., & Jones, B. E. (2009). Melanin-concentrating hormone neurons discharge in a reciprocal manner to orexin neurons across the sleep-wake cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, *106*(7), 2418-2422.

Hawes, B. E., Kil, E., Green, B., O'Neill, K., Fried, S., & Graziano, M. P. (2000). The melanin-concentrating hormone receptor couples to multiple G proteins to activate diverse intracellular signaling pathways. *Endocrinology*, *141*(12), 4524-32.

Herkenham, M., Lynn, A. B., Little, M. D., Johnson, M. R., Melvin, L. S., de Costa, B. R., & Rice, K. C. (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, *87*(5), 1932-6.

Herrera-Solís, A., Guzmán Vázquez, K., & Prospéro-García, O. (2009). Acute and subchronic administration of anandamide or oleamide increases REM sleep in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *95*, 106-112.

Hetherington, A. W., & Ranson, S. W. (1940). Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *Anatomical Record*, *78*, 149-172.

Higuchi, S., Usui, A., Murakami, M., Matsushita, S., Nishioka, N., Yoshino, A., Matsui, T., Muraoka, H., Ishizuka, Y., Kanba, S., & Sakurai, T. (2002). Plasma orexin-A is lower in patients with narcolepsy. *Neuroscience Letters*, *318*, 61-64.

Himmi, T., Boyer, A., & Orsini, J. C. (1988). Changes in lateral hypothalamic neuronal activity accompanying hyper- and hypoglycemia. *Physiology & Behavior*,

44, 347-354.

Hobson, J. A. (1987). Sleep. En G. Adelman (comp.), *Encyclopedia of Neuroscience*, vol. 2 (pp. 1097-1101). Boston, MA: Birkhauser.

Holmes, C. J., & Jones, B. E. (1994). Importance of cholinergic, GABAergic, serotonergic and other neurons in the medial medullary reticular formation for sleep-wake states studied by cytotoxic lesions in the cat. *Neuroscience*, 62, 1179-1200.

Horvath, T. L., Peyron, C., Diano, S., Ivanov, A., Aston-Jones, G., Kilduff, T. S., & van den Pol, A. N. (1999). Hypocretin (orexin) activation and synaptic innervation of the locus coeruleus noradrenergic system. *Journal of Comparative Neurology*, 415(2), 45-59.

Howlett, A. C. (1985). Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Biochemistry of the response in neuroblastoma cell membranes. *Molecular Pharmacology*, 27, 429-36.

Howlett, A. C. (2005). Cannabinoid receptor signaling. En R. G. Pertwee (ed.), *Cannabinoids. Handbook of Experimental Pharmacology. Vol. 168.* (pp. 53-79.) Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.

Howlett, A. C., Barth, F., Bonner, T. I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W. A., Felder, C. C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B. R., Mechoulam, R., & Pertwee, R. G. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors. *Pharmacological Reviews*, 54, 161-202.

Howlett, A. C., & Fleming, R. M. (1984). Cannabinoid Inhibition of adelynate-cyclase – Pharmacology of the response in neuro-blastoma cell-membranes. *Molecular Pharmacology*, 26, 532-8.

Huang, H., & van den Pol, A. N. (2007). Rapid direct excitation and long-lasting enhancement of NMDA response by group I metabotropic glutamate receptor activation of hypothalamic melanin-concentrating neurons. *Journal of Neuroscience*, 27(43), 11560-11572.

Huang, S. M., Bisogno, T., Trevisani, M., Al-Hayani, A., De Petrocellis, L., Fezza, F., Tognetto, M., Petros, T. J., Krey, J. F., Chu, C. J., Miller, J. D., Davies, S. N., Geppetti, P., Walker, J. M., & Di Marzo, V. (2002). An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 99(12), 8400-5.

Huang, Z. L., Qu, W. M., Li, W. D., Mochizuki, T., Eguchi, N., Watanabe, T., Urade, Y., & Hayaishi, O. (2001). Arousal effect of orexin A depends on activation of the histaminergic system. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 98(17), 9965-70.

Hueda, N., Tsuboi, K., Uyama, T., & Ohnishi, T. (2011). Biosynthesis and degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Biofactors*, 37(1), 1-7.

Huitrón-Reséndiz, S., Sánchez-Alavez, M., Wills, D. M., Cravatt, B. F., & Henriksen, S. J. (2004). Characterization of the sleep-wake patterns in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Sleep*, 27(5), 857-865.

Inui, A., Okita, M., Nakajima, M., Inoue, T., Sakatani, N., Oya, M., Morioka, H., Okimura, Y., Chihara, K., & Baba, S. (1991). Neuropeptide regulation of feeding in dogs. *American Journal of Physiology*, 261(3 Pt2), R588-94.

Imaki, T., Shibasaki, T., Hotta, M., Masuda, A., Demura, H., Shizume, K., & Ling, N. (1985). The satiety effect of growth hormone-releasing factor in rats. *Brain Research*, 340, 186-188.

- Ishizuka, T., Murotani, T., & Yamatodani, A. (2010). Modafinil activates the histaminergic system through the orexinergic neurons. *Neuroscience Letters*, *483*(3), 193-6.
- Jacobs, B. L., & Fornal, C. A. (1999). Activity of brain serotonergic neurons in behaving animals. *Neuropsychopharmacology*, *21*(2Suppl), 9S-15S.
- Jamshidi, N., & Taylor, D. A. (2001). Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *British Journal of Pharmacology*, *134*(6), 1151-4.
- Jego, S., Salvert, D., Renouard, L., Mori, M., Goutagny, R., Luppi, P. H., & Fort, P. (2012). Tuberal hypothalamic neurons secreting the satiety molecule Nesfatin-1 are critically involved in paradoxical (REM) sleep homeostasis. *PLoS ONE*, *7*(12): e52525.
- Jones, B. E. (2005). From waking to sleeping: neuronal and chemical substrates. *Trends in Pharmacological Sciences*, *26*(11), 578-86.
- Jouvet, M. (1962). Recherches sur les structures nerveuses et les mécanismes responsables des différentes phases du sommeil physiologique. *Archives Italiennes de Biologie*, *100*, 125-206.
- Jouvet M., & Michel, F. (1959). Corrélations électromyographiques du sommeil chez le chat décortiqué et mesencéphalique chronique. *Comptes Rendus de la Societe de Biologie*, *153*, 422-425.
- Jung, K. M., Astarita, G., Zhu, C., Wallace, M., Mackie, K., & Piomelli, D. (2007). A key role for diacylglycerol lipase alpha in metabotropic glutamate receptor-dependent endocannabinoid mobilization. *Molecular Pharmacology*, *72*, 612-621.
- Kaitin, K. L. (1984). Preoptic area unit activity during sleep and wakefulness in the

cat. *Experimental Neurology*, 83, 347-357.

Kafi, S., Monnier, M., & Gallard, J. M. (1979). The delta-sleep inducing peptide (DSIP) increases duration of sleep in rats. *Neuroscience Letters*, 13, 169-172.

Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Hashimotodani, Y., Uchigashima, M., & Watanabe, M. (2009). Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiological Reviews*, 89, 309-380.

Karagiannides, I., Torres, D., Tseng, Y. H., Bowe, C., Carvalho, E., Espinoza, D., Pothoulakis, C., & Kokkotou, E. (2008). Substance P as a novel anti-obesity target. *Gastroenterology*, 134(3), 747-55.

Karczmar, A. G., Longo, V. G., & Scotti de Carolis, A. (1970). A pharmacological model of paradoxical sleep: The role of cholinergic and monoamine systems. *Physiology & Behavior*, 5(2), 175-182.

Katafuchi, T., Oomura, Y., & Yoshimatsu, H. (1985). Single neuron activity in the rat lateral hypothalamus during 2-Deoxy-D-Glucose induced and natural feeding behavior. *Brain Research*, 359, 1-9.

Kayama, Y., Ohta, M., & Jodo, E. (1992). Firing of 'possibly' cholinergic neurons in the rat laterodorsal tegmental nucleus during sleep and wakefulness. *Brain Research*, 569, 210-220.

Kawauchi, H. (2006). Functions of melanin-concentrating hormone in fish. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 305(9), 751-760.

Kawauchi, H., Kawazoe, I., Tsubokawa, M., Kishida, M., & Baker, B. I. (1983). Characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries. *Nature*, 305(5932), 321-323.

- Keating, G. L., Kuhar, M. J., Bliwise, D. L., & Rye, D. B. (2010). Wake promoting effects of cocaine and amphetamine-regulated transcript (CART). *Neuropeptides*, *44*(3), 241-6.
- Kennedy, G. C. (1950). The hypothalamic control of food intake in rats. *Proceedings of the Royal Society Series B: Biological Sciences*, *137*(889), 535-49.
- Kerkhofs, M., & Lavie, P. (2000). Frédéric Bremer 1892-1982: a pioneer in sleep research. *Sleep Medicine Reviews*, *4*(5), 505-14.
- Kilduff, T. S., & de Lecea, L. (2001). Mapping of mRNAs for the hypocretin/orexin and melanin-concentrating hormone receptors: networks of overlapping peptide systems. *Journal of Comparative Neurology*, *435*(1), 1-5.
- Kim, J., Nakajima, K., Oomura, Y., Wayner, M. J., & Sasaki, K. (2009). Electrophysiological effects of orexins/hypocretins on pedunculopontine tegmental neurons in rats: An in vitro study. *Peptides*, *30*, 191-209.
- Kirkham, T. C., Williams, C. M., Fezza, F., & Di Marzo, V. (2002). Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation. *British Journal of Pharmacology*, *136*, 550-556.
- Kishi, T., Aschkenasi, C. J., Lee, C. E., Mountjoy, K. G., Saper, C. B., & Elmquist, J. K. (2003). Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, *457*(3), 213-35. DOI: 10.1002/cne.10454.
- Kiyashchenko, L. I., Mileykovskiy, B. Y., Lai, Y. Y., & Siegel, J. M. (2001). Increased and decreased muscle tone with orexin (hypocretin) microinjections in the locus coeruleus and pontine inhibitory area. *Journal of Neurophysiology*, *85*(5), 2008-16.

Lai, Y. Y., & Siegel, J. M. (1991). Pontomedullary glutamate receptors mediating locomotion and muscle tone suppression. *Journal of Neuroscience*, *11*, 2931-2937.

Lagos, P., Monti, J. M., Jantos, H., & Torterolo, P. (2012). Microinjection of the melanin-concentrating hormone into the lateral basal forebrain increases REM sleep and reduces wakefulness in the rat. *Life Sciences*, *90*(23-24), 895-9.

Lagos, P., Torterolo, P., Jantos, H., Chase, M. H., & Monti, J. M. (2008). Effects on sleep of melanin-concentrating hormone (MCH) microinjections into the dorsal raphe nucleus. *Brain Research*, *1210*, 163-78. doi. 10.1016/j.brainres.2008.02.104.

Lagos, P., Torterolo, P., Jantos, H., & Monti, J. M. (2011). Immunoneutralization of melanin-concentrating hormone (MCH) in the dorsal raphe nucleus: effects on sleep and wakefulness. *Brain Research*, *1369*, 112-8.

Lamber, D. M., & Fowler, C. J. (2005). The endocannabinoid system: drug targets, lead compounds and potential therapeutic applications. *Journal of Medicinal Chemistry*, *48*, 5059-87.

Lambert, D. M., Di Paolo, F. G., Sonveaux, P., Kanyonyo, M., Govaerts, S. J., Hermans, E., Bueb, J., Delzenne, N. M., & Tschirhart, E. J. (1999). Analogues and homologues of N-palmitoylethanolamide, a putative endogenous CB(2) cannabinoid, as potential ligands for the cannabinoid receptors. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1440*(2-3), 266-74.

Larsen, P. J. (1992). Distribution of substance P-immunoreactive elements in the preoptic area and the hypothalamus of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, *316*, 287-313.

Lee, M. G., Hassani, O. K., & Jones, B. E. (2005). Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep-waking cycle. *Journal of Neuroscience*,

25(28), 6716-20.

Leger, L., Charnay, Y., Danger, J. M., Vaudry, H., Pelletier, G., Dubois, P. M., & Jouvett M. (1987). Mapping of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the feline hypothalamus and hypophysis. *Journal of Comparative Neurology*, 255, 283-292.

Leggett, J. D., Aspley, S., Beckett, S. R., D'Antona, A. M., & Kendall, D. A. (2004). Oleamide is a selective endogenous agonist of rat and human CB1 cannabinoid receptors. *British Journal of Pharmacology*, 141(2), 253-62.

Lerner, R. A., Siuzdak, G., Prospéro-García, O., Henriksen, S. J., Boger, D. L., & Cravatt, F. B. (1994). Cerebrodiene: a brain lipid isolated from sleep-deprived cats. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 91, 9505-8.

Lieb, K., Ahlvers, K., Dancker, K., Strohbusch, S., Reincke, M., Feige, B., Berger, M., Riemann, D., & Voderholzer, U. (2002). Effects of the neuropeptide substance P on sleep, mood and neuroendocrine measures in healthy young men. *Neuropsychopharmacology*, 27(6), 1041-9.

Lin, L., Faraco, J., Li, R., Kadotani, H., Rogers, W., Lin, X., Qiu, X., de Jong, P. J., Nishino, S., & Mignot, E. (1999). The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell* 98(3), 365-76.

Lo Verme, J., Lu, J., Astarita, G., La Rana, G., Russo, R., Calignano, A., & Piomelli, D. (2005). The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-alpha mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide. *Molecular Pharmacology*, 67(1), 15-9.

Lou, W., Wang, Y., & Reiser, G. (2007). Protease-activated receptors in the brain: Receptor expression, activation and functions in neurodegeneration and neuroprotection. *Brain Research Reviews*, 56, 331-345.

Lovinger, D. M. (2008). Presynaptic modulation by endocannabinoids. En T. C. Südhof & K. Starke (eds.), *Pharmacology of Neurotransmitter Release, vol. 184. Handbook of Experimental Pharmacology* (pp. 435-477). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.

Lu, J., Greco, M. A., Shiromani, P., & Saper, C. B. (2000). Effect of lesions of the Ventrolateral Preoptic Nucleus on NREM and REM Sleep. *Journal of Neuroscience, 20*(10), 3830-3842.

Lu, J., Sherman, D., Devor, M., & Saper, C. B. (2006). A putative flip-flop switch for control of REM sleep. *Nature, 441*(7093), 589-94.

Luchicchi, A., Pistis, M. (2012). Anandamide and 2-arachidonoylglycerol: pharmacological properties, functional features, and emerging specificities of the two major endocannabinoids. *Molecular Neurobiology, 46*(2), 374-92.

Luppi, P. H., Clément, O., & Fort, P. (2013). Paradoxical (REM) sleep genesis by the brainstem is under hypothalamic control. *Current Opinion In Neurobiology, 23*, 786-792. <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2013.02.006>.

Luppi, P. H., Gervasoni, D., Verret, L., Goutagny, R., Peyron, C., Salvert, D., Legger, L., & Fort, P. (2007). Paradoxical (REM) sleep genesis: The switch from an aminergic-cholinergic to a GABAergic-glutamatergic hypothesis. *Journal of Physiology, Paris, 100*(5-6), 271-83.

Luttinger, D., King, R. A., Sheppard, D., Strupp, J., Nemeroff, C. B., & Prange, A. J. Jr. (1982). The effect of neurotensin on food consumption in the rat. *European Journal of Pharmacology, 81*(3), 499-503.

Ljungdahl, A., Hökfelt, T., & Nilsson, G. (1978). Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat—I. Cell bodies and nerve

terminals. *Neuroscience*, 3(10): 861-943.

Mahler, S. V., Smith, R. J., Moorman, D. E., Sartor, G. C., & Aston-Jones, G. (2012). Multiple roles for orexin/hypocretin in addiction. *Progress in Brain Research*, 198, 79-121.

Mackie, K. (2005). Distribution of cannabinoid receptors in central and peripheral nervous system. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 168, 299-325.

Malek, M., Marklund, S., Dyer, C., Matteri, R., & Rothschild, M. (2000). Linkage and physical mapping of the porcine prepro-orexin gene. *Mammalian Genome*, 11(4): 342-3.

Maloney, K. J., Mainville, L., & Jones, B. E. (1999). Differential c-Fos expression in cholinergic, monoaminergic, and GABAergic cell groups of the pontomesencephalic tegmentum after paradoxical sleep deprivation and recovery. *Journal of Neuroscience*, 19, 3057-3072.

Mallieux, P., & Vanderhaeghen, J. J. (1992). Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautoradiography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience*, 48(3): 655-68.

Manfridi, A., Brambilla, D., & Mancina, M. (1999). Stimulation of AMPA receptors in the rat nucleus basalis of Meynert affects sleep. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 277(5 Pt 2), R1488-92.

Manzanares, J., Julian M., & Carrascosa, A. (2006). Role of the cannabinoid system in pain control and therapeutic implications for the management of acute and chronic pain episodes. *Current Neuropharmacology*, 4(3): 239-57.

Marcus, J. N., Aschkenasi, C. J., Lee, C. E., Chemelli, R. M., Saper, C. B., Yanagisawa, M., & Elmquist, J. K. (2001). Differential expression of orexin

receptors 1 and 2 in the rat brain. *Journal of Comparative Neurology*, 435(1): 6-25.

Martínez-González, D., Bonilla-Jaime, H., Morales-Otal, A., Henriksen, S. J., Velázquez-Moctezuma, J., & Prospéro-García, O. (2004). Oleamide and anandamide effects on food intake and sexual behavior. *Neuroscience Letters*, 346, 1-6.

Marsicano, G., & Lutz, B. (1999). Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *European Journal of Neuroscience*, 11(12), 4213-25.

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, 561-4.

Mayer, J., & Thomas, J. W. (1967). Regulation of food intake and obesity. *Science*, 156, 328-337.

McGregor, R., Wu, M. F., Barber, G., Ramanathan, L., & Siegel, J. M. (2011). Highly specific role of hypocretin (orexin) neurons: differential activation as a function of diurnal phase, operant reinforcement versus operant avoidance and light level. *Journal of Neuroscience*, 31(43), 15455-67.

McPartland, J. M., & Glass, M. (2003). Functional mapping of cannabinoid receptor homologs in mammals, other vertebrates, and invertebrates. *Gene*, 312, 297-303.

Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanuš, L., Ligumsky, M., Kaminski, N. E., Schatz, A. R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B. R., Compton, D. R., Pertwee, R. G., Griffin, G., Bayewitch, M., Barg, J., & Vogel, Z. (1995). Identification of an endogenous 2-mono-glyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology*, 50, 83-90.

Mechoulam, R., Frider, E., & Di Marzo, V. (1998). Endocannabinoids. *European Journal of Pharmacology*, 395, 1-18.

Mechoulam, R., Frider, E., Hanuš, L., Sheskin, T., Bisogno, T., Di Marzo, V., Bayewitch, M., & Vogel, Z. (1997). Anandamide may mediate sleep induction. *Nature*, 389(6646), 25-6.

Méndez-Díaz, M., Herrera-Solís, A., Soria-Gómez, E., Rueda-Orozco, P. E., & Prospéro-García, O. (2008). Mighty cannabinoids: A potential pharmacological tool in medicine. En M. Méndez Übach y R. Mondragón-Ceballos (eds.), *Neural mechanisms of action of drugs of abuse and natural reinforcers* (pp. 137-157). Kerala: Research Signpost.

Mercer, R. E., Chee, M. J., & Colmers, W. F. (2011). The role of NPY in hypothalamic mediated food intake. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 32(4), 398-415.

Meister, B. (2007). Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight. *Physiology & Behavior*, 92(1-2), 263-71.

Méndez-Díaz, M., Domínguez Martín, E., Pérez Morales, M., Ruiz-Contreras, A. E., Navarro, L., & Prospéro-García, O. (2009). The anorexigenic peptide cocaine- and-amphetamine-regulated transcript modulates rem-sleep in rats. *Neuropeptides*, 43(6), 499-505.

Mileykovskiy, B. Y., Kiyashchenko, L. I., Kodama, T., Lai, Y. Y., & Siegel, J. M. (2000). Activation of pontine and medullary motor inhibitory regions reduces discharge in neurons located in the locus coeruleus and the anatomical equivalent of the midbrain locomotor region. *Journal of Neuroscience*, 20, 8551-8.

Mileykovskiy, B. Y., Kiyashchenko, L. I., & Siegel, J. M. (2005). Behavioral correlates of activity in identified hypocretin/orexin neurons. *Neuron*, *46*(5), 787-798.

Modirrousta, M., Mainville, L., & Jones, B. E. (2005). Orexin and MCH neurons express c-Fos differently after sleep deprivation vs. recovery and bear different adrenergic receptors. *European Journal of Neuroscience*, *21*, 2807-2816.

Molik, E., Zieba, D. A., Misztal, T., Romanowicz, K., Wszola, M., Wierzchos, E., & Nowakowski, M. (2008). The role of orexin A in the control of prolactin and growth hormone secretions in sheep—in vitro study. *Journal of Physiology and Pharmacology*, *59*, Suppl 9: 91-100.

Monti, J. M., Torterolo, P., & Lagos, P. (2013). Melanin-concentrating hormone control of sleep-wake behavior. *Sleep Medicine Reviews*, *17*(4), 293-298; doi: 10.1016/j.smr.2012.10.002

Monnier, M., Dudler, L., Gächter, R., & Schoenenberg, G. A. (1977). Delta sleep-inducing peptide (DSIP): EEG and motor activity in rabbits following intravenous administration. *Neuroscience Letters*, *6*(1), 9-13.

Monzón, M. E., de Barioglio, S. R. (1999). Response to novelty after i.c.v. injection of melanin-concentrating hormone (MCH) in rats. *Physiology & Behavior*, *67*(5), 813-817.

Monzón, M. E., de Souza, M. M., Izquierdo, L. A., Izquierdo, I., Barros, D. M., de Barioglio, S. R. (1999). Melanin-concentrating hormone (MCH) modifies memory retention in rats. *Peptides*, *20*, 1517-1519.

Morin A. J., & Beaudet, A. (1998). Origin of the neurotensinergic innervation of the rat basal forebrain studied by retrograde transport of cholera toxin. *Journal of*

Comparative Neurology, 391, 30-41.

Moruzzi G, & Magoun HW (1949). Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 1(4), 455-73.

Mountjoy, K. G., Mortrud, M. T., Low, M. J., Simerly, R. B., & Cone, R. D. (1994). Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Molecular Endocrinology*, 8(10), 1298-1308. <http://dx.doi.org/10.1210/mend.8.10.7854347>.

Munro, S., Thomas, K. L., & Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365, 61-5.

Murillo-Rodríguez, E., Cabeza, R., Méndez-Díaz, M., Navarro, L., & Prospéro-García, O. (2001). Anandamide-induced sleep is blocked by SR141716A, a CB1 receptor antagonist, and U73122, a phospholipase C inhibitor. *Neuroreport*, 12(10), 2131-6.

Nagamine, I., Sunagawa, K., Kuriwaki, J., & Shinjo, A. (2003). Changes in single unit activity in the lateral hypothalamic area of goats during feeding. *Journal of Animal Science*, 81, 529-536.

Nahon, J. L., Presse, F., Bittencourt, J. C., Sawchenko, P. E., & Vale, W. (1989). The rat melanin-concentrating hormone messenger ribonucleic acid encodes multiple putative neuropeptides co-expressed in the dorsolateral hypothalamus. *Endocrinology* 125(4), 2056-2065.

Nambu, T., Sakurai, T., Mizukami, K., Hosoya, Y., Yanagizawa, M., & Goto, K. (1999). Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Research*, 827, 243-260.

Nieuwenhuys, R., Geeraedts, L. M., & Veening, J. G. (1982). The medial forebrain

bundle of the rat. I. General Introduction. *Journal of Comparative Neurology*, 206, 49-81.

Navarro, L., Martínez-Vargas, M., Murillo-Rodríguez, E., Landa, A., Méndez-Díaz, M., & Prospéro-García, O. (2003). Potential role of the cannabinoid receptor CB1 in rapid eye movement sleep rebound. *Neuroscience*, 120, 855-859.

O'Sullivan, S. E. (2007). Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator activated-receptors. *British Journal of Pharmacology*, 152(5): 576-82.

Oddi, S., Fezza, F., Pasquariello, N., De Simone, C., Rapino, C., Dainese, E., Finazzi-Agrò, A., & Maccarrone, M. (2008). Evidence for the intracellular accumulation of anandamide in adiposomes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(5): 840-50.

Oh-I, S., Shimizu, H., Satoh, T., Okada, S., Adachi, S., Inoue, K., Equchi, H., Yamamoto, M., Imaki, T., Hashimoto, K., Tsuchiya, T., Monden, T., Horiguchi, K., Yamada, M., & Mori, M. (2006). Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature*, 443(7712), 709-12.

Ohno, K., & Sakurai, T. (2008). Orexin neuronal circuitry: Role in the regulation of sleep and wakefulness. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 29(1): 70-87.

Okamoto, Y., Morishita, J., Tsuboi, K., Tonai, T., & Ueda, N. (2004). Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *Journal of Biological Chemistry*, 279(7), 5298-5305.

Orsini, J. C., Armstrong, D. L., & Wayner, M. J. (1992). Responses of lateral hypothalamic neurons recorded in vitro to moderate changes in glucose concentration. *Brain Research Bulletin*, 29, 503-05.

Ossovskaya, V. S., & Bunnett, N. W. (2004). Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiological Reviews*, 84, 579-621.

Pace-Shott, E. F. (2009). Definitions and Descriptions of Sleep: Sleep Architecture. En R. Stickgold & M. P. Walker (eds.), *The Neuroscience of Sleep* (pp. 11-17). San Diego, CA: Academic Press.

Parker, J. A., & Bloom, S. R. (2012). Hypothalamic neuropeptides and the regulation of appetite. *Neuropharmacology*, 63: 18-30.

Parmentier, R., Ohtsu, H., Djebbara-Hannas, Z., Valatx, J. L., Watanabe, T., & Lin, J. S. (2002). Anatomical, physiological, and pharmacological characteristics of histidine decarboxylase knock-out mice: evidence for the role of brain histamine in behavioral and sleep-wake control. *Journal of Neuroscience*, 22(17): 7695-711.

Paxinos G., & Watson C. (2007). The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. Amsterdam: Elsevier.

Pelayo, R., & Guilleminaut, C. G. (2009). History of Sleep Research. En R. Stickgold & M. P. Walker (eds.), *The Neuroscience of Sleep* (pp. 3-10). San Diego, CA: Academic Press.

Pertwee, R. G. (2012). Targeting the endocannabinoid system with cannabinoid receptor agonists: pharmacological strategies and therapeutic possibilities. *Philosophical Transactions of the Royal Society Series B: Biological Sciences*, 367(1607), 3353-63.

Pertwee, R. G. (2006). Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. *British Journal of Pharmacology*, 147 Suppl 1: S163-71.

Pertwee, R. G. (2008). Ligands that target cannabinoid receptors in the brain: from THC to anandamide and beyond. *Addiction Biology*, 13(2), 147-59. doi:

10.1111/j.1369-1600.2008.00108.x.

Peyron, C., Tighe, D. K., van den Pol, A. N., de Lecea, L., Heller, H. C., Sutcliffe, J. G., & Kilduff, T. S. (1998). Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *Journal of Neuroscience*, *18*(23), 9996-10015.

Pollock, M. S., & Mistlberger, R. E. (2003). Rapid eye movement sleep induction by microinjection of the GABA-A antagonist bicuculline into the dorsal subcoeruleus area of the rat. *Brain Research*, *962*(1-2), 68-77.

Porter, A. C., Sauer, J. M., Knierman, M. D., Becker, G. W., Borna, M. J., Bao, J., Nomikos, G. G., Carter, P., Bymaster, F. P., Leese, A. B., & Felder, C. C. (2001). Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *301*(3), 1020-1024.

Prescott, S. M., & Majerus, P. W. (1983). Characterization of 1, 2 diacylglycerol hydrolysis in human platelets. Demonstration of an arachidonoyl-monoacylglycerol intermediate. *Journal of Biological Chemistry*, *258*, 764-9.

Presse, F., Nahon, J. L., Fischer, W. H., & Vale, W. (1990). Structure of the human melanin-concentrating hormone mRNA. *Molecular Endocrinology*, *4*, 632-637.

Prospéro-García, O., Herrera-Solís, A., Méndez-Díaz, M., Ruiz-Contreras, A. E., & Pérez-Morales, M. (2009). Modulación del sueño por endocannabinoides. *Avances de la Medicina del Sueño en Latinoamérica*, *1*, 6-13.

Prospéro-García, O., & Méndez-Díaz, M. (2004). The role of neuropeptides in sleep modulation. *Drug News & Perspectives*, *17*(8), 518-22.

Prospéro-García, O., Méndez-Díaz, M., Alvarado Capuleño, I., Pérez Morales, M., López Juárez, J., & Ruiz Contreras, A. E. (2013). Inteligencia para la alimentación,

alimentación para la inteligencia. *Salud Mental*, 36(2), 101-107.

Prospéro-García, O., Miller, D. R., & Henriksen, S. J. (1993). Hippocampal interneuron activity in unanesthetized rats: relationship to the sleep-wake cycle. *Neuroscience Letters* 156(1-2), 158-62.

Ralevic, V. (2003). Cannabinoid modulation of peripheral autonomic and sensory neurotransmission. *European Journal of Pharmacology*, 472(1-2), 1-21.

Rechtschaffen, A., & Kales, A. (1968). A manual of standardized terminology, techniques and scoring system of sleep stages in human subjects. Los Ángeles: Brain Information Service / Brain Research Institute, University of California.

Reyes Prieto, N. M., Romano López, A., Pérez Morales, M., Pech, O., Méndez-Díaz, M., Ruiz-Contreras, A. E., & Prospéro-García, O. (2012). Oleamide restores sleep in adult rats that were subjected to maternal separation. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 103(2), 308-12.

Richard, J. M., Plawecki, A. M., & Berridge, K. C. (2013). Nucleus accumbens GABAergic inhibition generates intense eating and fear that resists environmental retuning and needs no local dopamine. *European Journal of Neuroscience*, 37(11), 1789-802.

Riedel, G., & Davies, S. N. (2005). Cannabinoid function in learning, memory and plasticity. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 168, 445-77.

Robert, C., Guilpin, C., & Limoge, A. (1999). Automated sleep staging systems in rats. *Journal of Neuroscience Methods*, 88(2), 111-122.

Rolls, A., Schaich Borg, J., & de Lecea, L. (2010). Sleep and metabolism: role of hypothalamic neuronal circuitry. *Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism*, 24(5), 817-28.

Rodríguez de Fonseca, F., Del Arco, I., Martín-Calderón, J. L., Gorriti, M. A., & Navarro, M. (1998). Role of the endogenous cannabinoid system in the regulation of motor activity. *Neurobiology of Disease*, *5*(6Pt B), 483-501.

Rosselli-Reh fuss, L., Mountjoy, K. G., Robbins, L. S., Mortrud, M. T., Low, M. J., Tatro, J. B., Entwistle, M. L., Simerly, R. B., Cone, R. D. (1993). Identification of a receptor for gamma melanotropin and other proopiomelanocortin peptides in the hypothalamus and limbic system. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, *90*(19), 8856-8860.

Rueda-Orozco, P. E., Soria-Gómez, E., Montes-Rodríguez, J. C., Pérez-Morales, M., & Prospéro-García, O. (2010). Intrahippocampal administration of anandamide increases REM sleep. *Neuroscience Letters*, *473*(2), 158-162.

Salamone, J. D., McLaughlin, P. J., Sink, K., Makriyannis, A., & Parker, L. A. (2007). Cannabinoid CB₁ receptor inverse agonists and neutral antagonists: Effects on food intake, food-reinforced behavior and food aversions. *Physiology & Behavior*, *91*, 383-88.

Sainsbury, A., Cooney, G. J., & Herzog, H. (2002). Hypothalamic regulation of energy homeostasis. *Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism*, *16*(4), 623-37.

Saito, Y., & Nagasaki, H. (2008). The melanin-concentrating hormone system and its physiological functions. *Results and Problems in Cell Differentiation*, *46*, 159-179.

Saito, Y., Nothacker, H. P., Wang, Z., Lin, S. H., Leslie, F., & Civelli, O. (1999). Molecular characterization of the melanin-concentrating hormone receptor. *Nature*, *400*(6741), 265-9.

Sak, J., & Grzybowski, A. (2012). Brain and aviation: on the 80th anniversary of Constantin von Economo's (1876-1931) death. *Neurological Sciences, 34*(3), 387-391.

Sakai, K. (1985). Neurons responsible for paradoxical sleep. En A. Wauquier, J. M. Monti, J. M. Gaillard, & M. Radulovacki (eds.), *Sleep: Neurotransmitters and Neuromodulators* (pp. 29-42). New York, NY: Janssen Research Foundation, Raven Press.

Sakurai, T. (2007). The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. *Nature Reviews Neuroscience, 8*(3), 171-81.

Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R. M., Tanaka, H., Williams, S. C., Richardson, J. A., Koslowski, G. P., Wilson, S., Arch, J. R., Buckingham, R. E., Haynes, A. C., Carr, S. A., Annan, R. S., McNulty, D. E., Liu, W. S., Terret, J. A., Elshourbagy, N. A., Bergsma, D. J., & Yanagisawa, M. (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell, 92*(4), 573-85.

Sanford, L. D., Tang, X., Xiao, J., & Ross, R. J. (2003). GABAergic regulation of REM Sleep in Reticularis Pontis Oralis and Caudalis in rats. *Journal of Neurophysiology, 90*(2), 938-45.

Sánchez, M., Baker, B. I., & Celis, M. (1997). Melanin-concentrating hormone (MCH) antagonizes the effects of α -MSH and neuropeptide E-I on grooming and locomotor activities in the rat. *Peptides, 18*(3), 393-6.

Santucci, V., Storme, J. J., Soubrié, P., & Le Fur, G. (1996). Arousal-enhancing properties of the CB1 cannabinoid receptor antagonist SR141716A in rats as assessed by electroencephalographic spectral and sleep-waking cycle analysis.

Life Sciences, 58(6), PL 103-110.

Saper, C. B. (2004). IV. Diencephalon, basal ganglia and amygdala. Hypothalamus. En G. Paxinos, & J. K. Mai (eds.), *The Human Nervous System* (pp. 514-50). San Diego, CA: Academic Press.

Saper, C. B., Chou, T. C., & Elmquist, J. K. (2002). The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. *Neuron*, 36, 199-211.

Saper, C. B., Scammell, T. E., & Lu, J. (2005). Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature*, 437(7063), 1257-63.

Saper, C. B., Swanson, L. W., & Cowan, W. M. (1979). An autoradiographic study of the efferent connections of the lateral hypothalamic area in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 183(4), 689-706.

Sartin, J. L., Dyer, R., Matteri, D., Buxton, F., Buonomo, M., Shores, J., Baker, J. A. (2001). Effect of intracerebroventricular orexin-B on food intake in sheep. *Journal of Animal Science*, 79, 1573-77.

Satoh, S., Matsumura, H., Kanbayashi, T., Yoshida, Y., Urakami, T., Nakajima, T., Kimura, N., Nishino, S., & Yoneda, H. (2006). Expression pattern of FOS in orexin neurons during sleep induced by an adenosine A2A receptor agonist. *Behavioural Brain Research*, 170(2), 277-86.

Savage, V. M., & West, G. B. (2007). A quantitative, theoretical framework for understanding mammalian sleep. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(3), 1051-1056.

Savinianen, J. R., Saario, S. M., & Laitinen, J. T. (2012). The serine hydrolases MAGL, ABHD6 and ABHD12 as guardians of 2-arachidonoylglycerol signaling through cannabinoid receptors. *Acta Physiologica (Oxford)*, 204(2), 267-76.

Sawchenko, P. E., Swanson, L. W., Rivier, J., & Vale, W. W. (1985). The distribution of growth-hormone-releasing-factor (GRF) immunoreactivity in the central nervous system of the rat: An immunohistochemical study using antiser directed against rat hypothalamic GRF. *Journal of Comparative Neurology*, 237, 110-115.

Schierenbeck, T., Riemann, D., Berger, M., & Hornyak, M. (2008). Effect of illicit recreational drugs upon sleep: cocaine, ecstasy and marijuana. *Sleep Medicine Reviews*, 12(5), 381-9.

Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, Jr. D., Seeley, R. J., & Baskin, D. G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404, 661-671.

Schwarz, P. B., Yee, N., Mir, S., & Peever, J. H. (2008). Noradrenaline triggers muscle tone by amplifying glutamate-driven excitation of somatic motoneurons in anaesthetized rats, *Journal of Physiology*, 586, 5787-5802.

Seeley, R. J. (2004). Our evolving understanding of peptides and the control of food intake. En E. Stricker & S. Woods (eds.), *Neurobiology of food and fluid intake. Handbook of Behavioral Neurology* (pp. 111-126). New York, NY: Plenum Publishers.

Seif, T., Makriyannis, A., Kunos, G., Bonci, A., & Hopf, F. W. (2011). The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol mediates D1 and D2 receptor cooperative enhancement of rat nucleus accumbens core neuron firing. *Neuroscience*, 193, 21-33.

Sewell, R. A., Schnakenberg, A., Elander, J., Radhakrishnan, R., Williams, A., Skosnik, P. D., Pittman, B., Ranganathan, M., & D'Souza, D. C. (2013). Acute effects of THC on time perception in frequent and infrequent cannabis users.

Psychopharmacology, 226(2), 401-13. doi: 10.1007/s00213-012-2915-6.

Sherin, J. E., Shiromani, P. J., McCarley, R. W., & Saper, C. B. (1996). Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. *Archives of Neurology*, 53(2), 180-4.

Shi, Y. (2004). Beyond skin color: emerging roles of melanin-concentrating hormone in energy homeostasis and other physiological functions. *Peptides*, 25, 1605-1611.

Shibahara, M., Sakurai, T., Nambu, T., Takenouchi, T., Iwaasa, H., Egashira, S., Ihara, M., & Goto, K. (1999). Structure, tissue distribution, and pharmacological characterization of *Xenopus* orexins. *Peptides*, 20, 1169-76.

Shibata, S., Oomura, Y., & Kita, H. (1982). Ontogenesis of glucose sensitivity in the rat lateral hypothalamus: a brain slice study. *Developmental Brain Research*, 5, 114-17.

Shimizu, N., Chikahisa, S., Kitaoka, K., Nishino, S., & Sei, H. (2011). Refeeding after a 24-hour fasting deepens NREM sleep in a time-dependent manner. *Physiology & Behavior*, 104(3), 480-7.

Shiromani, P., Siegel, J. M., Tomaszewsky, K. S., & McGinty, D. J. (1986). Alterations in blood pressure and REM sleep after pontine carbachol microinfusion. *Experimental Neurology*, 91, 285-92.

Siegel, J. M. (2005). Clues to the functions of mammalian sleep. *Nature*, 437(7063), 1264-71.

Siegel, J. M. (2011). REM sleep: A biological and psychological paradox. *Sleep Medicine Reviews*, 15(3), 139-42.

Siegel, J. M., Moore, R., Thannickal, T., & Nienhuis, R. (2001). A brief history of hypocretin/orexin and narcolepsy. *Neuropsychopharmacology*, 25(5 Suppl), S14-

20.

Sirieix, C., Gervasoni, D., Luppi, P. H., & Leger, L. (2012). Role of the lateral paragigantocellular nucleus in the network of paradoxical (REM) sleep: an electrophysiological and anatomical study in the rat. *PLoS One*, 7:e28724.

Sitaram, N., Mendelson, W. B., Wyatt, R. J., & Gillin, J. C. (1977). The time-dependent induction of REM sleep and arousal by physostigmine infusion during normal human sleep. *Brain Research*, 122, 562-567.

Soria-Gómez, E., Guzmán, K., Pech-Rueda, O., Montes-Rodríguez, C. J., Cisneros, M., & Prospéro-García, O. (2010). Oleoylethanolamide affects food intake and sleep-waking cycle through a hypothalamic modulation. *Pharmacological Research*, 61(5), 379-84.

Soria-Gómez, E., Márquez-Diosdado, M. I., Montes-Rodríguez, C. J., Estrada-González, V., & Prospéro-García, O. (2010). Oleamide administered into the nucleus accumbens Shell regulates feeding behavior via CB₁ and 5HT-_{2C} receptors. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 13, 1247-1254.

Soria-Gómez, E., Matias, I., Rueda-Orozco, P. E., Cisneros, M., Petrosino, S., Navarro, L., Di Marzo, V., & Prospéro-García, O. (2007). Pharmacological enhancement of the endocannabinoid system in the nucleus accumbens shell stimulates food intake and increases c-Fos expression in the hypothalamus. *British Journal of Pharmacology*, 151, 1109-1116.

Stanley, B. G., Ha, L. H., Spears, L. C., Dee, M. G. 2nd (1993). Lateral hypothalamic injections of glutamate, kainic acid, D, L-alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazole propionic acid or N-methyl-D-aspartic acid rapidly elicit intense transient eating in rats. *Brain Research*, 613(1), 88-95.

Stanley, B. G., Urstadt, K. R., Charles, J. R., & Kee, T. (2011). Glutamate and GABA in lateral hypothalamic mechanisms controlling food intake. *Physiology & Behavior*, *104*(1), 40-6.

Starowicz, K. M., Cristino, L., Matias, I., Capasso, R., Racioppi, A., Izzo, A. A., & Di Marzo, V. (2008). Endocannabinoid dysregulation and adipose tissue of mice fed with a high fat diet. *Obesity*, *16*, 553-565.

Steininger, T. L., Kilduff, T. S., Behan, M., Benca, R. M., & Landry, C. F. (2004). Comparison of hypocretin/orexin and melanin-concentrating hormone neurons and axonal projections in the embryonic and postnatal rat brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *27*(3), 165-81.

Stella, N., Schweitzer, P., & Piomelli, D. (1997). A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*, *338*, 773-778.

Steriade, M. (2005). Sleep and neuronal plasticity: cellular mechanisms of corticothalamic oscillations. In P. H. Luppi (ed.), *Sleep: Circuits and Functions* (pp. 1-23). Florida: CRC Press.

Sternson, S. M. (2013). Hypothalamic survival circuits: blueprints for purposive behaviors. *Neuron*, *77*(5), 810-24.

Stratford, T. R., & Kelley, A. E. (1997). GABA in the nucleus accumbens shell participates in the central regulation of feeding behavior. *Journal of Neuroscience*, *17*(11), 4434-40.

Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A., & Waku, K. (1995). 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, *215*, 89-97.

Sugiura, T., & Waku, K. (2000). 2-Arachidonoylglycerol and cannabinoid receptors. *Chemistry & Physics of Lipids*, 108(1-2), 89-106.

Sutton, G. M., Perez-Tilve, D., Nogueiras, R., Fang, J., Kim, J. K., Cone, R. D., Gimble, J. M., Tschöp, M. H., & Butler, A. A. (2008). The melanocortin-3 receptor is required for entrainment to meal intake. *Journal of Neuroscience*, 28(48), 12946-12955. doi:10.1523/JNEUROSCI.3615-08.2008

Šušić, V., Maširević, G., & Totić, S. (1986). The effects of delta-sleep-inducing peptide (DSIP) on wakefulness and sleep patterns in the cat. *Brain Research*, 414, 262-270.

Sviženská, I., Dubový, P., & Šulcová, A. (2008). Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures – A short review. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 90, 501-511.

Swanson, L. W. (1998). *Brain Maps: Structure of the Rat Brain – A Laboratory Guide with Printed and Electronic Templates for Data, Models, and Schematics*, second revised ed. Elsevier, New York.

Swartz, B. E., & Goldensohn, E. S. (1998). Timeline of the history of EEG and associated effects. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 106(2), 173-6.

Szentirmai, E., & Krueger, J. M. (2006). Central administration of neuropeptide Y induces wakefulness in rats. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 291(2), R473-80.

Szymusiak, R., & McGinty, D. (2008). Hypothalamic regulation of sleep and arousal. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1129, 275-86.

Szymusiak, R., & McGinty, D. (1986). Sleep-related neuronal discharge in the basal forebrain of cats. *Brain Research*, 370(1), 82-92.

Takahashi, K., Kayama, Y., Lin, J. S., & Sakai, (2010). Locus coeruleus neuronal activity during the sleep-waking cycle in mice. *Neuroscience*, 169, 1115-1126.

Takeuchi, E. (1970). Polygraphical study on the wakefulness-sleep cycle of the rat. *Shinrigaku kenkyu. Japanese Journal of Physiology*, 41(5), 248-256.

Tallam, L. S., Stec, D. E., Willis, M. A., da Silva, A. A., & Hall, J. E. (2005). Melanocortin-4 receptor-deficient mice are not hypertensive or salt-sensitive despite obesity, hyperinsulinemia, and hyperleptinemia. *Hypertension*, 46(2), 326-332. doi: 10.1161/01.HYP.0000175474.99326.bf

Tan, C. P., Sano, H., Iwaasa, H., Pan, J., Sailer, A. W., Hreniuk, D. L., Feighner, S. D., Palyha, O. C., Pong, S. S., Figueroa, D. J., Austin, C. P., Jiang, M. M., Yu, H., Ito, J., Ito, M., Guan, X. M., MacNeil, D. J., Kanatani, A., Van der Ploeg, L. H., & Howard, A. D. (2002). Melanin-concentrating hormone receptor subtypes 1 and 2: species-specific gene expression. *Genomics* 79(6), 785-92.

Tanimura, A., Yamazaki, M., Hashimotodani, Y., Uchigashima, M., Kawata, S., Abe, M., Kita, Y., Hashimoto, K., Shimizu, T., Watanabe, M., Sakimura, K., & Kano, M. (2010). The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol produced diacylglycerol lipase alpha mediates retrograde suppression of synaptic transmission. *Neuron*, 65, 320-327.

Thakkar, M. M. (2011). Histamine in the regulation of wakefulness. *Sleep Medicine Reviews*, 15(1), 65-74.

Thannickal, T. C., Moore, R. Y., Nienhuis, R., Ramanathan, L., Gulyani, S., Aldrich, M., Cornford, M., & Siegel, J. M. (2000). Reduced number of hypocretin neurons in

human narcolepsy. *Neuron* 27, 469-474.

Torterolo, P., Sampogna, S., & Chase, M. (2009). MCHergic projections to the nucleus pontis oralis participate in the control of active (REM) sleep. *Brain Research*, 1268, 76-87.

Triarhou, L.C. (2006). The signalling contributions of Constantin von Economo to basic, clinical and evolutionary neuroscience. *Brain Research Bulletin*, 69(3), 223-43.

Tsou, K., Brown, S., Sañudo-Peña, M. C., Mackie, K., & Walker, J. M. (1998). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 83(2), 393-411.

Tsunematsu, T., Kilduff, T. S., Boyden, E. S., Takahashi, S., Tominaga, M., & Yamanaka, A. (2011). Acute optogenetic silencing of orexin/hypocretin neurons induces slow-wave sleep in mice. *Journal of Neuroscience*, 31(29), 10529-39. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0784-11.2011.

Torterolo, P., Sampogna, S., Morales, F. R., & Chase, M. H. (2006). MCH-containing neurons in the hypothalamus of the cat: searching for a role in the control of sleep and wakefulness. *Brain Research*, 1119(1), 101-14.

Ushakov, A., Gong, H., McGinty, D., & Szymusiak, R. (2006). Sleep-active neurons in the preoptic area project to the hypothalamic paraventricular nucleus and perifornical lateral hypothalamus. *European Journal of Neuroscience*, 23, 3284-3296.

Vaccarino, F. J., Bloom, F. E., Rivier, J., Vale, W., & Koob, G. F. (1985). Stimulation of food intake in rat by centrally administered hypothalamic growth hormone-releasing factor. *Nature*, 314, 167-168.

Van Sickle, M. D., Duncan, M., Kingsley, P. J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., Stella, N., Makriyannis, A., Piomelli, D., Davison, J. S., Marnett, L. J., Di Marzo, V., Pittman, Q. J., Patel, K. D., & Sharkey, K. A. (2005). Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science*, *310*, 329-32.

Varas, M., Pérez, M., Monzón, M. E., de Barioglio, S. R. (2002). Melanin-concentrating hormone, hippocampal nitric oxide levels and memory retention. *Peptides* *12*, 2213-2221.

Veening, J. G., Te, L. S., Posthuma, P., Geeraedts, L. M., & Nieuwenhuys, R. (1987). A topographical analysis of the origin of some efferent projections from the lateral hypothalamic area in the rat. *Neuroscience*, *22*, 537-51.

Velluti, R., & Hernández-Peón, R. (1963). Atropine blockade within a cholinergic hypnogenic circuit. *Experimental Neurology*, *8*(1), 20-29.

Verret, L., Goutagny, R., Fort, P., Cagnon, L., Salvert, D., Léger, L., Boissard, R., Salin, P., Peyron, C., & Luppi, P. H. (2003). A role for melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. *BioMed Central Neuroscience*, *4*, 19.

Verret, L., Leger, L., Fort, P., & Luppi, P. H. (2005). Cholinergic and noncholinergic brainstem neurons expressing Fos after paradoxical (REM) sleep deprivation and recovery. *European Journal of Neuroscience*, *21*, 2488-2504.

Verty, A. N, Boon, W. M., Mallet, P. E., McGregor, I. S., & Oldfield, B. J. (2009). Involvement of hypothalamic peptides in the anorectic action of the CB₁ receptor antagonist rimonabant (SR141716). *European Journal of Neuroscience*, *29*(11), 2207-16.

Volkoff, H. (2012). Sleep and orexins in nonmammalian vertebrates. *Vitamins & Hormones*, *89*, 315-39.

Warne, J. P., & Xu, A. W. (2013). Metabolic transceivers: in-tune with the central melanocortin system. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *24*(2), 68-75. doi:10.1016/j.tem.2012.10.005

Watson, C. J., Soto-Calderon, H., Lydic, R., & Baghdoyan, H. A. (2008). Pontine reticular formation (PnO) administration of hypocretin-1 increases PnO GABA levels and wakefulness. *Sleep*, *31*(4), 453-64.

Volkoff, H. (2012). Sleep and orexins in nonmammalian vertebrates. *Vitamins & Hormones*, *89*, 315-39. Doi: 10.1016/B978-0-12-394623-2.00017-2.

Vu, T. K., Hung, D. T., Wheaton, D. I., & Coughlin, S. R. (1991). Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, *64*, 1057-1068.

Weinstein, J. R., Gold, S. J., Cunningham, D. D., & Gall, C. M. (1995). Cellular localization of thrombin receptor mRNA in rat (1995). *Journal of Neuroscience*, *15*, 2906-2919.

Williams, C. M., & Kirkham, T. (1999). Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology*, *143*, 315-317.

Williams, R. W., & Rakic, P. (1988). Three-dimensional counting: an accurate and direct method to estimate numbers of cells in sectioned material. *Journal of Comparative Neurology*, *278*, 344-52.

Willie, J. T., Renthal, W., Chemelli, R. M., Miller, M. S., Scammell, T. E., Yanagisawa, M., & Sinton, C. M. (2005). Modafinil more effectively induces wakefulness in orexin-null mice than in wild-type littermates. *Neuroscience* *130*(4),

983-95.

Willie, J. T., Sinton, C. M., Maratos-Flier, E., & Yanagisawa, M. (2008). Abnormal response of melanin-concentrating hormone deficient mice to fasting: hyperactivity and rapid eye movement sleep suppression. *Neuroscience*, *156*, 819-829.

Wilson, R. I., & Nicoll, R. A. (2002). Endocannabinoid signaling in the brain. *Science*, *296*(678), 678-682.

Wood, S. C. & Stricker, D. M. (2008). Food intake and metabolism. En L. R. Squire, D. Berg, F. Bloom, S. du Lac, A. Ghosh & N. Spitzer (eds.), *Fundamental Neuroscience* (pp. 795-888). San Diego: Academic Press.

Wu, M. F., Gulyani, S., Yau, E., Mignot, E., Phan, B., & Siegel, J. M. (1999). Locus coeruleus neurons: cessation of activity during cataplexy. *Neuroscience*, *91*, 1389-1399.

Xi, M. C., Morales, F. R., & Chase, M. H. (1999). A GABAergic system is involved in the control of wakefulness and sleep. *Sleep Research Online*, *2*(2), 43-48.

Xi, Z. X., Peng, X. Q., Li, X., Song, R., Zhang, H. Y., Liu, Q. R., Yang, H. J., Bi, G.H., Li, J., & Gardner, E. L. (2011). Brain cannabinoid CB₂ receptors modulate cocaine's actions of mice. *Nature Neuroscience*, *14*(9), 1160-6. doi: 10.1038/nn.2874.

Yamanaka, A., Tsujino, N., Funahashi, H., Honda, K., Guan, J. L., Wang, Q. P., Tominaga, M., Goto, K., Shioda, S., & Sakurai, T. (2002). Orexins activate histaminergic neurons via the orexin 2 receptor. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, *290*(4), 1237-45.

Yamanaka, A., Sakurai, T., Katsumoto, T., & Yanagisawa, M. (1999). Chronic intracerebroventricular administration of orexin-A to rats increases food intake in

daytime, but has no effect on body weight. *Brain Research*, 849, 248-52.

Yang, S. C., Shieh, K. R., & Li, H. Y. (2005). Cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the nucleus accumbens participates in the regulation of feeding behavior in rats. *Neuroscience*, 133(3), 841-51.

Yoshida, R., Ohkuri, T., Jyotaki, M., Yasuo, T., Horio, N., Yasumatsu, K., Sanematsu, K., Shigemura, N., Yamamoto, T., Margolskee, R. F., & Ninomiya, Y. (2010). Endocannabinoids selectively enhance sweet taste. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(2), 935-939.

Zhang, J., Obál, F. Jr., Zheng, T., Fang, J., Taishi, P., & Krueger, J. M. (1999). Intraoptotic microinjection of GHRH or its antagonist alters sleep in rats. *Journal of Neuroscience*, 19(6), 2187-94.

Zhang, J. H., Sampogna, S., Morales, F. R., & Chase, M. H. (2001). Orexin (hypocretin)-like immunoreactivity in the cat hypothalamus: a light and electron microscopic study. *Sleep*, 24(1), 67-76.

Zygmunt, P. M., Petersson, J., Andersson, D. A., Chuang, H., Sorgard, M., Di Marzo, V., Julius, D., & Högestätt, E. D. (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate de vasodilator action of anandamide. *Nature*, 400, 452-7.

20. Anexos. Artículos que conforman esta Tesis Doctoral.

Anexo 1.

Pérez-Morales M., Alvarado-Capuleño I, López-Colomé A. M., Méndez-Díaz M., Ruiz-Contreras A. E., Prospéro-García O. (2012). Activation of PAR1 in the lateral hypothalamus of rats enhances food intake and REMS through CB1R. *Neuroreport*, 23(14), 814-8.

Anexo 2.

Pérez-Morales M., De La Herrán-Arita A. K., Méndez-Díaz M., Ruiz-Contreras A. E., Drucker-Colín R., Prospéro-García, O. (2013). 2-AG into the lateral hypothalamus increases REM sleep and cFos expression in melanin concentrating hormone neurons in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 108, 1-7.

Activation of PAR1 in the lateral hypothalamus of rats enhances food intake and REMS through CB1R

Marcel Pérez-Morales^a, Ilia Alvarado-Capuleño^a, Ana M. López-Colomé^b,
Mónica Méndez-Díaz^a, Alejandra E. Ruiz-Contreras^c and
Oscar Prospéro-García^a

The activation of protease-activated receptor 1 (PAR1) in cultured rat hippocampal neurons triggers synaptic retrograde signaling through the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol, thereby activating the cannabinoid receptor 1 (CB1R). CB1R is a metabotropic receptor activated by marijuana and endocannabinoids that suppresses neurotransmitter release. Also, activation of the CB1R increases rapid eye movement sleep (REMS) and food intake. The lateral hypothalamus is a crucial structure to modulate both feeding and waking. To evaluate the effect of PAR1 stimulation in the lateral hypothalamus on food intake and on the sleep–waking cycle, we implanted rats with electrodes, for recording sleep, and cannulae, to administer S1820, a selective PAR1 agonist peptide, bilaterally into the lateral hypothalamus. To determine whether the effects induced by PAR1 stimulation were mediated by CB1R activation, we administered AM251, a CB1R inverse agonist, to block S1820 effects. Our results show that the stimulation of PAR1 into the lateral hypothalamus increases both food intake and REMS and such effects were prevented by AM251,

indicating that PAR1 modulates both food intake and the sleep–waking cycle, in the lateral hypothalamus, through CB1R activation. This study shows novel behavioral changes induced by PAR1 activation and further supports the notion that endocannabinoids are food intake and REMS promoters. *NeuroReport* 00:000–000 © 2012 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

NeuroReport 2012, 00:000–000

Keywords: cannabinoid receptor 1, food intake, lateral hypothalamus, melanin-concentrating hormone, orexins/hypocretins, protease-activated receptor 1, rapid eye movement sleep

^aLaboratory of Cannabinoids, Department of Physiology, School of Medicine, ^bNeuroscience Division, Institute of Cellular Physiology and ^cLaboratory of Cognitive Neurogenomics, National Autonomous University of México (UNAM), DF, México

Correspondence to Oscar Prospéro-García, Department of Physiology, School of Medicine, National Autonomous University of México (UNAM), P.O. Box 70-250, DF 04510, México
Tel: +52 55 623 2509; fax: +52 55 623 2241; e-mail: opg@unam.mx

Received 17 May 2012 accepted 21 June 2012

Introduction

Experimental studies have reported the existence of proteinase-activated receptors (PAR1–4) [1], activated by the proteolytic removal of an N-terminal sequence, carried by serine/threonine proteinases such as thrombin, trypsin, and tryptase [2]. These receptors are broadly distributed in the brain, including the lateral hypothalamus [3]. It has been shown recently that PAR1 activation by thrombin-induced proteolysis or by selective peptide agonists in cultured rat hippocampal neurons suppresses inhibitory postsynaptic currents (IPSCs). Such IPSCs were blocked by AM251, a cannabinoid receptor 1 (CB1R) inverse agonist, and by an inhibitor of diacylglycerol lipase, the enzyme responsible for 2-arachidonoylglycerol [2-AG, an endocannabinoid (eCB)] synthesis. Similarly, diacylglycerol lipase knockout mice did not develop IPSCs after PAR1 stimulation [4], indicating that this effect is mediated by eCBs. These molecules are the endogenous ligands of CB1R and CB2R, and mimic the effects induced by Δ -9 tetrahydrocannabinol, the primary psychoactive constituent of *cannabis sativa* [5]. Both eCBs, arachidonylethanolamine (anandamide) and 2-AG, increase food intake in rats, after its systemic [6] or intraparenchymal administration

[7,8], and this effect is blocked by SR141716A, another CB1R inverse agonist [9]. It is also known that eCBs are hypnogenic molecules. For example, systemic administration of SR141716A increases wakefulness (W) while reducing both slow wave sleep (SWS) and rapid eye movement sleep (REMS) [10]. Similarly, intracerebroventricular administration of this CB1R inverse agonist prevents REMS rebound [11] in rats. Acute [12] or subchronic [13] intracerebroventricular, or intrahippocampal [14], administration of anandamide or oleamide (another eCB) also increases REMS. In addition, the lateral hypothalamus has been described to be an important area of the brain regulating food intake [15] and sleep [16], and includes neurons synthesizing orexins/hypocretins [17,18] and melanin-concentrating hormone (MCH) [19] peptides, which have been involved in food intake and sleep modulation [20,21]. It has been shown in in-vitro studies that CB1R activation in the lateral hypothalamus inhibits orexinergic/hypocretinergic – and activates MCHergic – neurons [22]. In this context, we aimed to evaluate the effects of activating PAR1 by S1820, a selective PAR1 agonist peptide, in the lateral hypothalamus on food intake and on the sleep–waking cycle, in rats. In addition, we

examined whether these effects were mediated by CB1R, by blocking this receptor with AM251.

Materials and methods

Subjects

Male Wistar rats (250–300 g) were housed individually in Plexiglas (Cipquim, DF, México) cages with wood chip bedding, and maintained under a reversed dark–light cycle (12:12; lights ON at 8:00 p.m.) at a constant environmental temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) and food and water *ad libitum*. Rats remained in these home cages throughout the experiments, including during the sleep–waking cycle recordings, as the home cages were placed in the sleep chambers. Animals were gently habituated to manipulation for 3 days, 1 h each, before the beginning of experiments, and were handled according to the Public Health Service Policy of Human Care and Use of Laboratory Animals and the Ethics Committee guidelines of the Facultad de Medicina (NOM-062-ZOO-1999), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Drugs

PAR1 selective activating peptide, S1820, was obtained from Sigma-Aldrich (DF, México; CAS number: 141923-40-2). CB1R inverse agonist AM251 was obtained from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, Michigan, USA; catalog number: 71670). The vehicle for S1820 was saline solution. Dimethyl sulfoxide (100%) was used to dissolve AM251. In all cases, all drugs were dissolved in a final volume of 0.5 μl , and were administered at the beginning of the dark phase of the cycle. Administration of drugs was performed using an infusion pump (KD Scientific, Holliston, Massachusetts, USA) and 30-G injectors, which protruded 1 mm from the end of the guide cannula, at a rate of 0.1 $\mu\text{l}/\text{min}$. After the infusions ended, injectors were kept in place for 1 more min to prevent outflow.

Surgery

Rats under anesthesia (cocktail: 66 mg/kg ketamine; 0.26 mg/kg xylazine; 1.3 mg/kg acepromazine) were bilaterally implanted with a 23-G stainless-steel guide cannulae aimed at the lateral hypothalamus ($P = 1.8$; $L = \pm 2$; $V = -6.6$; reference to Bregma, according to Paxinos and Watson [23]), for drug administration, and, additionally, for sleep–waking cycle recording experiments, with a set of electrodes for polysomnographic recordings that was affixed to the rats' skull with dental acrylic to record EEG and EMG, as described previously [24]. Guide cannulae were affixed to the rats' skull with dental cement and sealed with stylets to maintain their patency. Stylets also protruded 1 mm from the end of the guide cannula. Rats were allowed to recover from surgery for 10 days. Three sleep–waking cycle phases were identified visually and scored off-line: W, SWS, and REMS [24]. Sleep recordings were captured and analyzed using the commercially available Icelus software (Mark Opp, Ann Arbor, Michigan, USA).

Sleep–waking cycle experiments

Rats were habituated to the sleep chambers for 24 h before drug administration. Vehicle, S1820 (10 or 100 ng), or CB1R inverse agonist AM251 (1.4 μg) alone or 15 min before S1820 (10 ng), were administered bilaterally into the lateral hypothalamus to separate groups of rats ($n = 10$, each) and then recordings of the sleep–waking cycle began for the next 12 h. Total time of W, SWS, and REMS was calculated in three blocks of 4 h, and the total of 12 h. Latencies to SWS (time to first SWS episode from the beginning of recording) and to REMS (time to first REMS episode from the first SWS episode), and bout frequency for each sleep–waking cycle phase were also calculated.

Food intake experiments

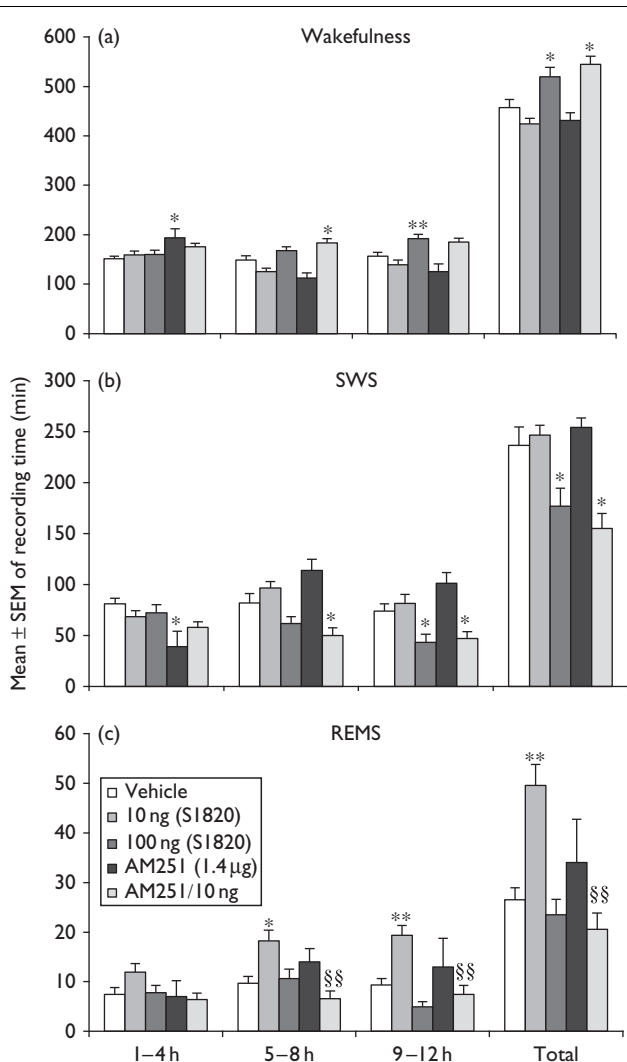
Independent groups of rats ($n = 10$ each) were administered vehicle bilaterally into the lateral hypothalamus, 10 or 100 ng of S1820, or AM251 (1.4 μg) alone or 15 min before S1820 (100 ng). The amount of food intake was quantified every hour for the next 4 h, and for 24 h after injection, from a preweighed amount of regular laboratory chow pellets, and corrected for spillage. Upon completion of the experiments, rats were perfused transcardially with 200 ml of PBS and 200 ml of 4% paraformaldehyde, and their brains were extracted and prepared for histological analysis with cresyl violet staining to verify the correct placement of the cannulae. Rats with misplaced cannulae were discarded. Results are reported as mean \pm standard error of the mean (SEM). Significant differences were determined using a one-way analysis of variance test and the Bonferroni (post-hoc) test; P value less than 0.05 was considered statistically significant (otherwise as indicated).

Results

Sleep–waking cycle experiments

A volume of 10 ng of S1820, administered into the lateral hypothalamus, significantly increased REMS for the 12 h of recording [$F(2,27) = 17.821$, $P < 0.001$], as a result of a significant augmentation in the second (5–8 h) and third (9–12 h) blocks [$F(2,27) = 6.479$, $P = 0.005$; $F(2,27) = 25.064$, $P < 0.001$, respectively] (Fig. 1c). It also induced a nonsignificant decrease in the total time of W (Fig. 1a), and did not induce changes in SWS total 12 h of recording (Fig. 1b), but increased SWS bout frequency [$F(2,27) = 9.882$, $P < 0.001$] and reduced SWS bout duration [$F(2,27) = 5.372$, $P = 0.011$] (Table 1). Interestingly, the PAR1-induced increase in REMS was prevented by the CB1R inverse agonist AM251, as shown in the second (5–8 h) [$F(2,27) = 12.172$, $P < 0.001$] and third (9–12 h) [$F(2,27) = 14.208$, $P < 0.001$] blocks, and in the total of 12 h of recording [$F(2,27) = 19.687$, $P < 0.001$] (Fig. 1c). The increase in REMS total time was because of a significant increase in REMS bout frequency [$F(2,27) = 18.882$, $P < 0.001$], which was also prevented by AM251 [$F(2,27) = 19.683$, $P < 0.001$] (Table 1). Similarly, 10 ng

Fig. 1



Effects of the administration of S1820 (10 and 100 ng), protease-activated receptor 1 agonist, bilaterally into the lateral hypothalamus on the sleep-waking cycle. S1820 (10 ng) significantly increased rapid eye movement sleep (REMS) in the second (5–8 h) and third (9–12 h) blocks, and in the total 12 h of recording (c), and induced a nonsignificant decrease in the total time of W (a). Importantly, the effect induced by S1820 (10 ng) on REMS was blocked by AM251 (c). A volume of 100 ng of S1820 did not induce changes in REMS, but increased W in the third (9–12 h) block and in the total 12 h of recording (a) and reduced slow wave sleep (SWS) in the third (9–12 h) block and in the total of 12 h of recording (b). AM251 alone increased W and reduced SWS in the first (1–4 h) block (a, b). AM251 15 min before 10 ng of S1820 increased W in the second (5–8 h) and in the total of 12 h of recording (a), and reduced SWS in the second (5–8 h) and third (9–12 h) blocks and in the total of 12 h of recording (b). * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ vs. vehicle; §§ $P < 0.05$, §§§ $P < 0.001$ vs. 10 ng.

significantly shortened latencies for both SWS [$F(2,27) = 6.533, P = 0.005$] and REMS [$F(2,27) = 5.261, P = 0.012$] (Table 1). In contrast, 100 ng produced a significant increase in W, as shown in the third (9–12 h) [$F(2,27) = 9.723, P < 0.001$] block and in the total of 12 h of recording [$F(2,27) = 9.046, P = 0.032$] (Fig. 1a), and reduced SWS in the third (9–12 h) [$F(2,27) = 6.342,$

$P = 0.037$] block and in the total of 12 h of recording [$F(2,27) = 5.808, P = 0.036$] (Fig. 1b). These changes were accompanied by a significant increase in the W bout frequency [$F(2,27) = 28.193, P < 0.001$] and a reduction in SWS bout duration [$F(2,27) = 5.372, P < 0.01$], respectively (Table 1). A volume of 1.4 µg of AM251 administered alone lengthened latency to both SWS [$F(2,27) = 39.586, P < 0.001$] and REMS [$F(2,27) = 17.576, P < 0.001$] (Table 1), but did not promote changes in the quantity of REMS (Fig. 1c). As this dose did not induce effects on REMS, we decided to use it to evaluate whether the effects induced by 10 ng of S1820 on REMS were mediated by CB1R activation. AM251 alone, in the first (1–4 h) block of recording, increased significantly W [$F(2,27) = 6.221, P = 0.008$] (Fig. 1a), at the cost of a significant reduction in SWS [$F(2,27) = 7.700, P = 0.003$] (Fig. 1b). These changes were accompanied by a significant increase in the W bout frequency [$F(2,27) = 26.146, P < 0.001$] and a significant reduction in the W bout duration [$F(2,27) = 12.594, P < 0.001$] (Table 1). AM251 administered 15 min before 10 ng of S1820 significantly increased W in the second (5–8 h) block [$F(2,27) = 12.339, P = 0.025$], and in the total of 12 h of recording [$F(2,27) = 11.556, P = 0.002$] (Fig. 1a), and reduced significantly SWS in the second (5–8 h) [$F(2,27) = 10.743, P = 0.035$] and third (9–12 h) [$F(2,27) = 10.903, P = 0.089$] blocks, and in the total of 12 h of recording [$F(2,27) = 10.349, P = 0.003$] (Fig. 1b). These changes were accompanied by a significant increase in the W bout frequency [$F(2,27) = 9.670, P = 0.013$] and a slight nonsignificant decrease in SWS bout frequency (Table 1).

Food intake experiments

A volume of 100 ng of S1820 administered into the lateral hypothalamus significantly increased food intake 1 h after administration [$F(2,27) = 4.730, P = 0.025$] (Fig. 2), but nonsignificant changes were detected 4 h after the injection or 24 h (data not shown). A volume of 1.4 µg of AM251 administered alone did not induce changes in food intake, and when it was administered before 100 ng, the hyperphagia induced by this drug was prevented [$F(2,27) = 4.621, P = 0.022$] (Fig. 2). A volume of 10 ng of S1820 did not induce changes in food intake (Fig. 2).

Discussion

For the very first time, we have shown that PAR1 stimulation in the lateral hypothalamus modulates both food intake and the sleep-waking cycle in freely behaving animals, and, quite strikingly, through CB1R receptor activation, as indicated by the prevention of these effects by the CB1R inverse agonist, AM251 (Fig. 1). Therefore, these findings support the notion that eCBs are part of the cascade triggered by PAR1 activation [4]. Interestingly, 10 ng of S1820 increases REMS, but induces no changes in food intake, whereas 100 ng enhances food intake while increasing W and reducing SWS, but does not modify REMS, which is quite unexpected. It is also

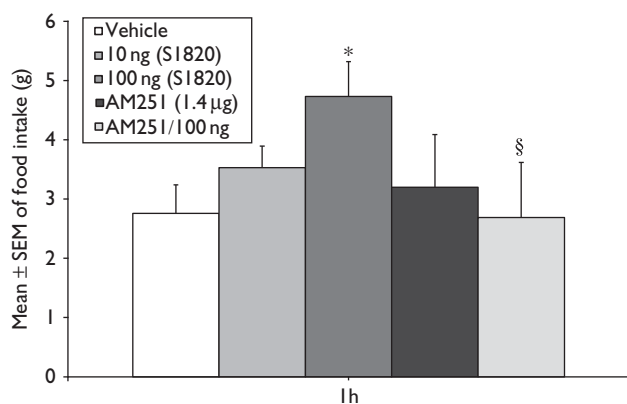
Table 1 Latencies to SWS and REMS, bout frequency, and bout duration for W, SWS, and REMS for S1820, AM251, and AM251 before 10 ng of S1820

	Latencies		Bout frequency			Bout duration		
	SWS	REMS	W	SWS	REMS	W	SWS	REMS
Vehicle	35.542±3.903	25.125±2.822	30±0.919	33.3±1.886	17.1±1.386	15.256±0.452	7.123±0.415	1.571±0.104
10 ng (S1820)	20.364±2.031*	12.152±2.039*	28±0.422	42.5±1.5*	31.7±2.49*	15.155±0.417	5.831±0.222*	1.565±0.0692
100 ng (S1820)	44.683±7.067	21.818±3.713	36±0.907**	31.8±2.072	17±1.8	14.464±0.5	5.547±0.415*	1.351±0.0572
1.4 µg (AM251)	110.914±8.38*	61.154±6.156**	36.8±1.083**	31.6±0.57	24.6±5.11	11.776±0.664**	8.071±0.414	1.379±0.232
1.4 µg/10 ng (AM251/ S1820)	44.393±11.791	20.068±7.345	36.1±2.859*	25.99±3.332	§§14.5±2.564	15.108±0.555	6.082±0.651	1.38±0.187

Data are shown as mean±SEM. A volume of 10 ng shortened significantly latencies to both SWS and REMS, and increased both SWS and REMS bout frequency, but reduced bout duration for SWS. AM251 before 10 ng of S1820 prevented the increase in REMS bout frequency induced by 10 ng. A volume of 100 ng, AM251 alone, and AM251 before 10 ng of S1820, increased W bout frequency. A volume of 10 and 100 ng of S1820 reduced SWS bout duration. AM251 alone lengthened latencies for both SWS and REMS, and increased W bout frequency.

REMS, rapid eye movement sleep; SWS, slow wave sleep; W, wakefulness.

* $P<0.05$, ** $P<0.001$ vs. vehicle; §§ $P<0.001$ vs. 10 ng.

Fig. 2

Effects of the bilateral intralateral hypothalamus stimulation by S1820 (10 and 100 ng), protease-activated receptor 1 agonist, on food intake. A volume of 100 ng significantly increased food intake only during the first hour after injection. AM251 prevented the hyperphagic effect induced by 100 ng of S1820. A volume of 10 ng did not induce changes in food intake. AM251 alone did not induce changes in food intake. * $P<0.05$ vs. vehicle; § $P<0.05$ vs. 100 ng.

interesting that a single dose of AM251 (1.4 µg) prevents S1820 effects. These facts suggest that S1820 may be activating different systems at these two different doses either directly or through 2-AG. However, as AM251 blocks both effects, we believe that they are mediated by eCBs. One possibility is that, as the lateral hypothalamus contains MCHergic neurons that facilitate both REMS [25] and food ingestion, it is reasonable to speculate that these neurons might be affected by an increase in eCB synthesis triggered by PAR1 activation, as has also been suggested by in-vitro studies. However, 100 ng of S1820 may be generating a higher amount of 2-AG that enhances food intake by activating specific subsets of hypothalamic orexigenic molecules, such as neuropeptide Y and the agouti-related peptide from the arcuate hypothalamic nucleus. Hence, it seems feasible that 10 ng may be producing less 2-AG and this eCB may be exciting the REMS-promoting MCHergic neurons in the lateral

hypothalamus. The fact that the effect lasted for 12 h and the latency to sleep was shortened, indicates that this dose of S1820 may induce an inhibition of orexinergic/hypocretinergic neurons by producing 2-AG, thereby, reducing the excitability of the arousal systems [16]. Finally, the fact that the differential effects induced by these two doses were blocked by a single dose of AM251, indicates that they may be dependent on the facilitation of the synthesis, therefore availability, of 2-AG, as has been suggested by in-vitro studies [4]; then, it seems likely that this dose of AM251 suffices to impede the effects on the CB1R, potentially by 2-AG, independent of the S1820 dose. As PAR1 activation has been shown to promote signaling mechanisms, further experiments are required to determine the extent to which PAR1 activation modulates distinct sets of neurons in the lateral hypothalamus, such as the orexinergic/hypocretinergic – and MCHergic – neurons, as well as other neurons within the hypothalamus. It is also interesting that AM251 administered before 10 ng of S1820 increased W at the cost of a reduction in SWS, and the fact that these effects are quite similar to those induced by 100 ng (Fig. 1a and b). It is likely that the combination of these drugs might be activating arousal systems, but further experiments are required to clarify this issue.

Conclusion

The activation of PAR1 in the lateral hypothalamus increases both food intake and REMS, potentially by an indirect activation of the CB1R receptor. This activation might be mediated by 2-AG and possibly by other eCBs not yet studied in this paradigm. The actual involvement of 2-AG in PAR1 effects remains to be established in future studies. However, our present data suggest that PAR1 activation triggers eCBs activity in the lateral hypothalamus, which, in turn, modulates food intake and the sleep–waking cycle.

Acknowledgements

This study was supported by Grants IN220712 and IN217311 from DGAPA UNAM to O.P.G. and to A.E.R., respectively, and Grant 80148 from CONACyT to M.M.D.

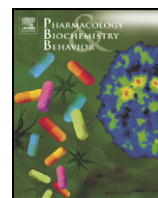
Author contributions: O.P.G. and A.M.L.C. designed the research; M.P.M. and I.A.C. performed the experiments; M.P.M., M.M.D., and A.E.R. carried out data analysis; and M.P.M., O.P.G., and A.M.L.C. wrote the paper.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

References

- Ossovskaia VS, Bunnett NW. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev* 2004; **84**:579–621.
- Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 1991; **64**:1057–1068.
- Weinstein JR, Gold SJ, Cunningham DD, Gall CM. Cellular localization of thrombin receptor mRNA in rat. *J Neurosci* 1995; **15**:2906–2919.
- Hashimoto-dani Y, Ohno-Shosaku T, Yamazaki M, Sakimura K, Kano M. Neuronal protease-activated receptor 1 drives synaptic retrograde signaling mediated by the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *J Neurosci* 2011; **31**:3104–3109.
- Mechoulam R, Fride E, Di Marzo V. Endocannabinoids. *Eur J Pharmacol* 1998; **359**:1–18.
- Martínez-González D, Bonilla-Jaime H, Morales-Otal A, Henriksen SJ, Velázquez-Moctezuma J, Prospéro-García O. Oleamide and anandamide effects on food intake and sexual behavior. *Neurosci Lett* 2004; **364**:1–6.
- Kirkham TC, Williams CM, Fezza F, Di Marzo V. Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *Br J Pharmacol* 2002; **136**:550–557.
- Soria-Gómez E, Matias I, Rueda-Orozco PE, Cisneros M, Petrosino S, Navarro L, *et al.* Pharmacological enhancement of the endocannabinoid system in the nucleus accumbens Shell stimulates food intake and increases c-Fos expression in the hypothalamus. *Br J Pharmacol* 2007; **151**:1109–1116.
- Williams CM, Kirkham TC. Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology* 1999; **143**:315–317.
- Santucci V, Storme JJ, Soubrié P, Le Fur G. Arousal-enhancing properties of the CB1 cannabinoid receptor antagonist SR141716A in rats as assessed by electroencephalographic spectral and sleep-waking cycle analysis. *Life Sci* 1996; **58**:103–110.
- Navarro L, Martínez-Vargas M, Murillo-Rodríguez E, Landa A, Méndez-Díaz M, Prospéro-García O. Potential role of the cannabinoid receptor CB1 in rapid eye movement sleep rebound. *Neuroscience* 2003; **120**:855–859.
- Murillo-Rodríguez E, Cabeza R, Méndez-Díaz M, Navarro L, Prospéro-García O. Anandamide-induced sleep is blocked by SR141716A, a CB1 receptor antagonist and by U73122, a phospholipase C inhibitor. *Neuroreport* 2001; **12**:2131–2136.
- Herrera-Solis A, Vásquez KG, Prospéro-García O. Acute and subchronic administration of anandamide or oleamide increases REM sleep in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2010; **95**:106–112.
- Rueda-Orozco PE, Soria-Gómez E, Montes-Rodríguez JC, Pérez-Morales M, Prospéro-García O. Intrahippocampal administration of anandamide increases REM sleep. *Neurosci Lett* 2010; **473**:158–162.
- Annand BK, Brobeck JR. Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *Yale J Biol Med* 1951; **24**:123–140.
- Lu J, Sherman D, Devor M, Saper CB. A putative flip-flop switch for control of REM sleep. *Nature* 2006; **441**:589–594.
- De Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao XB, Foye PE, Danielson PE, *et al.* The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**:322–327.
- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanak H, *et al.* Orexin and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 1998; **92**:573–585.
- Bittencourt JC, Presse F, Arias C, Peto C, Vaughan J, Nahon JL. The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol* 1992; **319**:218–245.
- Edwards CMB, Abusnana S, Sunter D, Murphy KG, Ghatei MA, Bloom SR. The effect of orexins on food intake: comparison with neuropeptide Y, melanin-concentrating hormone and galanin. *J Neuroendocrinol* 1999; **160**:R7–R12.
- Modirrousta M, Mainville L, BE Jones. Orexin and MCH neurons express c-Fos differently after sleep deprivation vs. recovery and bear different adrenergic receptors. *Eur J Neurosci* 2005; **21**:2807–2816.
- Huang H, Acuna Goycolea C, Li Y, Cheng HM, Obrietan K, van den Pol AN. Cannabinoids excite hypothalamic melanin-concentrating hormone but inhibit hypocretin/orexin neurons: implications for cannabinoid actions on food intake and cognitive arousal. *J Neurosci* 2007; **27**:4870–4881.
- Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Amsterdam: Elsevier; 2007.
- Soria-Gómez E, Guzmán K, Pech-Rueda O, Montes-Rodríguez CJ, Cisneros M, Prospéro-García O. Oleylethanolamide affects food intake and sleep-waking cycle through a hypothalamic modulation. *Pharmacol Res* 2010; **61**:379–384.
- Hassani OK, Lee MG, Jones BE. Melanin-concentrating hormone neurons discharge in a reciprocal manner to orexin neurons across the sleep-wake cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**:2418–2422.



2-AG into the lateral hypothalamus increases REM sleep and cFos expression in melanin concentrating hormone neurons in rats

Marcel Pérez-Morales^a, Alberto K. De La Herrán-Arita^b, Mónica Méndez-Díaz^a, Alejandra E. Ruiz-Contreras^c, René Drucker-Colín^b, Oscar Prospéro-García^{a,*}

^a Grupo de Neurociencias, Laboratorio de Canabinoides, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., Mexico

^b Grupo de Neurociencias, Departamento de Neuropatología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., Mexico

^c Grupo de Neurociencias, Laboratorio de Neurogenómica Cognitiva, Departamento de Psicofisiología, Facultad de Psicología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 January 2013

Received in revised form 2 April 2013

Accepted 11 April 2013

Available online 18 April 2013

Keywords:

Rapid eye movement sleep

2-arachidonoylglycerol

Cannabinoid receptor 1

Lateral hypothalamus

Orexins/hypocretins

Melanin-concentrating hormone

ABSTRACT

Orexins/hypocretins (OX) and melanin-concentrating hormone (MCH) neurons located in the lateral hypothalamus seem to modulate different stages of the sleep–wake cycle. OX are necessary for wakefulness and MCH appears to regulate rapid eye movement sleep (REMS). Likewise, endocannabinoids, the endogenous ligands for cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1R, CB2R), also modulate REMS in rats. Moreover, it has been shown that the activation of the CB1R in the lateral hypothalamus of rats excites MCH neurons while inhibiting OX neurons in *in vitro* preparations. Hence, we assessed the effects of 2-arachidonoylglycerol (2-AG, an endocannabinoid) in the lateral hypothalamus on the sleep–wake cycle of rats. We also utilized the CB1R inverse agonist AM251 to further support the involvement of this receptor, and we performed double immunofluorescence experiments to detect c-Fos, as a marker of neural activation, in OX and in MCH neurons to determine which neurons were activated. Our results indicate that 2-AG increases REMS through CB1R activation, and increases c-Fos expression in MCH neurons. These results suggest that endocannabinoid activation of the CB1R in the lateral hypothalamus, which activates MCH neurons, is one mechanism by which REMS is triggered.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Orexins/hypocretins (OX) and melanin-concentrating hormone (MCH) are peptides synthesized by separate populations of neurons within the perifornical and lateral hypothalamic regions of the brain (Bittencourt et al., 1992; Broberger et al., 1998). OX and MCH peptides were initially described as appetite enhancers in rodents (Della-Zuana et al., 2002; Yamanaka et al., 1999); however, several subsequent studies have indicated that these peptides modulate the sleep–wake cycle (SWC). For example, it has been shown that OX neurons discharge maximally in wakefulness (W) while remaining

silent in both slow wave sleep (SWS) and in rapid eye movement sleep (REMS) (Lee et al., 2005; Mileykovskiy et al., 2005). Likewise, pharmacological stimulation of the OX system increases W and reduces REMS (Akanmu and Honda, 2005; Hagan et al., 1999). It has also been shown that OX knockout (KO) mice exhibit a narcoleptic-like phenotype, which includes sudden transitions from W into REMS (Chemelli et al., 1999). In turn, MCH neurons have their maximal firing rate during REMS, moderate during SWS and absent during W (Hassani et al., 2009). Also, microinjection of the MCH peptide increases REMS and diminishes W (Verret et al., 2003). Moreover, MCH KO mice exhibit increased W and reduced sleep (Willie et al., 2008), and blocking MCH neurotransmission increases W while reducing SWS and REMS (Ahnaou et al., 2008). Likewise, using c-Fos immunoreactivity as a marker of neural activation, it has been observed that OX neurons are active in W (Modirrousta et al., 2005) while MCH neurons are active in REMS (Verret et al., 2003). In addition, we have observed that activation of the protease-activated receptor 1 (PAR1) in the lateral hypothalamus increases REMS, but, interestingly, such an effect is blocked by AM251 (Pérez-Morales et al., 2012), a cannabinoid receptor 1 (CB1R) inverse agonist. It is known that endocannabinoids (eCBs), the endogenous ligands for CB1R and cannabinoid receptor 2 (CB2R), have been implicated in sleep regulation and have been shown to be strong sleep-inducing

Abbreviations: OX, Orexins/hypocretins; MCH, melanin-concentrating hormone; CB1R, cannabinoid receptor 1; CB2R, cannabinoid receptor 2; SWC, sleep–wake cycle; W, wakefulness; SWS, slow wave sleep; REMS, rapid eye movement sleep; eCBs, endocannabinoids; 2-AG, 2-arachidonoylglycerol; AEA, anandamide; OLE, oleamide; PAR1, protease-activated receptor 1; FAAH, fatty acid amide hydrolase; PBS, phosphate-buffer-saline; PFH, paraformaldehyde; LDT, laterodorsal tegmental nuclei; PPT, pedunculopontine tegmental nuclei; PACAP, pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide; FTG, gigantocellular tegmental field; PnO, pontine reticular nucleus; ACEA, arachidonyl-2'-chloroethylamide; IL-1, interleukin-1.

* Corresponding author at: Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-250, México, D. F. 04510, Mexico. Tel.: +52 55 623 2509; fax: +52 55 623 2241.

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

molecules. For example, cis-9, 10-octadecenoamide (oleamide, or OLE) was isolated from the cerebrospinal fluid of sleep-deprived cats (Lerner et al., 1994), and its systemic administration induces sleep in rats (Cravatt et al., 1995). Moreover, OLE restores sleep in rats that exhibit a reduced sleep amount as a result of early maternal separation (Reyes Prieto et al., 2012). Likewise, Santucci et al. (1996) reported that systemic administration of SR141716A, a CB1R inverse agonist, increases W and decreases both SWS and REMS in rats. Acute (Murillo-Rodríguez et al., 2001), subchronic (Herrera-Solís et al., 2010) or intrahippocampal (Rueda-Orozco et al., 2010) administration of the eCB, anandamide (AEA), increases REMS in rats, through CB1R activation. Mice lacking fatty acid amide hydrolase (FAAH), the enzyme responsible for degrading AEA and OLE (Cravatt et al., 1996), have increased sleep and reduced W (Huitrón-Reséndiz et al., 2004). Despite all this information, an interaction between the peptidergic and endocannabinergic systems to induce sleep has not been described. There is evidence indicating that WIN55 212 2, a potent CB1R synthetic agonist, depolarizes MCH-ergic neurons and hyperpolarizes OX neurons in *in vitro* preparations (Huang et al., 2007), suggesting that eCBs could interact with these hypothalamic neurons to regulate sleep. Based on this literature, we decided to study the effect of 2-arachidonoylglycerol (2-AG, a potent eCB) as a hypnogenic molecule, when administered into the lateral hypothalamus of rats. We also utilized the CB1R inverse agonist AM251, to determine if 2-AG's effects were mediated by CB1R activation. Finally, to study if 2-AG's effects resulted from the interaction with OX and MCH neurons, we explored the expression of c-Fos, as a marker of neural activation, in such neurons after 2-AG administration.

2. Materials and method

2.1. Subjects

Seventy-two male Wistar rats (250–300 g) provided by the vivarium of the School of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), were housed individually in Plexiglas cages (CIPQUIM, México) with wood chip bedding, and maintained under a reversed dark-light cycle (12:12; lights ON at 8:00 PM) with constant environmental temperature (23 ± 1 °C) and food and water *ad libitum*. Animals remained in their home cages throughout the experiments, including the SWC recording, and were handled according to the Mexican Official Standard on “Technical specifications for the production, use and care of laboratory animals” (NOM-062-ZOO-1999). Additionally, this study was approved by the Public Health Service (PHS) Policy of Humane Care and Use of Laboratory Animals, and the Ethics Committee guidelines of the School of Medicine (UNAM). All possible efforts were made to minimize the number of animals used, as well as their potential suffering.

2.2. Drugs and chemicals

2-arachidonoylglycerol (2-AG) (Catalogue Number: 62160) and CB1R inverse agonist AM251 [1-(2,4-dichlorophenyl)-5-(4-iodophenyl)-4-methyl-N-1-piperidynil-1H-pyrazole-3-carboxamide] (Catalogue Number: 71670) were purchased from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA). Vehicle for 2-AG and AM251 was a solution of Dimethyl sulfoxide (100%, DMSO), obtained from Sigma Aldrich (Catalogue Number: 673439; St. Louis, MO, USA). Paraformaldehyde (Catalogue Number P6148) and bovine albumin were purchased from Sigma-Aldrich (Catalogue Number A-7030; St. Louis, MO, USA). 4', 6-Diamidino-2-Phenylindone, Dihydrochloride (DAPI) was obtained from Invitrogen (Catalogue Number D3571; San Diego, CA, USA). DAKO fluorescence mounting medium was purchased from Dako North America, Inc. (Code S3023).

2.3. Antibodies

Orexin-A (C-19) goat polyclonal IgG (Catalogue Number sc-8070), proMCH (E-16) goat polyclonal IgG (Catalogue Number sc-14507) and c-Fos (H-125) rabbit polyclonal IgG (Catalogue Number sc-7202), were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Alexa Fluor® 488 Donkey Anti-rabbit IgG (H + L) (Catalogue Number A-21206) and Alexa Fluor® 555 Donkey Anti-Goat IgG (H + L) (Catalogue Number A-21432) were obtained from Invitrogen (San Diego, CA, USA).

2.4. Sleep-wake cycle experiments

2.4.1. Electroencephalographic and electromyographic recordings

Rats under anesthesia (a mixture of ketamine, 66 mg/kg; xylazine, 0.26 mg/kg; and acepromazine, 1.3 mg/kg), were stereotaxically implanted with a set of electrodes for polysomnographic recordings, that consisted of two stainless-steel screw electrodes (0–80 × 1/16, Plastics One Inc., VA, USA) placed in the frontal bones in order to ground the animal; a bipolar stainless-steel Teflon-covered wire electrode (0.013", A-M Systems Inc., WA, USA) was placed in the hippocampus ($P = 4.0$; $L = \pm 2$; $V = 2.5$, reference from Bregma), according to Paxinos and Watson atlas (2007), for electroencephalographic recording (EEG), since theta rhythm is easily recorded from this structure (Prospéro-García et al., 1993) and allows us to differentiate between the SWC stages, as we have done previously (Pérez-Morales et al., 2012); and two additional twisted stainless-steel Teflon-covered wire (0.013", A-M Systems, WA, USA) electrodes were placed into the rats' neck, for electromyographic recording (EMG). This standard set of electrodes to record the SWC was affixed to the rats' skull with dental acrylic. EEG and EMG signals were amplified with a Grass Model 7 polygraph, Amplifier Model 7P511, in a frequency range of 1 to 30 and 30 to 100 Hz, respectively. Sleep recordings were captured and analyzed using the commercially available Icelus® software (Mark Opp, Ann Arbor, MI, USA). Three SWC phases were visually identified and scored offline: W (EEG: low voltage and high frequency activity, or mixed activity; EMG: high activity), SWS (EEG: high voltage and low frequency activity; EMG: low activity), and REMS (EEG: predominantly low voltage and high frequency activity; EMG: absent activity).

2.4.2. Guide cannulae implantation

During the same surgical procedure mentioned in Section 2.4.1, rats were implanted with a couple of stainless steel guide cannulae (23-gauge × 1.1 cm, Plastics One) aimed bilaterally at the lateral hypothalamus ($P = 1.8$; $L = \pm 2$; $V = 6.6$; reference to Bregma) (Paxinos and Watson, 2007), to administer drugs. Guide cannulae were implanted and affixed to the rats' skull with dental cement and sealed with stylets to maintain their patency. The stylets, as well as the 30-gauge injectors (Plastics One) used to infuse the drugs, protruded 1 mm from the end of the guide cannulae. All animals were allowed to recover from surgery for 10 days, during which they remained under a reversed dark-light cycle in the conditions mentioned in Section 2.1 until the end of the experiment, and then gently habituated to manipulation for three days, 1 h each, to reduce stress, before the beginning of drug administrations.

2.4.3. Drug administration

Intra-hypothalamic administration of drugs was conducted at the onset of the dark phase of the cycle, for both SWC and the immunofluorescence experiments. In all cases, drugs were dissolved in a final volume of 0.5 µl, even when combining 2-AG with AM251, and were administered into the lateral hypothalamus of rats with the aid of an infusion pump (kd Scientific®, Holliston, MA, USA), at a rate of 0.1 µl per min, through the 30-gauge injectors mentioned in Section 2.4.2. Injections were performed while animals were

temporarily restrained. After infusions ended, injectors were kept in place for 60 additional seconds to prevent outflow.

Upon completion of experiments, rats were subjected to deep anesthesia with pentobarbital and perfused transcardially with 200 ml of phosphate-buffer-saline (PBS) and 200 ml of 4% paraformaldehyde (4% PFH) and their brains were extracted and prepared for histological analysis with cresyl violet staining to verify the correct placement of the cannulae. Rats with misplaced cannulae were discarded.

2.4.4. Effects of the intralateral hypothalamic administration of drugs on the SWC

After the periods for recovery from surgery and manipulation to reduce stress elapsed, rats were acclimated to the sleep chambers for 24 h before administration of drugs. Independent groups of rats ($n = 10$, each) received one of the following treatments: vehicle, 2-AG (0.01, 0.1 or 1 μg), or CB1R inverse agonist AM251 (1.4 μg) alone or in conjunction with 2-AG (0.01 μg). Drugs were administered bilaterally into the lateral hypothalamus of rats and then SWC recordings began for the next 24 h. Since, to our knowledge, the effects of 2-AG on the SWC have not yet been reported, we decided to record for 24 h, in order to document the entire SWC. Also, we chose the aforementioned doses on the basis of previous studies our group has carried out, in which other eCBs have been reported to act as sleep-inducing molecules (Rueda-Orozco et al., 2010). Likewise, the selected dose of AM251 was based on its equimolarity with respect to the highest dose of 2-AG used here (1 μg).

2.5. Immunofluorescence experiments

Independent groups of rats under anesthesia (same conditions as in Section 2.4.1), were implanted only with the guide cannulae aimed at the lateral hypothalamus, as mentioned in Section 2.4.2. These rats were assigned randomly to experimental groups and received bilateral administration of vehicle ($n = 6$) or 0.01 μg of 2-AG ($n = 6$) into the lateral hypothalamus under the same conditions mentioned in Section 2.4.3.

2.5.1. Effects of intralateral hypothalamic administration of 2-AG on OX and MCH neurons

Ninety min after drug administration, rats were sacrificed with an overdose of pentobarbital and transcardially perfused using 200 ml of PBS followed by 200 ml of 4% PFH. Brains were removed and post-fixed overnight in 4% PFH, followed by incubation in 18% sucrose for 24 h and subsequently incubated in 30% sucrose for another 24 h. Once this part of the procedure ended, 30 μm coronal brain slices were cut and collected in serial order onto Fisher superfrost plus slides (Thermo Scientific, Portsmouth, NH, USA). Section slides were rinsed in PBS three times for 5 min; subsequently, non-specific binding sites were blocked by means of 2.5% bovine albumin with 0.25% Triton X-100 in PBS for 1 h at room temperature. After blocking, alternating sections were incubated with either anti orexin-A (goat host; 1:1000 dilution) and anti c-Fos (H-125) (rabbit host; 1:100 dilution), or with anti proMCH (goat host; 1:1000 dilution) and anti c-Fos (as mentioned above), for 24 h at room temperature. Sections were then rinsed in PBS three times for 5 min before a subsequent incubation in secondary antibodies. As secondary antibodies for peptides, orexin-A and MCH, we used Alexa Fluor® 555 Donkey anti-goat IgG (1:500 dilution), combined with secondary antibody for c-Fos, Alexa Fluor® 488 Donkey anti-rabbit IgG (1:500 dilution). Secondary antibodies were diluted in 0.25% Triton X-100/PBS, and sections were incubated for 2 h at room temperature. Afterward, sections were rinsed in PBS three times for 5 min, applying DAPI (1:10,000 dilution) in the second rinse and finally mounted with DAKO fluorescence mounting medium. Sections were observed under an Olympus FV-1000 laser confocal scanning microscope equipped with a Plan apochromat 60 \times oil immersion objective (N.A. 1.4). Images were

acquired with a 1.0 airy unit pinhole aperture and the mean fluorescence intensity of each pixel was averaged three times during acquisition. Micrographs are presented as flat mount projections of 3D scanning across the whole 30 μm cross-section of the slides.

2.5.2. c-Fos quantitation

OX and MCH neurons positive for c-Fos were counted manually by researchers unaware of the treatments and employing the semi-automatic detection method of NIH ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). To fulfill the requirements of this stereological based system, every third hypothalamic section from rats exposed to the intralateral hypothalamic administration of vehicle or 2-AG (0.01 μg) was processed for immunostaining for orexin-A and c-Fos (six sections total per rat) or for MCH and c-Fos (six sections total per rat). In order to avoid an overestimation of c-Fos counts, orexin-A and MCH cell bodies positive for c-Fos in the lateral hypothalamus were defined as those objects with a round entity measuring more than 200 μm^2 , which co-localized with nuclear DAPI and c-Fos staining. The cell number co-stained with c-Fos was estimated by the modified three-dimensional counting (<http://www.nervenet.org/papers/3DCounting.html>) method designed by Williams and Rakic (1988).

2.6. Statistics

Results are reported as mean \pm standard error of the mean (SEM). Significant differences were obtained using either a Student t-test for independent samples (immunofluorescence experiments) or a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni *post-hoc* test (SWC experiments), as appropriate; $p < 0.05$ was considered statistically significant (otherwise as indicated). For the SWC experiments, the total time of W, SWS and REMS was calculated in three blocks (4 h each) and a total of 12 h. Also, latencies to SWS (time to first SWS episode from the beginning of recording) and to REMS (time to first REMS episode from the first SWS episode), and bout frequency (number) and bout duration (min) for each SWC phase were calculated for each group.

3. Results

3.1. Intralateral hypothalamic administration of 2-AG increases REMS through CB1R activation.

3.1.1. First 12 h of recording (dark phase of the cycle)

2-AG (0.01 μg) increased both REMS time throughout this 12 h-period [$F(2, 29) = 20.177, P = 0.001$] (Fig. 1C, left panel; Table 1) and REMS bout frequency [$F(5, 59) = 5.262, P = 0.001$] (Table 2). No significant effects in the SWC were caused either by 0.1 μg or 1 μg of 2-AG or by AM251 (1.4 μg) (but see Table 1, for details). As expected, when administered in conjunction with 2-AG (0.01 μg), AM251 prevented the REMS increase induced by 2-AG throughout [$F(3, 39) = 13.465, P = 0.001$] (Fig. 1C, left panel; Table 1) and also prevented the increase induced by 2-AG in REMS bout frequency [$F(2, 29) = 7.494, P = 0.003$] (Table 2).

3.1.2. Last 12 h of recording (light phase of the cycle)

During this period 2-AG (0.01 μg) did not induce significant changes (Fig. 1A and B, respectively, right panel; but also, see Table 1, for details), and REMS remained unchanged throughout the entire period (Fig. 1C, right panel; Table 1). Neither 0.1 μg nor 1 μg of 2-AG induced changes in the SWC. AM251 increased W [$F(5, 59) = 8.873, P = 0.001$] (Fig. 1A, right panel) and decreased REMS [$F(3, 39) = 8.926, P = 0.008$] (Fig. 1C, right panel; Table 1). AM251 in combination with 2-AG (0.01 μg), increased W [$F(5, 59) = 8.873, P = 0.001$] (Fig. 1A, right panel; Table 1) and decreased both SWS [$F(5, 59) = 5.025, P = 0.001$] (Fig. 1B, right panel; Table 1) and REMS [$F(5, 59) = 6.489, P = 0.001$] (Fig. 1C, right

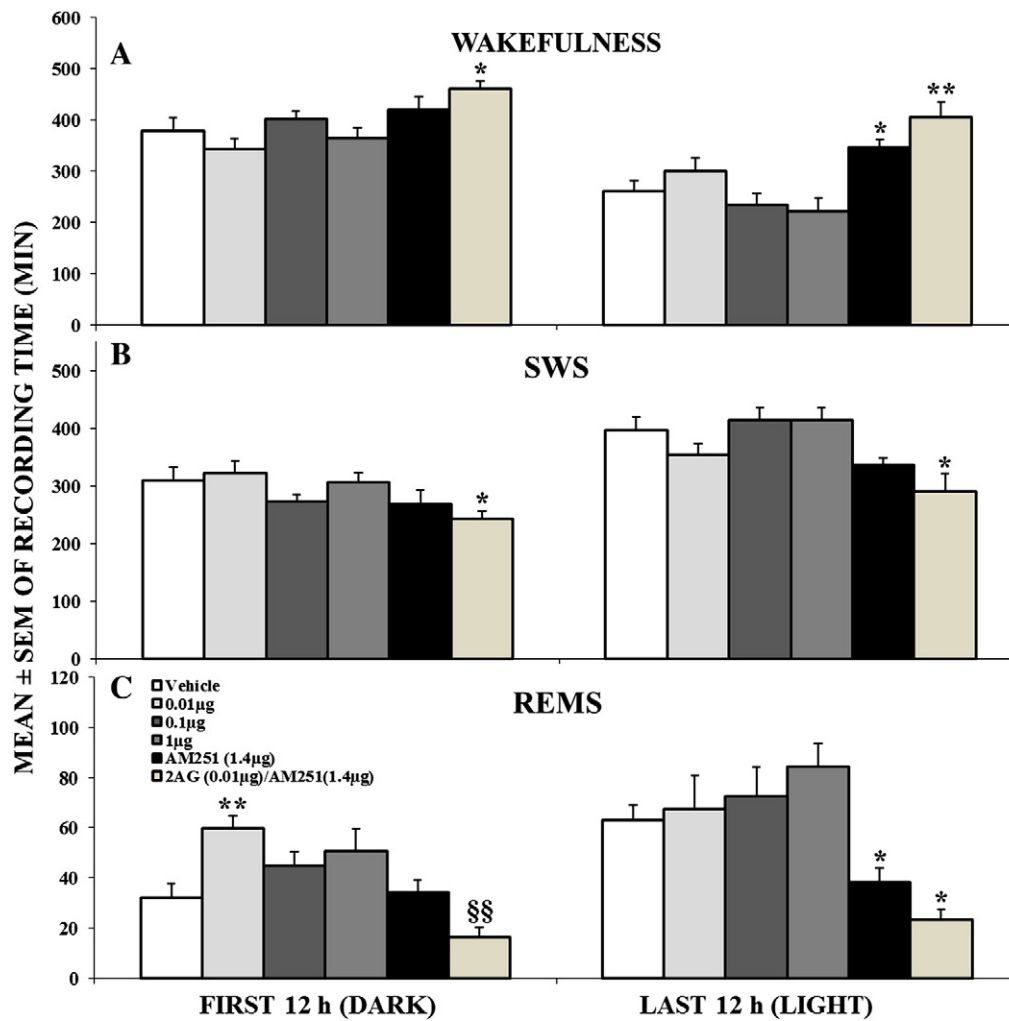


Fig. 1. Effects of bilateral intralateral hypothalamic administration of 2-AG (0.01 µg or 0.1 µg or 1 µg), AM251 (1.4 µg), or 2-AG (0.01 µg) in combination with AM251, on the sleep-wake cycle of rats, for the first 12 h and for the last 12 h of recording (min), corresponding to both the dark phase (left panel) and to the light phase (right panel) of the cycle (n = 10, per group); *p < 0.05, **p < 0.001 vs. Vehicle; §p < 0.05, §§p < 0.001 vs. 2-AG (0.01 µg).

Table 1

Time spent (min) in W, SWS and REMS depicted in 4 h blocks (1–4, 5–8, 9–12, 13–16, 17–20 and 21–24), following the bilateral intralateral hypothalamic administration of 2-AG (0.01 µg or 0.1 µg or 1 µg), AM251 (1.4 µg), or 2-AG (0.01 µg) in combination with AM251, for both the first (Dark) and last (Light) 12 h of recording (n = 10, per group); *p < 0.05, **p < 0.001 vs. Vehicle; §p < 0.05, §§p < 0.001 vs. 2-AG (0.01 µg).

		Dark			Light		
		1–4 h	5–8 h	9–12 h	13–16 h	17–20 h	21–24 h
W	Vehicle	131.2 ± 12.4	122 ± 12.1	125.9 ± 15.6	82.5 ± 12	77.2 ± 10.3	100.2 ± 7.7
	0.01 µg	122 ± 11.8	116.4 ± 8.4	103.6 ± 11.1	77 ± 9.7	87.5 ± 11.2	*134.5 ± 9.8
	0.1 µg	158.6 ± 5.9	105.8 ± 10.1	137.4 ± 7.4	56.8 ± 6.7	76.2 ± 11.4	99.9 ± 9.6
	1 µg	126.8 ± 9.9	109.5 ± 13.7	126.9 ± 10	72.1 ± 11.5	60.6 ± 9	89.5 ± 10.8
	1.4 µg (AM251)	*186.6 ± 10.9	105.7 ± 11.1	126 ± 12	83.1 ± 5.6	*120.4 ± 10.9	*141.7 ± 7.7
	0.01 µg (2AG)/AM251	165.8 ± 10.9	142.2 ± 10.3	152.8 ± 5.1	*116 ± 10.6	*120.5 ± 11.2	*§169.3 ± 10.7
Sws	Vehicle	100.5 ± 11.8	104.8 ± 10.7	103.4 ± 14.9	135.7 ± 11.2	139.1 ± 10.3	122.2 ± 7.8
	0.01 µg	101.8 ± 10.2	109.4 ± 7.7	110 ± 11.5	132.4 ± 7.4	130.5 ± 9.8	*90.5 ± 7.4
	0.1 µg	69.7 ± 5.2	114.7 ± 8.7	88.7 ± 5.6	154.9 ± 5.5	138.5 ± 9.2	120.8 ± 9.1
	1 µg	99.6 ± 8.7	111.4 ± 11.7	94.8 ± 8.2	141.3 ± 9.7	147.6 ± 8.4	124.4 ± 8.8
	1.4 µg (AM251)	*47.1 ± 10.1	119.2 ± 10.2	100.9 ± 10.5	142.1 ± 3.3	*105.6 ± 9.2	*88.5 ± 6.6
	0.01 µg (2AG)/AM251	70.6 ± 10.5	90.8 ± 9.3	81.2 ± 4.9	114.7 ± 10	110.3 ± 11.9	**65.6 ± 10.6
REMS	Vehicle	8.2 ± 1.5	13 ± 2.3	10.6 ± 4.1	21.7 ± 3.7	23.5 ± 2.5	17.5 ± 1.6
	0.01 µg	*18.2 ± 2.6	*20.7 ± 1.5	*20.7 ± 4	30.4 ± 5.9	21.8 ± 4	14.9 ± 4.5
	0.1 µg	11.5 ± 2.2	19.4 ± 2.4	13.7 ± 2.8	28.2 ± 4.2	25.1 ± 4.5	19.1 ± 4.1
	1 µg	13.5 ± 2.4	18.9 ± 3.9	18.2 ± 3.3	26.5 ± 3.7	31.7 ± 3.3	25.9 ± 3.3
	1.4 µg (AM251)	6.1 ± 2	14.9 ± 2	13 ± 3	14.6 ± 3	*13.8 ± 2.6	*9.6 ± 1.7
	0.01 µg (2AG)/AM251	§3.4 ± 1.3	*§§6.9 ± 1.4	§5.9 ± 1.7	*§9.1 ± 1.7	*§9 ± 1.9	**4.9 ± 1.1

Table 2

Latencies to SWS and REMS, bout frequency (number) and bout duration (min), corresponding to the dark phase of the cycle, for W, SWS and REMS among treatments; ** $p < 0.001$ vs. Vehicle; * $p < 0.05$ vs. Vehicle; § $p < 0.05$ vs. 2-AG (0.01 μg).

	Latencies		Dark					
	SWS	REMS	Bout frequency			Bout duration		
			W	SWS	REMS	W	SWS	REMS
Vehicle	37.75 \pm 4.458	23.96 \pm 4.899	29.8 \pm 1.218	28.9 \pm 1.37	18.1 \pm 2.911	12.754 \pm 0.668	10.723 \pm 0.771	1.799 \pm 0.228
0.01 μg	29.347 \pm 2.465	19.423 \pm 1.702	*22 \pm 1.3	**48.9 \pm 5.076	*31.4 \pm 4.159	*15.605 \pm 0.454	**6.613 \pm 0.66	1.869 \pm 0.129
0.1 μg	*53.874 \pm 2.955	22.877 \pm 2.794	32.1 \pm 1.09	34.5 \pm 1.507	14 \pm 1	12.602 \pm 0.464	*7.967 \pm 0.276	*3.167 \pm 0.243
1 μg	36.7 \pm 4.007	19.987 \pm 3.206	27.9 \pm 1.303	34.8 \pm 1.604	26.7 \pm 4.502	13.048 \pm 0.586	8.815 \pm 0.322	1.921 \pm 0.135
1.4 μg (AM251)	**105.3 \pm 4.366	**56.744 \pm 3.158	*37.7 \pm 1.126	32.6 \pm 1.928	22.6 \pm 2.367	11.09 \pm 0.607	*8.188 \pm 0.547	1.507 \pm 0.172
0.01 μg (2-AG) /AM251	**63.517 \pm 4.342	**122.1 \pm 8.767	*§40 \pm 1.483	*35.8 \pm 1.245	§13 \pm 3.218	§11.579 \pm 0.308	**6.8 \pm 0.339	1.251 \pm 0.0863

panel; Table 1). Since this drug combination magnified the effects induced by AM251 alone, an increase in W and a reduction in both SWS and REMS, it is possible that it might be indicating a synergism rather than an antagonism of these drugs.

3.2. Effects of intralateral hypothalamic administration of 2-AG on OX and MCH neurons

To evaluate whether the effect induced by 2-AG (0.01 μg) in the lateral hypothalamus that triggers REMS is exerted on OX and/or MCH neurons, we performed double immunofluorescence experiments against orexin-A or MCH and c-Fos (Fig. 2), following the administration of this drug or its vehicle. Results show that 2-AG induced a significant increase in c-Fos expressing-MCH-ergic neurons

[$t(8) = -4.728$; $P = 0.001$] and a non-significant decrease in c-Fos expressing-OX neurons ($p > 0.05$) (Table 3).

4. Discussion

Our data show that 2-AG (0.01 μg) administration into the lateral hypothalamus of rats significantly increases REMS (Fig. 1C, left panel), through CB1R activation, as suggested by the blockage of these effects by AM251 (Fig. 1C left panel; Tables 1 and 2). Also, as a consequence of activating CB1R, 2-AG increased the expression of c-Fos in MCH-ergic neurons, suggesting an increase in their activity (Table 3). These results explain, at least in part, the 2-AG-induced REMS increase, since it has been previously shown that MCH-ergic neurons express c-Fos in rats exhibiting REMS rebound after 72 h of

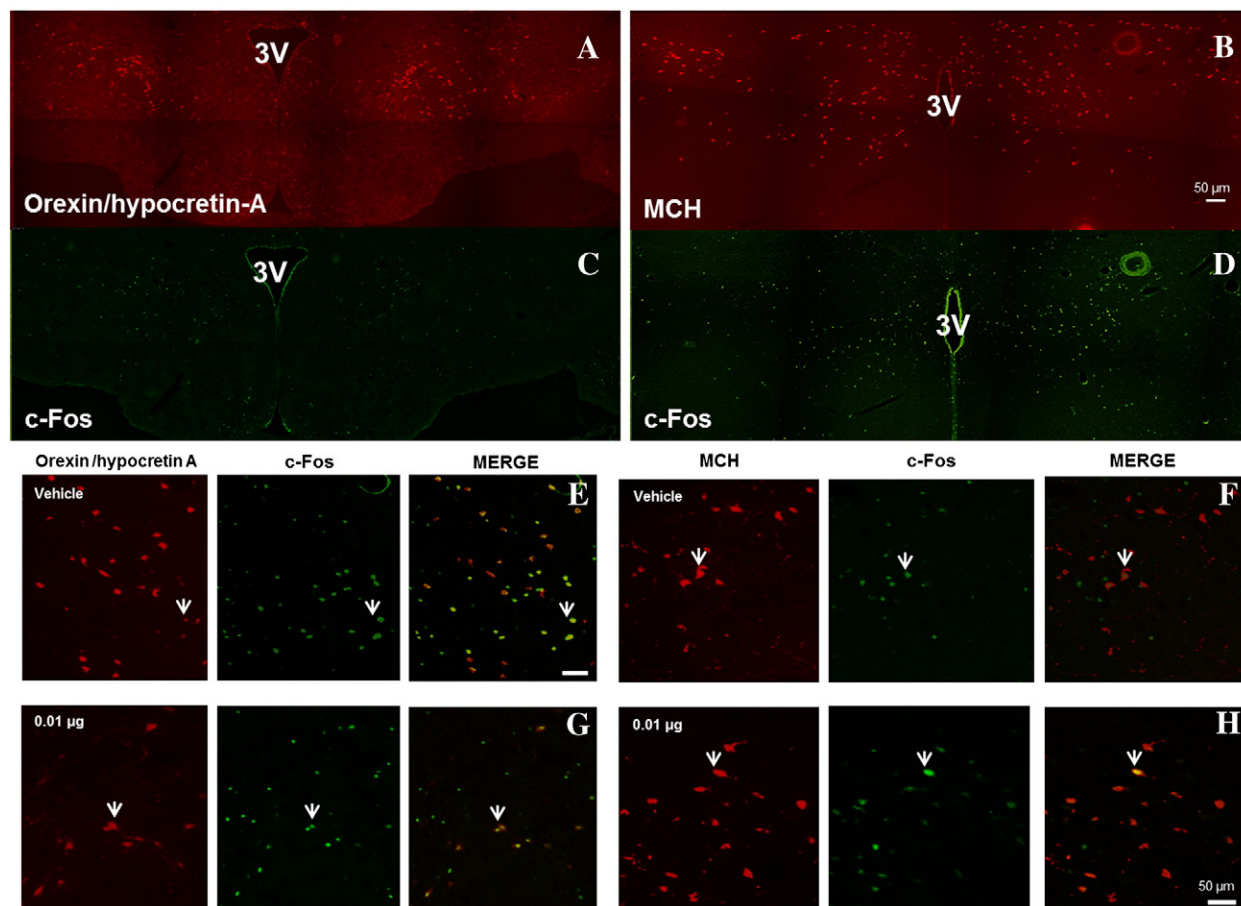


Fig. 2. Representative photomicrographs of brain coronal sections corresponding to double immunofluorescence against orexin/hypocretin-A (A; top; left panel) or MCH (B; top; right panel) and c-Fos, for both cases (C, D; bottom). Amplifications are shown for orexin/hypocretin A (left panel), c-Fos (middle panel) and merged for orexin/hypocretin A and c-Fos (right panel), corresponding to vehicle (E) or 0.01 μg of 2-AG (G); and for MCH (left panel), c-Fos (middle panel) and merged for MCH and c-Fos, corresponding to vehicle (F) or 0.01 μg of 2-AG (H). 3V: third ventricle. Single arrowheads denote an example of cells positive for both peptide (OX+ or MCH+) and c-Fos.

Table 3

Cell count for c-Fos positive (+), OX+, MCH+ and double+ cells for c-Fos/OX and c-Fos/MCH, following the bilateral administration of 0.01 µg of 2-AG or its vehicle into the lateral hypothalamus of freely behaving rats (n = 6, per group). 2-AG significantly increased c-Fos expression in MCH cells. 88.8% of total MCH+ cells and 43.7% of total OX+ cells were also c-Fos+, following 2-AG administration, while 17.4% of total MCH+ cells and 51.9% of total OX+ cells were also c-Fos+ in the control group; ** p < .001 vs. Vehicle.

	Vehicle	2-AG (0.01 µg)
cFos+ cells	1079.9 ± 125.367	1234.7 ± 147.532
OX+ cells	1159.6 ± 134.596	935.8 ± 53.096
MCH+ cells	1564 ± 183.28	1337.8 ± 196.841
cFos+/OX+ cells	602.8 ± 83.044	409 ± 29.184
cFos+/MCH+ cells	272.2 ± 9.646	**1189 ± 193.715

REMS deprivation (Verret et al., 2003) and that they discharge maximally in REMS in head-restrained rats (Hassani et al., 2009). On the basis of these data, these neurons have been proposed as fundamental in REMS generation and maintenance (Peyron et al., 2009; Torterolo et al., 2011). On the other hand, OX-neurons have been involved in the maintenance of W (Chemelli et al., 1999), since they exhibit their maximal firing rate during W (Mileykovskiy et al., 2005; Lee et al., 2005), and in our study we found a slight decrease in OX neurons expressing c-Fos (Table 3). Even though it has been shown *in vitro* that CB1R activation into the lateral hypothalamus excites MCH-ergic neurons and inhibits OX-neurons (Huang et al., 2007), to our knowledge, we are showing for the very first time, an interaction between these systems *in vivo* and in terms of sleep–wake regulation. Also, it is interesting that only the lowest dose of 2-AG (0.01 µg) used in our study induced a significant effect (Fig. 1C). In this way, it has been reported that eCBs, such as AEA, induce biphasic effects on the SWC of rats (Herrera-Solís et al., 2010). These biphasic effects induced by eCBs have been widely reported in several processes and tests; for instance, administration of a low dose of arachidonyl-2'-chloroethylamide (ACEA), a CB1R agonist, into the prelimbic medial prefrontal cortex of rats, induces anxiolytic-like effects whereas a higher dose of the same molecule is anxiogenic (Fogaça et al., 2012). In addition, it has been acknowledged that lower doses of CB1R agonists exert an antinociceptive effect whereas higher doses decrease pain threshold in human healthy volunteers (for a review, see Manzanares et al., 2006). Also, eCBs exert an influence on inflammatory processes, including pro-inflammatory effects (for a review, see Rettori et al., 2007) or anti-inflammatory effects (Krishnan and Chatterjee, 2012), depending on the doses employed. In our study we are documenting similar biphasic effects on the SWC, but induced by 2-AG.

In the last 12 h of recording, corresponding to the light phase of the cycle, as a consequence of administering 2-AG (0.01 µg), W increased and SWS decreased for the last period of recording (21–24 h) (Table 1), whereas REMS did not change throughout this phase (Fig. 1C, right panel). It is interesting that, considering that REMS increases spontaneously in this phase of the cycle and, even though 2-AG increased REMS significantly throughout the prior 12 h of recording, REMS remained just as high as in the control group (Fig. 1C) and that the opposite occurred with W and SWS, which increased and decreased, respectively, in the last h of recording (Table 1). As a whole, these facts not only suggest a long-lasting effect of 2-AG, but also that the effect induced by 2-AG was a result of directly affecting REMS mechanisms in the lateral hypothalamus by enhancing the activity of MCH-ergic neurons, and because MCH neurons project to the REMS-on laterodorsal and pedunculopontine (LDT/PPT) nuclei (Bittencourt et al., 1992). Regarding the long-lasting effect of 2-AG on REM sleep, although interesting, we do not have an explanation at present. We dare not to speculate about the mechanisms, but we can mention that such a long-lasting effect has been caused by other pharmacological approaches, such as carbachol administration into the gigantocellular tegmental field (FTG) in cats, which increased

REMS for 6 days (Datta et al., 1991) or into the central nucleus of the amygdala increasing REMS for 5 days in cats (Calvo et al., 1996), or pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide (PACAP) administration into the oral pontine reticular nucleus (PnO) increasing REMS for 11 days in rats (Ahnaou et al., 1999). Likewise, since it has been shown that both AEA and 2-AG inhibit the production of proinflammatory cytokines in the human eye (Krishnan and Chatterjee, 2012) and also it has been shown that the administration of the proinflammatory cytokine interleukin-1 (IL-1) into the LDT of rats reduces REMS about 50% (Brambilla et al., 2010), another possibility that arises in our study is that 2-AG might be inducing and inhibition of IL-1, or other proinflammatory cytokines in the brain, in order to facilitate this REMS long-lasting effect, but this possibility requires to be determined.

5. Conclusions

Even though we have previously shown that the eCBs, AEA and OLE, increase REMS in rats (Murillo-Rodríguez et al., 2001; Herrera-Solís et al., 2010; Rueda-Orozco et al., 2010), the exact mechanisms by which they do so remain unknown. In the present study, our data suggest that 2-AG, and potentially other eCBs, increase REMS by enhancing the activity of MCH neurons in the lateral hypothalamus.

Role of the funding source

This study was supported by Grants IN208010 and IN217311 from DGAPA-UNAM to OPG and AERC, respectively, and Grants 80148 from CONACYT and PICS10-115 to MMD. MPM was supported by CONACYT studentship 220685.

Conflict of interest

The authors state no conflict of interest.

Acknowledgments

This work is part of MPM's Doctoral Dissertation in the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas of UNAM. Authors acknowledge the English review of this manuscript by Edith Monroy.

References

- Ahnaou A, Basille M, Gonzalez B, Vaudry H, Hamon M, Adrien J, et al. Long-term enhancement of REM sleep by the pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the pontine reticular formation of the rat. *Eur J Neurosci* 1999;11(11):4051–8.
- Ahnaou A, Drinkenburg WHIM, Bouwknecht JA, Alcazar J, Steckler T, Dautzenberg FM. Blocking melanin-concentrating hormone MCH1 receptor affects rat sleep–wake architecture. *Eur J Pharmacol* 2008;579:177–88.
- Akanmu MA, Honda K. Selective stimulation of orexin receptor type 2 promotes wakefulness in freely behaving rats. *Brain Res* 2005;1048(1–2):138–45.
- Bittencourt JC, Presse F, Arias C, Peto C, Vaughan J, Nahon JL. The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immun- and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol* 1992;319:218–45.
- Brambilla D, Barajon I, Bianchi S, Opp MR, Imeri L. Interleukin-1 inhibits putative cholinergic neurons *in vitro* and REM sleep when microinjected into the rat laterodorsal tegmental nucleus. *Sleep* 2010;33(7):919–29.
- Broberger C, de Lecea L, Sutcliffe JG, Hökfelt T. Hypocretin/orexin—and melanin-concentrating hormone—expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *J Comp Neurol* 1998;402:460–74.
- Calvo JM, Simón-Arce K, Fernández-Mas R. Prolonged enhancement of REM sleep produced by carbachol microinjection into the amygdala. *Neuroreport* 1996;7(2):577–80.
- Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, et al. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 1999;98(4):437–51.
- Cravatt BF, Prospéro-García O, Siuzdak G, Gilula NB, Henriksen SJ, Boger DL, et al. Chemical characterization of a family of brain lipids that induce sleep. *Science* 1995;268(5216):1506–9.
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 1996;384:83–7.

- Datta S, Calvo JM, Quattrochi JJ, Hobson JA. Long-term enhancement of REM sleep following cholinergic stimulation. *Neuroreport* 1991;2(10):619–22.
- Della-Zuana O, Presse F, Ortola C, Duhault J, Nahon JL, Levens N. Acute and chronic administration of melanin-concentrating hormone enhances food intake and body weight in Wistar and Sprague–Dawley rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;26:1289–95.
- Fogaça MV, Aquiar DC, Moreira FA, Guimaraes FS. The endocannabinoid and endovanilloid systems interact in the rat prelimbic medial prefrontal cortex to control anxiety-like behavior. *Neuropharmacology* 2012;63(2):202–10.
- Hagan JJ, Leslie RA, Patel S, Evans ML, Wattam TA, Holmes S, et al. Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:10911–6.
- Hassani OK, Lee MG, Jones BE. Melanin-concentrating hormone neurons discharge in a reciprocal manner to orexin neurons across the sleep–wake cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(7):2418–22.
- Herrera-Solis A, Vásquez KG, Prospéro-García O. Acute and subchronic administration of anandamide or oleamide increases REM sleep in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2010;95(1):106–12.
- Huang H, Acuna-Goycolea C, Li Y, Cheng HM, Obrietan K, van den Pol AN. Cannabinoids excite hypothalamic melanin-concentrating hormone but inhibit hypocretin/orexin neurons: implications for cannabinoid actions on food intake and cognitive arousal. *J Neurosci* 2007;27(18):4870–81.
- Huitrón-Reséndiz S, Sánchez-Alavez M, Wills DN, Cravatt BF, Henriksen SJ. Characterization of the sleep–wake patterns in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Sleep* 2004;27(5):857–65.
- Krishnan G, Chatterjee N. Endocannabinoids alleviate proinflammatory conditions by modulating innate immune response in muller glia during inflammation. *Glia* 2012;60(11):1629–45.
- Lee MG, Hassani OK, Jones BE. Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep–waking cycle. *J Neurosci* 2005;25(28):6716–20.
- Lerner RA, Siuzdak G, Prospéro-García O, Henriksen SJ, Boger DL, Cravatt BF. Cerebrodiene: a brain lipid isolated from sleep-deprived cats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:9505–8.
- Manzanares J, Julian M, Carrascosa A. Role of the cannabinoid system in pain control and therapeutic implications for the management of acute and chronic pain episodes. *Curr Neuropharmacol* 2006;4(3):239–57.
- Mileykovskiy BY, Kiyashchenko LI, Siegel JM. Behavioral correlates of activity in identified hypocretin/orexin neurons. *Neuron* 2005;46(5):787–98.
- Modirrousta M, Mainville L, Jones BE. Orexin and MCH neurons express c-Fos differently after sleep deprivation vs. recovery and bear different adrenergic receptors. *Eur J Neurosci* 2005;21:2807–16.
- Murillo-Rodríguez E, Cabeza R, Méndez-Díaz M, Navarro L, Prospéro-García O. Anandamide-induced sleep is blocked by SR141716A, a CB1 receptor antagonist and by U73122, a phospholipase C inhibitor. *Neuroreport* 2001;12(10):2131–6.
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. Amsterdam: Elsevier; 2007.
- Pérez-Morales M, Alvarado-Capuleño I, López-Colomé AM, Méndez-Díaz M, Ruiz-Contreras AE, Prospéro-García O. Activation of PAR1 in the lateral hypothalamus of rats enhances food intake and REMS through CB1R. *Neuroreport* 2012;23(14):814–8. <http://dx.doi.org/10.1097/WNR.0b013e328357615a>.
- Peyron C, Sapin E, Leger L, Luppi PH, Fort P. Role of the melanin-concentrating hormone neuropeptide in sleep regulation. *Peptides* 2009;30:2052–9.
- Prospéro-García O, Miller DR, Henriksen SJ. Hippocampal interneuron activity in unanesthetized rats: relationship to the sleep–wake cycle. *Neurosci Lett* 1993;156(1–2):158–62. [25].
- Rettori V, Fernandez-Solari J, Prestifilippo JP, Mohn C, De Laurentis A, Bornstein SR, et al. Endocannabinoids in TNF-alpha and ethanol actions. *Neuroimmunomodulation* 2007;14(3–4):188–92.
- Reyes Prieto NM, Romano López A, Pérez Morales M, Pech O, Méndez-Díaz M, Ruiz-Contreras AE, et al. Oleamide restores sleep in adult rats that were subjected to maternal separation. *Pharmacol Biochem Behav* 2012;103(2):308–12.
- Rueda-Orozco PE, Soria-Gómez E, Montes-Rodríguez JC, Pérez-Morales M, Prospéro-García O. Intrahippocampal administration of anandamide increases REM sleep. *Neurosci Lett* 2010;473(2):158–62.
- Santucci V, Storme JJ, Soubrié P, Le Fur G. Arousal-enhancing properties of the CB1 cannabinoid receptor antagonist SR141716A in rats as assessed by electroencephalographic spectral and sleep–waking cycle analysis. *Life Sci* 1996;58(6):PL 103–110.
- Tortorolo P, Lagos P, Monti JM. Melanin-concentrating hormone: a new sleep factor? *Front Neurol* 2011;2:14.
- Verret L, Goutagny R, Fort P, Cagnon L, Salvert D, Léger L, et al. A role for melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. *BMC Neurosci* 2003;9:4–19.
- Williams RW, Rakic P. Three-dimensional counting: an accurate and direct method to estimate numbers of cells in sectioned material. *J Comp Neurol* 1988;278:344–52.
- Willie JT, Sinton CM, Maratos-Flier E, Yanagisawa M. Abnormal response of melanin-concentrating hormone deficient mice to fasting: hyperactivity and rapid eye movement sleep suppression. *Neuroscience* 2008;156(4):819–29.
- Yamanaka A, Sakurai T, Katsumoto T, Yanagisawa M, Goto K. Chronic intracerebroventricular administration of orexin-A to rats increases food intake in daytime, but has no effect on body weight. *Brain Res* 1999;849:248–52.