

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**PARTICIPACIÓN DE LA CISTATINA C  
EN LA REGULACIÓN DEL SUEÑO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**RUBÉN GONZÁLEZ RIVERA**

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA DE LA LUZ NAVARRO ANGULO.**

**MÉXICO D. F.**

**NOVIEMBRE 2008**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



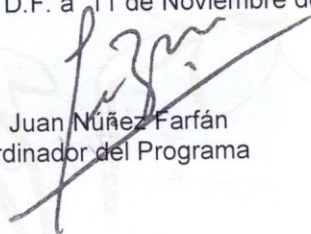
**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 18 de Agosto de 2008, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **RUBÉN GONZÁLEZ RIVERA** con número de cuenta **85263633** con la tesis titulada: **"PARTICIPACIÓN DE LA CISTATINA C EN LA REGULACIÓN DEL SUEÑO"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA DE LA LUZ NAVARRO ANGULO:**

Presidente:	DR. LEÓN FEDERICO CINTRA McGLONE
Vocal:	DR. OSCAR PROSPÉRO GARCÍA
Vocal:	DR. JAVIER VELÁZQUEZ MOCTEZUMA
Vocal:	DRA. SELVA LUCIA RIVAS ARANCIBIA
Secretario:	DRA. MARÍA DE LA LUZ NAVARRO ANGULO
Suplente:	DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA
Suplente:	DRA. ELSA GUADALUPE ESCAMILLA CHIMAL

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F. a 11 de Noviembre de 2008.

  
Dr. Juan Núñez Farfán  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado.



## PRESENTACIÓN

# “PARTICIPACIÓN DE LA CISTATINA C EN LA REGULACIÓN DEL SUEÑO”

### **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES:**

Al Posgrado en Ciencias Biológica de la U.N.A.M.

Al CONACyT por la beca que me otorgó con número de becario 142925.

A la DGEP por la beca que me otorgó.

A los donativos de los proyectos de: PAPIIT con clave IN222007 y CONACyT con clave 25128N otorgados a la Dra. Luz Navarro A.

A los miembros del Comité Tutorial: Dr. Javier Velázquez Moctezuma, Dr. Abraham Landa y a la Dra. Luz Navarro.

Al jurado por revisar este escrito de Tesis, integrado por: Dr. Leon Cintra , Dr. Oscar Prospero, Dr. Javier Velázquez, Dra. Selva Rivas, Dra. Luz Navarro, Dr. Abraham Landa y la Dra. Elsa Escamilla.

Este trabajo de Tesis se realizó en el Laboratorio de Neuroinfecciones del Dr. Oscar Prospero García y en el Laboratorio de Neuroendocrinología de mi Tutora, la Dra. Luz Navarro Angulo en la Facultad de Medicina de la U.N.A.M.



## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES:**

A la Dra. Luz Navarro, por su confianza y ayuda en los diferentes retos que enfrente para poder concluir exitosamente este trabajo.

Al Dr. Oscar Prospero, por las facilidades para realizar los trabajos de registro de sueño en su laboratorio, así como por sus críticas.

A la Dra Marina Martínez Vargas por su valiosa colaboración en la realización de este trabajo.

A mi padre Guillermo González Damián. Por todos sus consejos, apoyo moral e incondicional durante toda mi vida. Y porque es una persona a la que admiro absolutamente.

A Maru, porque ha sido un pilar de apoyo sumamente importante, para poder lograr metas que ni siquiera existían en mi imaginación y gracias a tí fructificó este potencial para lograr metas.

A Xchel, Mexitli Atzin y a Zyanya Ixchel por su hermosa existencia.



## **“MARU”**

**Eres un manantial que inundas de felicidad mi mundo  
De exuberante belleza  
Eres tan hermosa como las alas del huitzitzilin  
Y frágil como la corola de una orquídea  
Tan aromática como una otonlalax  
tu belleza satura mis sentidos  
Y ocasiona que te respire en los colores de los pensamientos  
Te vea en el poctli de la madre selva  
Te sienta en el sabor del nectar de las rosas  
Te escuche en el murmullo del aleteo del papalotl  
Te palpe en el canto del zenzontle  
Te deguste en el firmamento  
Y sienta el fulgor de tu felicidad  
Tan contagioso como la radiación de la sonrisa  
de nuestros tepitzin  
Xchel, Mexi y Zyanyi**

**“ZYANYA IXCHEL”**

**Mi preciosa piltzintli y tan esperada cihuatl  
has rebosado de felicidad mi vida  
Tú la Xocoyotl de tus Icnihuitli,  
Tu sonrisa deslumbrante como el chalchihuitl y tzopelic  
acompañada con esos hermosos tentli,  
con tu hermosura como la papalotl y tu luz de copitl  
opacas a Tonatiuh y a metztli  
eres un ameyalli de tlaxochimaco tlamahuizoltic  
con solo tlachia tu linda ixtli  
mi corazón se pone paqui**

# ÍNDICE

<b>PORTADA</b>	
<b>JURADO</b>	•
<b>PRESENTACIÓN</b>	••
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	•••
<b>ÍNDICE</b>	
<b>ABREVIATURAS</b>	1
<b>RESUMEN</b>	4
<b>ABSTRACT</b>	5
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	6
<b>1. SUEÑO</b>	6
<b>1.2 ESTADOS DE VIGILANCIA</b>	7
1.2.1 Vigilia	8
1.2.2 Sueño sin movimientos oculares rápidos (nMOR)	9
1.2.3 Sueño con movimientos oculares rápidos (MOR)	10
1.2.3.1 Características fásicas y tónicas del sueño MOR	11
1.2.3.2 Células MOR on y células MOR off	12
1.2.3.3 Neuroanatomía del sueño MOR	12
1.2.3.4 Neuroquímica del sueño MOR	14
1.2.3.5 Privación selectiva de sueño MOR	16
1.2.3.6 Rebote de sueño MOR	18
<b>1.3 FUNCIONES DEL SUEÑO</b>	19
1.3.1 Teoría de la restauración y recuperación	20
1.3.1.1 Sueño y sistema monoaminérgico	21
1.3.1.2 Sueño y sistema inmune	22
1.3.1.3 Neurogénesis	24
1.3.2 Teoría de la conservación de la energía	24
1.3.2.1 Sueño y estrés oxidativo	26
1.3.3 Hipótesis de forrajeo y evitación de predadores	27
1.3.4 Funciones del sueño MOR	27
1.3.4.1 Sueño y estado de madurez	27
1.3.4.2 Consolidación de la memoria	28



<b>1.4 TEORÍA HUMEDA DEL SUEÑO</b>	<b>31</b>
1.4.1 Pieron	31
1.4.2 Monnier	32
1.4.3 Pappenheimer	33
1.4.4 Uchizono	33
1.4.5 Drucker	34
<b>1.5 PARTICIPACIÓN DE PROTEINAS DE SECRECIÓN EN LA REGULACIÓN DEL SUEÑO</b>	<b>34</b>
<b>1.6 PARTICIPACIÓN DE LA SÍNTESIS DE PROTEINAS EN LA REGULACIÓN DEL SUEÑO</b>	<b>35</b>
<b>1.7 INHIBIDORES DE SÍNTESIS DE PROTEINAS Y SUEÑO</b>	<b>35</b>
1.7.1 Sueño nMOR	35
1.7.2 Sueño MOR	36
<b>1.8 ESTADO ACTUAL DE LA INVESTIGACIÓN DE LAS PROTEINAS Y EL SUEÑO</b>	<b>36</b>
1.8.1 Proteoma y sueño	40
<b>2. PROTEASAS</b>	<b>41</b>
2.1 Función	41
2.2 Clasificación	42
2.3 Proteasas de cisteína	44
<b>3. CATEPSINAS</b>	<b>45</b>
3.1 Estructura y mecanismos de acción	45
3.2 Reacción catalítica	46
3.3 Síntesis, transporte y activación	47
3.4 Actividad fisiológica	48
3.5 Regulación de la actividad	50
3.5.1 Inhibidores endógenos	50
3.6 Catepsina H	51
<b>4. CISTATINAS</b>	<b>52</b>
4.1 Superfamilia de las cistatinas	52
4.2 Familia de la cistatina C	53
4.3 Cistatina C	53
4.3.1 Características estructurales del gen	54
4.3.2 Características estructurales de la proteína	55
4.3.3 Mecanismos de la inhibición de catepsinas	58
4.3.4 Distribución intracelular	58
4.3.5 Sitio de síntesis y localización	59
4.3.6 Sistema de recaptura	60
4.3.7 Producción y excreción	60
4.3.8 Participación en funciones no inhibitorias	60

4.3.8.1 Protección ante la muerte neuronal	61
4.3.8.2 Neurogénesis	61
4.3.8.3 Participación en procesos patológicos	62
<b>5. INHIBIDORES DE PROTEASAS Y SUEÑO</b>	<b>62</b>
5.1 Inhibidores endógenos	62
5.2 Inhibidores exógenos	63
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>64</b>
<b>III. HIPÓTESIS</b>	<b>65</b>
<b>IV. OBJETIVOS</b>	<b>65</b>
<b>V. MÉTODOS</b>	<b>66</b>
1.- Material biológico	66
2.- Variaciones diurnas de la CC	66
3.- Privación selectiva de sueño MOR	66
4.- “Florero invertido”	66
5.- Obtención de muestras biológicas	67
5.1 LCE	67
5.2 Plexo Coroideo	67
6.- Análisis de la expresión de CC y de CH	68
6.1 Cuantificación proteica	68
6.2 Electroforesis	68
6.3 Inmunoelectrotransferencia	68
6.4 Densitometría	69
7.- Registro de sueño	69
7.1 Administración de sustancias	69
7.2 Registros de sueño	69
8.- Temperatura corporal	70
9.- Análisis estadístico	70
<b>VI. RESULTADOS</b>	<b>71</b>
1.- Variaciones diurnas de la CC	71
2.- Privación selectiva de sueño MOR	72
3.- Administración de la CC	74
4.- Temperatura corporal	79
<b>VII. DISCUSION</b>	<b>80</b>

<b>VIII. CONCLUSIONES</b>	<b>90</b>
<b>IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>91</b>
<b>X. ANEXO</b>	<b>106</b>

## ABREVIATURAS

μg	Microgramo
μl	Microlitro
μV	Microvolt
4AII	Factor de iniciación eucariótico humano
a.a.	Aminoácido
Ac	Ácido
ACh	Acetilcolina
Arc	Proteína asociada que regula la actividad del citoesqueleto
Arg	Arginina
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Asn	Asparagina
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro (por sus siglas en inglés)
BiP	Proteína de unión a inmunoglobulina (por sus siglas en inglés)
CAAT	Citocina-Adenina-Adenina-Timina
CC	Cistatina C
CCg	Cistatina C glicosilada
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario (por sus siglas en inglés)
<i>c-fos</i>	Gen de expresión temprana
c-jun	Proteína de la familia Jun
jun-B	Proteína de la familia Jun
jun-D	Proteína de la familia Jun
cm	Centímetro
Cys	Cisteína
DSIP	Péptido inductor de sueño Delta (por sus siglas en inglés)
E64	Inhibidor de la enzima papaina
EcoG	Electrocorticograma
EEG	Electroencefalograma
EMG	Electromiograma
EOG	Electrooculograma
Fra-1	Gen miembro de la familia Fos
FRM	Formación reticular mesencefálica

GABA	Ácido gamma amino butírico
GABA <sub>A, B</sub>	Receptor tipo A, B a GABA
GABAérgicas	Neuronas que secretan al neurotransmisor GABA
GFAP	Proteína fibrilar ácida de la glía (por sus siglas en inglés)
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutámico
His	Histidina
HO-	Grupo hidroxilo
HS-	Grupo sulfidrilo
HSP27	Proteína de choque térmico 27 (por sus siglas en inglés)
Hz	Hertz
i.p.	Intraperitoneal
I2S	Iduronato-2-sulfatasa
IFN $\alpha/\beta$	Interferon $\alpha/\beta$
IL-1, -4, -10	Interleucina 1, 4, 10
Ile	Isoleucina
Kb	Kilobase
KDa	Kilo Daltones
LC	<i>Locus coeruleus</i>
LCE	Líquido cerebro espinal
LDT	Núcleo tegmental laterodorsal (por sus siglas en inglés)
LTP	Potenciación a largo plazo (por sus siglas en inglés)
MAO-A	Monoamino oxidasa A
MEROPS	Base de datos de peptidasas
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad (por sus siglas en inglés)
mm	milímetro
MOR	Movimientos oculares rápidos
nMOR	Sin movimientos oculares rápidos
MOR-off	Células que son inactivas durante el sueño MOR
MOR-on	Células que son activas durante el sueño MOR
Vigilia-MOR-on	Células que son activas durante la vigilia y durante el sueño MOR
NA	Noradrenalina

NADH	Dinucleótido de nicotinamida adenina en su forma reducida (por sus siglas en inglés)
NDR	Núcleo dorsal del rafe
NGFI	Factor de crecimiento neuronal inducible (por sus siglas en inglés)
NGFI-A	Factor de transcripción, proteína con dedos de zinc (por sus siglas en inglés)
NMDA	N-Metil-D-aspartato
°C	Grados centígrados
p.55	Receptor tipo 1 del factor de necrosis tumoral
PGO	Ondas ponto-geniculo-occipitales (por sus siglas en inglés)
pH	Potencial de iones hidrógeno
Phe	Fenilalanina
PPT	Núcleo tegmental pedúnculo pontino (por sus siglas en inglés)
pMOR	Privación selectiva de MOR
R`COOH	Extremo carboxilo
R`NH <sub>2</sub>	Extremo amino
Rab 4	GTPasa asociada con los endosomas
RGS 2	Proteína tipo 2 regulador de la señalización de la proteína G
ROS	Sustancias reactivas al oxígeno (por sus siglas en inglés)
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida adicionado con Dodecil-sulfato de sodio (por sus siglas en inglés)
SLD	Núcleo sublaterodorsal pontino (por sus siglas en inglés)
SNF2L	Proteína de remodelamiento de la cromatina
SOL	Sueño de ondas lentas
SPS	Sustancias promotoras del sueño
SV2B	Glicoproteína 2B de vesícula sináptica (por sus siglas en inglés)
TNF	Factor de necrosis tumoral (por sus siglas en inglés)
Trp	Triptófano

## RESUMEN

Dormir el tiempo necesario influye en la salud corporal y mental de los individuos, incluso la privación permanente de sueño tiene como consecuencia la muerte. Efectivamente la falta de sueño ocasiona un estado de ánimo inestable, depresión y ansiedad, entre otros problemas. El insomnio y/o la hipersomnolencia diurna son la 2ª causa de consulta médica. Más aún, los desordenes del sueño se han relacionado con un incremento en las enfermedades cardiovasculares y con la obesidad, por lo que resulta de gran importancia la investigación de los mecanismos y funciones del sueño.

El estudio del sueño, se ha abordado mediante diversas estrategias, entre ellas, la búsqueda de moléculas endógenas que participan en su regulación. En este sentido, nosotros analizamos a la cistatina C (CC) un inhibidor de un tipo especial de proteasas, las catepsinas. En este trabajo describimos la participación de la CC, en la regulación del sueño, en particular del sueño con movimientos oculares rápidos (MOR). Utilizamos ratas macho de la cepa Wistar, las cuales fueron divididas en tres grupos: control, privadas de sueño MOR (pMOR) y pMOR más rebote. Encontramos que, con la pMOR, se incrementa la concentración de la CC en líquido cerebroespinal (LCE) y se mantiene elevada después de un periodo de rebote de sueño, lo mismo ocurre con la concentración de una de las catepsinas, la catepsina H, en el plexo coroideo. Además observamos que existe una variación diurna en la concentración de la CC en LCE, presentando los valores mínimos a las 09:00 horas.

Asimismo, analizamos el efecto de la administración intracerebroventricular de la CC en la arquitectura del sueño, encontramos que ocasiona una disminución en la vigilia y un incremento de sueño MOR, acortando su latencia e incrementando su frecuencia. Estos efectos son más prominentes en las últimas horas de registro.

Estos resultados nos permiten sugerir que los inhibidores endógenos de proteasas participan en la regulación del sueño, incrementando la fase de sueño MOR, probablemente en los mecanismos que inician esta fase de sueño.

## ABSTRACT

Sleep well has a very important influence in the corporal and mental health of subjects, even permanent deprivation of the sleep has as consequence the death. The lack of sleep provokes feeling instability, depression and anxiety among other problems. The lack of sleep or diurnal hipersomnolence is the second cause of medical consult.

Sleep disorders are related with an increase in cardiovascular diseases and obesity. So is very important to analyse the functions and mechanisms of sleep. One approached has been the research of endogenous molecules that participate in sleep regulation.

We analyzed the role of Cystatin C (CC), an inhibitor of one kind of proteases, the cathepsins. In this study, we described the participation of CC in sleep regulation, in particular in rapid eye movement (REM) sleep.

Male Wistar rats were used, they were divided in three groups, control, REM sleep deprivation and REM sleep deprivation plus sleep rebound. We observed an increase of cerebrospinal fluid CC in REM sleep deprivation group as well as in rebound group. We also detected a diurnal variation of CC in cerebrospinal fluid, with a minimal value at 9:00 hours.

In another hand, we analyzed the effect of CC intracerebroventricular administration on sleep. The CC induced a decrease in wakefulness total time and an increase in REM sleep total time; this effect is mediated through frequency alteration and a decrease to REM sleep latency. The effect on the wakefulness and the REM sleep, were observed at the last hours registered. With these results, we are proposing that the CC participate in biochemical process that are actives once that REM sleep is installed.



# **I. INTRODUCCION**

## **1.- SUEÑO**

### **DEFINICION DE SUEÑO**

Dormir el tiempo necesario influye en la salud mental y corporal del sujeto, determina la calidad de las tareas motrices y cognitivas que se realizan durante la vigilia, incluso la privación permanente de sueño tiene como consecuencia la muerte (Rechtschaffen et al, 1989).

Existe la opinión relativamente generalizada de que unas horas de sueño son suficientes para contender con la vigilia del día siguiente, y que dedicar más tiempo al sueño es perder el tiempo. Actualmente, se estima que en las ciudades industrializadas las personas le dedican aproximadamente el 20% menos al tiempo total de sueño respecto al tiempo al que le dedicaban hace un siglo.

La falta de sueño ocasiona inestabilidad en el estado de ánimo, depresión, y ansiedad entre otros problemas; una encuesta reciente de la US National Science Foundation refiere que más del 50 % de los conductores de vehículos en los Estados Unidos de Norteamérica han aceptado haber manejado estando en somnolencia y más de una tercera parte se han quedado dormidos al volante. Se estima que cada año ocurren alrededor de 100,000 accidentes causados por conductores somnolientos provocando más de 150,000 muertes.

Aunado a lo anterior, los problemas por falta de sueño o por hipersomnolencia diurna son la 2ª causa de consulta al médico; el dolor es la primera (Mahowald & Schenck, 2005).

Por otra parte, aunque los desordenes del sueño se han relacionado con un incremento en las enfermedades cardiovasculares y con la obesidad, aun no se ha logrado describir una causa concluyente.

Así pues, resulta de gran importancia la investigación de los mecanismos y funciones del sueño (Anónimo, 2005).

El estudio del sueño, se ha abordado mediante diversas estrategias, una de éstas ha sido la búsqueda de moléculas endógenas que participan en su regulación. En este trabajo describiremos la participación de la cistatina C (CC) en la regulación del sueño, en particular del sueño con movimientos oculares rápidos (MOR). La CC es un péptido de secreción, inhibidor endógeno de proteasas, por lo que se revisarán brevemente las características de los estados de vigilia, tanto en el humano como en la rata, ya que fue el modelo animal utilizado en este trabajo; se hará énfasis en la participación de las proteínas y de las proteasas en la regulación del sueño. Se describirán los distintos tipos de proteasas, en particular las catepsinas y sus inhibidores haciendo hincapié en la CC.

## **1.2 ESTADOS DE VIGILANCIA**

Desde un punto de vista conductual, el sueño se caracteriza por la disminución en el movimiento corporal, la presencia de una posición estereotipada característica de cada especie y una reducida respuesta a los estímulos de baja intensidad tales como sonidos, toques etc. (Antrobus et al, 1997). Tomando en cuenta solo aspectos conductuales, se consideraba al sueño como un estado homogéneo. Sin embargo, si se incluye la evaluación de la actividad eléctrica del cerebro (electroencefalograma, EEG), la actividad ocular (electrooculograma, EOG) y muscular (electromiograma, EMG) los estados de vigilia, en los humanos, han sido clasificados en las siguientes fases: vigilia, sueño de ondas lentas (SOL) o sueño sin movimientos oculares rápidos (nMOR) y sueño MOR. Además el sueño nMOR se ha dividido en

cuatro etapas de la I a IV (Antrobus et al, 1997; Prospéro-García & Drucker-Colín, 1996).

### **1.2.1 Vigilia**

#### **a) En el humano**

En esta fase se presentan dos patrones de actividad electroencefalográfica:

1) Activación o desincronización: Conductualmente se caracteriza porque el sujeto está alerta, con los ojos abiertos y explorando su entorno. Poligráficamente el registro del EEG es de bajo voltaje 10-30  $\mu\text{V}$  y frecuencia alta, 16-25 Hz (actividad beta).

2) Actividad alfa o somnolencia: Conductualmente se caracteriza porque el sujeto está en reposo y con los ojos cerrados. El EEG es de 20-40  $\mu\text{V}$  y sinusoidal de 8-13 Hz (revisado en Kryger et al, 2000).

#### **b) En la rata**

Durante la vigilia, en la locomoción orientada (caminando, corriendo, apoyada en los cuartos traseros) el registro del Electrocorticograma (ECoG) es plano con actividad irregular, con una amplitud menor de 50  $\mu\text{V}$ , la actividad hipocampal es dominada por ondas regulares periódicas de 200  $\mu\text{V}$  y de 5-7 Hz llamadas ritmo theta.

Durante el estado de reposo activo o conducta automática (comiendo, acicalándose), el registro del ECoG se mantiene aplanado pero la actividad del hipocampo llega a ser desincronizada (Bures et al, 1967).

### **1.2.2 Sueño sin movimientos oculares rápidos (nMOR)**

Se denomina sueño nMOR porque en ésta fase de sueño no se presentan movimientos oculares rápidos. Se caracteriza porque en el animal, los músculos se encuentran relajados, aunque la actividad somática no está ausente.

Predomina la actividad del parasimpático, disminuye el ritmo cardiaco y la presión arterial, mientras que la actividad gastrointestinal se incrementa. En el inicio de esta fase de sueño, se presenta una progresiva hiperpolarización en neuronas tálamo-corticales, las cuales comienzan a descargar de manera oscilatoria, posiblemente algunas llegan a hiperpolarizarse más rápido que otras, dando como consecuencia las oscilaciones en el rango de ondas lentas, lo que explica que esta fase, se conozca también como SOL (Borbély et al, 1998).

#### **a) En el humano**

El sueño nMOR ha sido dividido en 4 etapas:

Etapa 1: Es la transición de la vigilia al sueño, en ésta fase se presentan ondas lentas de bajo voltaje, la actividad alfa disminuye, la activación es escasa, se presentan las ondas theta (3-7 Hz) y las ondas agudas del vertex.

Etapa 2: Se presenta un barrido de bajo voltaje, mezclado con husos de sueño, frecuencias de actividad de 12-14 Hz y de 0.5-2 Hz, los complejos K, que consisten en una onda delineada negativamente seguida por un componente positivo menor o igual a 0.5 Hz.

Etapa 3: Se presenta actividad de ondas lentas de alto voltaje, durante al menos el 20%, pero no más del 50% de la época, el registro consiste de "ondas delta" de amplitud de 75 mV y una frecuencia de 0.5-2 HZ.

Etapa 4: Se presenta actividad de ondas lentas de alto voltaje y las "ondas delta" se presentan en más del 50% de la época de registro (revisado en Kryger et al, 2000).

### **b) En la rata**

Esta fase de sueño se denomina, sueño quieto, el cual se caracteriza, porque la amplitud del registro del EcoG incrementa a 200  $\mu$ V con ondas lentas e irregulares de 2-3 Hz (Bures et al, 1967), ha sido dividido en dos etapas.

## **1.2.3 Sueño con movimientos oculares rápidos (MOR)**

### **a) En el humano**

El sueño MOR fue descrito en la década de los 50's por Aserinsky y Kleitman, posteriormente en la década de los 60's, Jouvét observó que el registro del EEG, durante esta etapa, era similar al de la vigilia, a pesar de presentar atonía muscular, por lo cual, lo denominó sueño paradójico, ya que los sujetos permanecían dormidos.

Este estado de sueño se caracteriza principalmente por la presencia de ráfagas de movimientos oculares rápidos, atonía muscular, disritmia cardiopulmonar, ensoñaciones vívidas y una intensa actividad cerebral (revisado en Kryger et al, 2000). La descripción de esta intensa actividad cerebral durante el sueño MOR, ocasionó que cambiara la impresión general de que “el sueño es simplemente para descansar” y dió origen a preguntas aún no contestadas, acerca de la función del sueño (Spiro, 2005), el sueño MOR ocupa el 20% del tiempo total de sueño.

El registro del EEG presenta un patrón de actividad desincronizado, de bajo voltaje 10-30  $\mu$ V y frecuencias mezcladas con un patrón de actividad rápida 20-50 Hz llamado ondas de “sierra dentada” en la proximidad de los movimientos oculares rápidos, otra característica, es la presencia de actividad rítmica theta 3-7 Hz, se presenta la actividad alfa (7-13 HZ), más lentos que en la vigilia y la actividad theta hipocampal rítmica en el EEG del vertex, una baja amplitud en el EMG y movimientos oculares en el EOG (revisado en Yoshimoto et al, 1999; Kryger et al, 2000).

## **b) En la rata**

Después de 10 a 15 minutos de sueño de ondas lentas, el registro del EcoG presenta cambios abruptos y llega a ser desincronizado, aparece la actividad theta de alta amplitud en el hipocampo. Esta fase corresponde a sueño MOR (Bures et al, 1967).

### **1.2.3.1 Características fásicas y tónicas del sueño MOR**

Los fenómenos fisiológicos que se presentan en el sueño MOR, se clasifican como elementos tónicos, aquellos que se presentan permanentemente durante el periodo de sueño MOR y elementos fásicos, aquellos que se presentan intermitentemente durante el periodo de sueño MOR.

Elementos tónicos: Atonía muscular, desincronización cortical, elevado umbral al despertar, ritmo theta hipocampal, incremento en la temperatura cerebral, poiquilothermia, actividad del bulbo olfatorio, tumescencia penil.

Elementos fásicos: Movimientos oculares rápidos, actividad muscular del oído medio, movimientos de la lengua, ráfagas de actividad de los músculos de las piernas, variabilidad en la actividad autonómica (respiratoria y cardiaca) y ondas ponto genículo occipitales (OPG). No se conoce si las ensoñaciones son elemento fásicos o tónicos (revisado en Kryger et al, 2000).

### **1.2.3.2 Células MOR-off y MOR-on**

Las estructuras cerebrales más importantes en la generación del sueño MOR son el puente y las porciones adyacentes del cerebro medio. Estas áreas y el hipotálamo contienen células cuya máxima actividad se observa durante el sueño MOR y son conocidas como células MOR-on, así como células cuya mínima actividad se presenta durante esta fase de sueño, son conocidas como células MOR-off, además se han descrito grupos neuronales activos durante la vigilia y el sueño MOR, son denominadas células vigilia-MOR-on.

Algunos grupos de células MOR-on utilizan como neurotransmisores ácido gamma amino butírico (GABA), acetilcolina (ACh), glutamato, glicina u orexina, mientras que las células MOR-off utilizan noradrenalina (NA), adrenalina, serotonina (5HT) e histamina. Se cree que la interacción entre las células MOR-on y MOR-off es la clave que controla al sueño MOR (Siegel, 2005)

### **1.2.3.3 Neuroanatomía del sueño MOR**

Lesiones neurotóxicas, aplicando ácido kaínico en el puente, donde se encuentran los núcleos tegmental pedúnculo pontino (PPT) y tegmental laterodorsal (LDT), indujeron la desaparición o disminución de sueño MOR, mientras que la microinyección de agonistas colinérgicos en la misma área, indujo sueño MOR (revisado en Monti & Monti, 2000). Estas evidencias, entre otras, apoyan el que estos núcleos sean los generadores del sueño MOR. Las neuronas colinérgicas de PPT/LDT proyectan al cerebro medio, formación reticular pontina y bulbar, al sistema límbico, al tálamo y cerebro basal anterior, también hay proyecciones LDT-LDT y LDT-PPT, las cuales tienen una función inhibitoria recíproca (revisado en Monti & Monti, 2000; Stenberg, 2007).

El núcleo PPT, está situado en el tegmento mesopontino dorsolateral y ha sido dividido en dos regiones, con base en la densidad de células: parte compacta y parte difusa. La parte compacta está formada por células

colinérgicas delimitadas por células noradrenérgicas, serotoninérgicas y dopaminérgicas. La parte difusa: rodea al tegmento mesopontino y contiene un amplio número de neuronas glutamatérgicas, también se han encontrado neuronas que secretan GABA (GABAérgicas) en los bordes del PPT.

El núcleo LDT, está localizado caudalmente, adyacente al PPT en la materia gris central y está bordeado medialmente por el núcleo tegmental dorsal de Gudden, más rostralmente, por el núcleo dorsal del rafe (NDR) y lateralmente por el *locus coeruleus* (LC), contiene neuronas colinérgicas, intercaladas con células no colinérgicas (principalmente glutamatérgicas).

Además de PPT y LDT, algunas evidencias apoyan la participación del núcleo sublaterodorsal pontino (SLD) en la generación del sueño MOR; por ejemplo este núcleo recibe aferencias tanto GABAérgicas como orexinérgicas del hipotálamo e incrementa la expresión de *c-fos* cuando hay un incremento de sueño MOR.

Las neuronas del SLD son tónicamente inhibidas por GABA durante la vigilia y sueño nMOR, ellas están, bajo un constante control glutamatérgico y no responden a carbacol, el SLD también proporciona proyecciones excitatorias a neuronas glicinérgicas de la formación reticular medular lateral y ventromedial. El inicio y mantenimiento del sueño MOR según algunos autores podría deberse a la activación de neuronas MOR-on localizadas en el SLD (Lu, 2006). La activación de estas neuronas, podría ser primariamente, debido a la remoción de una entrada inhibitoria tónica GABAérgica, presente durante la vigilia y sueño nMOR, en combinación con una constante y tónica entrada de glutamato. (Boissard et al, 2002).

Los núcleos colinérgicos PPT y LDT de la formación reticular pontina liberados de la inhibición serotoninérgica y noradrenérgica, tónicamente activan núcleos talámicos y éstos estimulan áreas corticales. En particular los núcleos intralaminares talámicos que proyectan hacia campos corticales difusos y los sobreestímula. Esta importante actividad neuronal, explica porque el nivel metabólico de energía global durante el sueño MOR es comparable al nivel de



la vigilia (revisado en Maquet & Frenck, 1997). Esta activación es modulada por la amígdala, incluso se considera que la activación de la amígdala y la corteza del cíngulo anterior pueden explicar los aspectos emocionales de las ensoñaciones (revisado en Maquet & Frenck, 1997).

#### **1.2.3.4 Neuroquímica del sueño MOR**

Diversos grupos de sustancias han sido involucrados en la regulación del sueño MOR, entre ellas, se encuentran algunos neurotransmisores, originalmente se propusieron a la ACh y NA, más recientemente se han añadido el GABA y el glutamato. La participación de péptidos y proteínas en la regulación del sueño MOR se revisará más adelante.

**Acetilcolina.** Hernández–Peón y Jouvet en la década de los 60's del siglo XX, fueron los pioneros en los estudios de la participación de la ACh en el sueño. Mostraron que el sistema reticular ascendente propuesto por Moruzzi y Magoun y cuya activación conducía a la desincronización de la corteza cerebral, es de naturaleza colinérgica (revisado en Navarro et al, 2000; Stenberg, 2007).

Como ya se menciona, los núcleos PPT y LDT involucrados en la generación del sueño MOR, son en su mayor parte colinérgicos. Estudios electrofisiológicos han mostrado, que más de la mitad de las neuronas de estos núcleos son MOR-on, y de un 5 a 10 % exhibe una actividad fásica con relación a las espigas PGO. Las neuronas colinérgicas de estos núcleos proyectan al cerebro medio, a la formación reticular pontina y bulbar, al sistema límbico, al tálamo y al cerebro basal anterior (Kayama & Sakai, 2000). La aplicación de agonistas colinérgicos en la formación reticular induce sueño MOR (Velázquez-Moctezuma et al, 1990).

**Noradrenalina (NA).** La teoría monoaminérgica propuesta por Jouvet consideraba que la NA participaba en la regulación del sueño, principalmente de sueño MOR, sin embargo, evidencias posteriores mostraron que las células

noradrenérgicas del LC, principal núcleo noradrenérgico, son del tipo MOR-off, mientras que durante la vigilia presentan su mayor frecuencia de disparo, por lo que este neurotransmisor, más bien parece estar involucrado en la regulación de la vigilia (Revisado en Navarro et al, 2000).

**GABA.** Se ha sugerido, que entradas GABAérgicas provenientes de la formación reticular, podrían inhibir a las neuronas del NDR durante el sueño MOR. La concentración de GABA en el NDR es mayor durante el sMOR comparado con la vigilia. El mucimol, un agonista del receptor a GABA tipo A ( $GABA_A$ ), aplicado en el NDR incrementa el sueño MOR, mientras que bicuculina o picrotoxina, antagonistas del receptor a GABA tipo B ( $GABA_B$ ), inducen la reducción del sueño MOR. Lo cual apoya la participación de GABA en la inhibición de neuronas serotoninérgicas y la facilitación del sueño MOR (revisado en Monti & Monti, 2000).

La neurotransmisión GABAérgica a través del receptor  $GABA_A$  en el PPT, facilita la generación del sueño MOR por supresión de la actividad de procesos relacionados a la vigilia en este núcleo (Tortero et al, 2002).

**Glutamato.** El neurotransmisor excitatorio glutamato, induce sueño MOR en el PPT, este efecto es mediado a través de la actividad de los receptores kainato, (Datta, 2002). El bloqueo del receptor N-Metil-D-aspartato (NMDA) con antagonistas específicos como el ácido D(-)-2 amino-5-fosfonopentanoico incrementa sueño nMOR por disminución de la vigilia (Datta, 2002). Una de las fuentes endógenas de glutamato se encuentra en el núcleo PPT, en subpoblaciones colinérgicas y no colinérgicas, otra fuente está en la formación reticular pontina, la cual proyecta hacia el PPT. La liberación de glutamato, puede actuar sobre los receptores tipo kainato, activando células del PPT, induciendo sueño MOR. El tiempo de activación de los receptores kainato, es muy importante para la regulación del sueño MOR. Los receptores a glutamato del tipo NMDA y metabotrópico tipo II en el PPT, participan en el incremento de sueño nMOR a expensas de la vigilia (Datta et al, 2002).

### 1.2.3.5 Privación selectiva de sueño MOR

Durante la privación selectiva de sueño MOR (pMOR), se presenta un incremento en la “necesidad o presión” para que se presente esta fase de sueño, la cual, es expresada por un incremento en la frecuencia de inicios de sueño MOR.

Uno de los métodos más utilizados para la pMOR, es el del “florero invertido o pedestal”, la pMOR por este método, durante 24 horas, ocasiona un incremento significativo de sueño MOR, durante las primeras 24 horas del periodo de rebote.

Por otra parte, la pMOR induce modificaciones en diversos sistemas de neurotransmisores. Por ejemplo, se ha observado un incremento de la tirosina hidroxilasa, enzima que participa en la síntesis de NA y el ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de la proteína transportadora de NA, la cual es responsable de la recaptura de NA y de mantenerla en las vesículas sinápticas en el LC (Basheer et al, 1998).

Durante el periodo de la pMOR se induce un incremento presináptico en la neurotransmisión monoaminérgica (noradrenérgica y serotoninérgica) en el cerebro de rata. Hay una disminución de la actividad de la enzima Monoamino Oxidasa A (MAO A) en tallo cerebral y un incremento en la médula oblongada (Pérez & Benedito, 1997).

Durante la pMOR se mantiene el disparo de neuronas noradrenérgicas del LC, a pesar de que se incrementa la concentración de GABA, posiblemente para resistir los efectos adversos de la privación. Sin embargo, dado que las neuronas noradrenérgicas no cesan su disparo, parece que durante la pMOR, puede haber una aferencia activa sobre neuronas adrenérgicas MOR-off para su continuo disparo. Se puede decir, que durante la pMOR, más que la disminución de GABA, el incremento en la estimulación de neuronas MOR-off no permite el establecimiento de sueño MOR; así la actividad continua del LC

incrementa la concentración de noradrenalina que a su vez activa neuronas GABAérgicas en PPT/LDT, lo cual mantendría a las neuronas MOR-on inhibidas y de esta forma se previene el inicio de sueño MOR (Majumdar and Mallick, 2003).

La NA secretada por LC tiende a hiperpolarizar y autoinhibir neuronas del LC, esto podría desinhibir las neuronas colinérgicas MOR-on, las cuales podrían empezar a disparar y se podrían activar las neuronas GABAérgicas y adrenérgicas en el LC. La inhibición por GABA y la autoinhibición en LC podría causar que las neuronas noradrenérgicas cesaran su disparo y se iniciara el sueño MOR. La continuación de sueño MOR podría depender de la disponibilidad de GABA. Las entradas GABAérgicas a PPT/LDT pueden venir de interneuronas del LC y de su entorno o de neuronas localizadas a distancia, entre las que podrían estar incluidas las neuronas GABAérgicas del núcleo *prepositus hipoglossus* (PrH) (Mallick et al, 2001).

En la rata, la privación de sueño ocasiona un incremento en el estrés oxidativo, que provoca daño membranal en el hipocampo y en regiones subcorticales cerebrales, sin ningún efecto en la neocorteza, estos cambios son más marcados en regiones cerebrales que contienen una alta tasa de síntesis de proteínas y con una alta tasa de formación de sustancias especies reactivas al oxígeno (ROS), por ejemplo en el núcleo supraóptico hipotalámico, tallo cerebral e hipocampo (revisado en Siegel, 2005).

Después de la pMOR durante 96 hrs, se observa el incremento en la actividad de la enzima Acetilcolinesterasa en el puente, el cual es un sitio generador del MOR y en estructuras que reciben proyecciones colinérgicas del puente, como el tálamo y medula oblongada, este incremento en la actividad de la enzima sugiere una alta tasa de recambio de ACh (Benedito & Camarín, 2001).

Por otra parte, la pMOR tiene un efecto antidepresivo, ya que una posible función del sueño MOR es la de disminuir la actividad y expresión

emocional por causar cambios en el sistema monoaminérgico, también ocasiona una aceleración en pérdida de calor corporal durante la vigilia subsecuente (revisado en Siegel, 2005).

#### **1.2.3.6 Rebote de sueño MOR**

El concepto de rebote de sueño MOR fue propuesto por Dement en 1960, cuando a un organismo se le priva de sueño MOR, al permitirle dormir nuevamente, se acorta la latencia al primer periodo de sueño MOR y se incrementa el tiempo total de sueño MOR, a este periodo se le denomina rebote de sueño (revisado en Suchecki et al, 2000). La “reparación” se lleva a cabo como un mecanismo protector y con un subsecuente incremento compensatorio u homeostático de sueño MOR (Jouvet, 1994). El incremento en la duración o intensidad del sueño puede permitir al animal recuperarse y adaptarse a los cambios ambientales, restaurando el metabolismo neuronal, recuperando la temperatura corporal óptima y mejorando el aprendizaje, por lo tanto, el rebote es importante para la homeostasis cerebral y adaptación conductual (revisado en Marinesco et al, 1999), el incremento en los intentos para entrar a sueño MOR, ante la privación, es un indicativo de la ausencia de sueño MOR (Ocampo-Garcés et al, 2000).

Aunque los mecanismos que subyacen al incremento en la tendencia al sueño MOR y el subsiguiente periodo de rebote permanecen sin ser esclarecidos, se piensa que están implicados tanto procesos homeostáticos como circadianos y los relacionados al estrés (Deurveilher & Hennevin, 2001).

El incremento en sueño nMOR y sueño MOR después de la pMOR por el método del florero invertido, puede ser debido a una cascada de eventos implicados por la activación de neuronas amigdaloides por las aferencias noradrenérgicas que vienen del LC (Charifi et al, 2000).

Durante el rebote de sueño, los niveles de serotonina (5HT) se mantienen significativamente bajos, esta reducción, puede ser a causa del

incremento en la actividad de las neuronas GABAérgicas, la cual se incrementa durante el periodo de rebote.

### **1.3 FUNCIONES DEL SUEÑO**

A pesar de más de un siglo de estudio científico del sueño, incluyendo las tres últimas décadas de investigación intensiva, utilizando las tecnologías más avanzadas, la función del sueño resulta aún elusiva. Si lo comparamos, por ejemplo, con la respiración pulmonar, cuya función es clara, oxigenar la sangre, y que pudo estar presente, inicialmente, en vertebrados primitivos como peces dulceacuícolas que periódicamente estaban expuestos a la sequía, así que los peces capaces de respirar aire podían sobrevivir cuando los lagos y ríos se secan; subsecuentemente, la respiración hizo posible, a través de adaptaciones evolutivas, llenar los requerimientos energéticos de la locomoción terrestre, o bien aérea; y posteriormente, incluso, permitió una forma de comunicación, la vocalización, entre los vertebrados superiores. Similarmente podríamos considerar que el sueño tuvo una función primordial inicial y que más tarde pudo haberse modificado y servir para otras funciones, que no necesariamente compartan todos los organismos que presentan sueño, por lo que no podríamos esperar que su función sea la misma en todos los organismos estudiados (Antrobus et al, 1997).

Con relación a la función del sueño en mamíferos, la mayoría de las teorías sugieren un papel en la restauración y conservación de la energía para el sueño nMOR y de activación cerebral periódica para el sueño MOR (Siegel, 2005).

Así pues, entre las diversas funciones asignadas al sueño, destacan, las siguientes:

### 1.3.1 Teoría de la restauración y recuperación

Esta hipótesis sostiene que el sueño sirve para revertir o restaurar algunos procesos bioquímicos o fisiológicos que han sido desgastados progresivamente durante la vigilia previa. Esta hipótesis ha prevalecido a pesar de evidencias que no la apoyan, en gran medida porque explica el amplio deterioro psicológico y conductual que experimentamos al día siguiente de una mala noche de sueño, pues sería obvio pensar que si en la vigilia tenemos un alto grado de actividad, desgaste físico y mental, durante el sueño recuperaríamos energía y restableceríamos al sistema para iniciar otro ciclo de actividad. De tal suerte, que se ha sugerido que una de las funciones del sueño es su papel restaurador.

Consistente con esta hipótesis es el hecho de que el mayor pico de secreción de la hormona de crecimiento, hormona fundamentalmente anabólica, se presenta, en humanos, en las primeras horas de sueño; aún si el patrón de sueño es desfasado y ocurre en las horas de luz (Antrobus et al, 1997).

Además en consistencia con esta hipótesis esta la existencia de un rebote de sueño, una mayor cantidad y/o intensidad del sueño posterior a una privación de éste. Sin embargo los estudios en humanos mantenidos en condiciones de libre corrimiento, muestran que los episodios de sueño tienden a ser más cortos después de largos periodos de vigilia, lo que estaría en contradicción con una interpretación restaurativa del sueño. Estos estudios muestran que la duración del sueño se encuentra estrechamente correlacionada al ritmo de temperatura corporal, y que los episodios más largos de sueño son aquellos que comienzan cercanos al pico máximo de temperatura corporal (Kryger et al, 2000).

Sin embargo la hipótesis restaurativa no es apoyada por el hecho de que la síntesis de proteínas, en todo el cuerpo, se reduce durante el sueño; aunque esto se atribuye al periodo de ayuno durante la noche, ya que en sujetos

alimentados continuamente vía intra gástrica, la síntesis de proteínas no disminuye durante la noche (Antrobus et al, 1997). También en contradicción con esta hipótesis es el hecho de que posterior a periodos de ejercicio no se incrementa de manera significativa el sueño, algunos estudios que encuentran un incremento en la cantidad de sueño nMOR, más que al ejercicio se puede atribuir este incremento a la elevación de la temperatura (Kryger et al, 2000).

#### **1.3.1.1 Sueño y sistema monoaminérgico**

Aunque en concordancia con la hipótesis restaurativa, podemos encontrar que el sueño puede tener un papel regulador del sistema monoaminérgico. El sueño MOR puede resensibilizar a las células MOR-off (células que secretan noradrenalina, serotonina, histamina, hipocretina) las cuales están activas tónicamente durante la vigilia, incrementando la cantidad y actividad de las enzimas que los sintetizan, el mecanismo de síntesis, de transporte y los receptores. Así pues, el sueño podría tener una función de resensibilización, la cual puede ser específica para un tipo de receptor y la región cerebral (Siegel, 2005).

#### **1.3.1.2 Sueño y sistema inmune**

Así mismo el sueño parece tener un papel restaurador en el sistema inmune, por ejemplo las infecciones bacterianas provocan un incremento inicial en el tiempo que los sujetos infectados pasan en sueño nMOR, seguido por un periodo de supresión de éste, el sueño MOR disminuye mientras dura la infección, este efecto se produce aun cuando los sujetos son inoculados con bacterias muertas (revisado en Opp & Toth, 2003).

Estudios experimentales en humanos muestran que la infección por rinovirus o virus de la influenza, ocasiona una pérdida de sueño durante el periodo de incubación, pero incrementa el sueño durante el periodo sintomático, sin afectar la calidad del sueño y el número de despertares. Virus



muerdos o inactivos no inducen cambios en el sueño en ninguna especie animal investigada (revisado en Opp and Toth, 2003). Estas observaciones sugieren que en las infecciones virales, a diferencia de las infecciones bacterianas, la replicación viral es necesaria para tener efectos en el sueño. El ARN de doble cadena formado en el hospedero durante la replicación viral induce el incremento de citocinas que median los efectos en el sueño. Entre las citocinas implicadas se encuentran la interleucina-1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral (TNF), estas citocinas se traslapan en su actividad biológica y a menudo antagonizan, por ejemplo el TNF induce sueño de ondas lentas, este efecto es atenuado en animales pretratados con el receptor a IL-1 soluble y el antagonista de TNF inhibe el incremento en sueño de ondas lentas inducido por IL-1; así mismo la IL-1 incrementa el sueño de ondas lentas en todas las especies que se ha revisado (revisado en Opp & Toth, 2003).

Otra citocina implicada ha sido el interferón  $\alpha/\beta$ , (IFN  $\alpha/\beta$ ) que induce la sincronización cortical en registro de EEG de rata, incrementa el sueño de ondas lentas en conejos y reduce la latencia a sueño MOR en monos, de manera anecdótica se ha observado que en humanos tratados con IFN reportan excesiva somnolencia (revisado en Opp & Toth, 2003).

De los resultados obtenidos de estudios en animales se ha observado que las infecciones inducen alteraciones en el sueño a menudo bifásicas, observándose periodos de incremento del sueño, seguidos por periodos de supresión de éste. La fase de supresión del sueño puede reflejar la influencia de citocinas IL-4 ó IL-10 que inhiben la síntesis de IL-1 y TNF y modulan de esta manera los efectos fisiológicos de las citocinas pro-inflamatorias. La administración central de IL-10 o de IL-4 reduce espontáneamente el sueño en ratas y conejos. Ratones que carecen del gen funcional de IL-10 exhiben más sueño que los animales genéticamente intactos (revisado en Opp & Toth, 2003).

El incremento de sueño que se observa en los sujetos tras una infección parece tener un efecto favorable en la recuperación; por ejemplo, la inoculación de *E. coli*, *S. aureus* o *C. albicans* en conejos, provocó una prolongada fase de

incremento de sueño, seguido por una prolongada reducción del sueño en algunos conejos, los conejos que eventualmente murieron exhibieron menos sueño que los que sobrevivieron a la infección (Toth et al, 1993).

La privación crónica de sueño en ratas ocasiona la proliferación bacteriana intestinal, penetración microbiana en nódulos linfáticos, septicemia y la eventual muerte. Esto implica que la prolongada privación de sueño provoca insuficiencia del sistema inmune y una anormal defensa del hospedero que puede comprometer la salud, favoreciendo la susceptibilidad a las enfermedades y exacerbando las ya existentes (Everson & Toth, 2000).

### **1.3.1.3 Neurogénesis**

Otra función del sueño, que podríamos considerar restaurativa, es la generación de neuronas funcionales en animales adultos. En el bulbo olfatorio, en el epitelio de la zona subventricular de los ventrículos laterales y en la capa celular subgranular del giro dentado del hipocampo se ha observado neurogénesis; la privación de sueño total (durante 2-3 días) bloquea la proliferación de células en estas zonas. Así pues el sueño puede tener la función de permitir o facilitar la neurogénesis (revisado en Siegel, 2005).

### **1.3.2 Teoría de la conservación de la energía**

De acuerdo a esta hipótesis, el sueño sirve para reducir la tasa metabólica y la temperatura en animales endotérmicos, disminuyendo así el alto costo energético que representa la endotermia. La tasa metabólica es entre 7 y 10 veces más alta en los animales endotérmicos respecto a los ectotérmicos cuando ambos se tienen a la misma temperatura corporal. Esta teoría se apoya en la continuidad electrofisiológica entre la hibernación y el sueño, considerando que la hibernación representa la extensión de un proceso fisiológico iniciado durante el sueño. Cuando un sujeto está en periodo de sueño, su tasa metabólica disminuye aproximadamente 10 % y el calor es

disipado a través de vasodilatación periférica, que provoca una disminución en su temperatura corporal entre 1 y 2°C; este descenso es controlado a través de una disminución en el punto de ajuste del núcleo preóptico hipotalámico. Sin embargo se ha considerado que una reducción del 10 % en la tasa metabólica durante el sueño es insuficiente para que el sueño haya prevalecido por selección natural, aunque el ahorro energético puede ser considerablemente mayor en animales expuestos a temperaturas fuera de la zona termoneutral. Por otra parte, las estructuras neuroanatómicas y los neurotransmisores implicados en la regulación de la temperatura, también han sido involucradas en la regulación del sueño (Antrobus et al, 1997).

Evidencia adicional en favor de esta hipótesis es la presencia universal del sueño nMOR en mamíferos y aves, animales endotérmicos, mientras que no es evidente en reptiles y otros animales ectotérmicos, aunque cabe la posibilidad de que este hecho refleje simplemente el que estos animales no poseen las estructuras necesarias para mostrar un EEG con ondas lentas. La termogénesis aparece simultáneamente con el sueño nMOR durante el desarrollo en mamíferos altriciales, lo que sería de esperarse si esta fase de sueño disminuye los requerimientos energéticos requeridos para la endotermia. En los animales endotérmicos, existe una relación directa entre la superficie corporal y la tasa metabólica, los animales grandes tienen una tasa metabólica más baja, en comparación a su peso. Las especies con mayor actividad metabólica pasan un mayor tiempo en sueño durante el día, en particular en el sueño nMOR (revisado en Siegel, 2005).

La temperatura corporal es regulada a un nivel más bajo durante el sueño nMOR que durante la vigilia, pero existe una marcada inhibición de la termorregulación durante el sueño MOR.

La temperatura corporal y la ambiental son importantes influencias en la distribución de los estados de vigilancia. El tiempo total de sueño se reduce cuando los sujetos son expuestos a temperatura ambiente fuera de la zona termoneutral y la cantidad de sueño MOR es máxima en los límites superiores de esta zona (Kryger et al, 2000; Heller & Ruby, 2004).

En animales de estudio se ha observado que la temperatura cerebral disminuye durante el sueño nMOR comparada con la vigilia, pero se incrementa durante el sueño MOR, estos cambios en la temperatura cerebral pueden ser debido a cambios en la temperatura de perfusión sanguínea del cerebro, por cambios en el metabolismo cerebral o por cambios en el flujo sanguíneo cerebral. Los cambios en el flujo sanguíneo durante el sueño nMOR reflejan ajustes vasomotores y dependen de la temperatura ambiental, en contraste el sueño MOR parece ser un estado en el cual los cambios regionales del flujo sanguíneo indican una interrupción en la homeostasis térmica. Incluso, Thomas Wehr en 1992, propuso que la función del sueño MOR es calentar al sistema nervioso central, él se basó en que el metabolismo y la temperatura del cerebro se incrementan en la transición del sueño nMOR a sueño MOR, y que el sueño MOR es acompañado por una variedad de eventos que producen calor, como los movimientos oculares rápidos, las ráfagas de actividad muscular, él también observó que en humanos se presenta más sueño MOR en la fase tardía de la noche de sueño, cuando la temperatura corporal está en el nivel más bajo (Kryger et al, 2000). El enfriamiento del tallo cerebral aislado produce un incremento en el sueño MOR mientras que el calentamiento del cerebro basal anterior produce un incremento en el sueño nMOR, esto sugiere que en animales intactos los mecanismos que den lugar a una disminución de temperatura en el tallo cerebral pudieran disparar episodios de sueño MOR (McGinty & Szymusak, 1990; Siegel, 2005; Kryger et al, 2000).

### **1.3.2.1 Sueño y estrés oxidativo**

El sueño, además, se ha relacionado con la defensa contra el estrés oxidativo, ya que, una alta tasa metabólica genera altos niveles de ROS por la mitocondria y un largo periodo de sueño tendría la función de interrumpir el daño a las células cerebrales inducido por la acumulación de ROS. El sueño facilita la síntesis y actividad de moléculas que protegen a las células cerebrales del estrés oxidativo, un tiempo suficiente de sueño permite la

reparación o remplazamiento de componentes celulares esenciales para las neuronas y la glia. Se ha hipotetizado que la relación de conservación de la energía; resultado del sueño a la actividad metabólica de la vigilia, resulta en la “necesidad” de dormir para la recuperación del cerebro, varía entre las especies (revisado en Siegel, 2005).

### **1.3.3 Hipótesis de forrajeo y evitación de depredadores**

La supresión de actividad motora durante el sueño previene que los animales atraigan la atención de los depredadores y por lo tanto disminuiría su vulnerabilidad. A pesar de que parece una hipótesis razonable, resulta difícil establecer evidencias a favor o en contra, además no se entiende que una conducta tan compleja como el sueño sirva únicamente para mantener inmóvil a un animal, hay conductas de congelamiento que mantienen a los animales inmóviles sin necesidad de que estén dormidos. También en contra de ésta hipótesis, los animales cuando están dormidos son más proclives a ser depredados, dado que el sueño incrementa el umbral de sensibilidad a estímulos externos; tampoco explicaría la presencia del sueño MOR (Antrobus et al, 1997).

### **1.3.4 Funciones del sueño MOR**

Respecto a la función del sueño MOR, en particular, ha habido diversas propuestas, por ejemplo, que estimula el desarrollo cerebral, la discriminación visual fina, la consolidación de la memoria, o bien que permite eliminar los recuerdos no relevantes.

#### **1.3.4.1 Sueño y el estado de madurez**

La cantidad de sueño MOR está relacionada con el estado de madurez que se tiene al nacer. Animales altriciales tienen más sueño MOR que los

animales precociales; ésta característica se observa al nacer y se mantiene en la edad adulta.

La presencia de gran cantidad de sueño MOR en las primeras etapas de nacimiento y la disminución del tiempo de sueño MOR conforme se va madurando, que se observa en los mamíferos terrestres, puede estar relacionada con la función del sueño MOR, ya que durante esta fase se presenta una intensa actividad neuronal y puede estar implicada en el desarrollo y maduración cerebral. Según esta hipótesis, el sueño MOR serviría para mantener o establecer conexiones cerebrales durante periodos cruciales del desarrollo.

También se ha propuesto que en los adultos, el sueño MOR tenga la función de estimular al cerebro, para revertir los efectos del sueño nMOR sobre la conducta que se desarrollará en la vigilia inmediata. Los animales generalmente despiertan espontáneamente del sueño MOR, estando más alertas, lo cual podría conferirles cierta ventaja selectiva (revisado en Siegel, 2005).

#### **1.3.4.2 Consolidación de la memoria**

Existe controversia acerca de la función del sueño en la memoria, en la actualidad se ha propuesto la hipótesis de que el sueño participa en los procesos de consolidación de la memoria, así como también en particular que el sueño MOR participa en procesos para olvidar trazas de memorias innecesarias. Existen tres evidencias relevantes que apoyan la teoría de la consolidación de la memoria durante el sueño MOR. La primera consiste en que el aprendizaje causa un incremento en la duración del sueño MOR. La segunda consiste en que el procesamiento de la memoria ocurre durante el sueño MOR. La tercera se origina de los estudios de privación, lo cual sugiere que si el sueño MOR es prevenido la memoria no es consolidada (Siegel, 2005)

La idea de que la duración del sueño MOR puede ser incrementada con el aprendizaje, está basada en la hipótesis de que el incremento en el aprendizaje requiere un incremento en la consolidación de la memoria y por lo tanto de más tiempo de sueño MOR.

La hipótesis de que la consolidación de la memoria ocurre durante el sueño es apoyada por la reactivación neuronal posterior a los episodios de aprendizaje, lo cual puede ser la evidencia de procesos nemónicos, tal reactivación podría estar implicada en el desarrollo neuronal y podría tener un papel en la desaparición de restos de memorias aunque también podría no tener algún papel en la plasticidad neuronal. En trabajos experimentales se ha descrito que los husos de sueño se incrementan después de periodos de intenso aprendizaje. También se ha descrito una distribución cortical diferencial de los husos de sueño después del aprendizaje de pruebas verbales contra pruebas visoespaciales (Marshall & Born, 2007).

En Humanos la privación de sueño MOR afecta el aprendizaje de pruebas que implican el aprendizaje asociativo pareado, aprendizaje verbal y retención de anagramas. En pruebas de discriminación visual, la privación de sueño MOR impidió el aprendizaje de una tarea a la que se acababa de someter a los sujetos, mientras que la privación de sueño nMOR impidió la ejecución de una tarea previamente bien aprendida, sin embargo el mejoramiento nocturno se correlaciona con una o más etapas específicas de sueño; el mejoramiento en la ejecución se correlaciona con una siesta durante el día, en contraste, la estabilización de la memoria puede ocurrir durante periodos de la vigilia sin la intervención del sueño (revisado en Stickgold, 2005).

En sujetos entrenados en pruebas de la torre de Hanoi, que implica el movimiento de los 5 discos del poste de la izquierda hacia el poste de la derecha; se ha observado que cuando son evaluados una semana después del entrenamiento hay un mejoramiento en la ejecución, sin embargo si se reduce el sueño MOR de manera experimental la noche después del entrenamiento, no se observa tal mejora (revisado en Stickgold, 2005).

En otro ejemplo de aprendizaje de procedimiento complejo, a los sujetos se les enseñó un algoritmo para resolver un grupo de problemas matemáticos para el que existía una solución simple que ellos no conocían, ninguno la descubrió durante el entrenamiento, doce horas después, un grupo de sujetos encontró la manera de resolver el problema; y la probabilidad de resolverlo se incrementó al doble después de una noche de sueño (revisado en Stickgold, 2005).

Otra forma de estudiar si el sueño MOR participa en los procesos de consolidación de la memoria ha sido a través de las lesiones en estructuras neuroanatómicas promotoras del sueño MOR. Un sujeto que sufrió una lesión en el tallo cerebral, fue estudiado durante 10 años, entre otros estudios que se le realizaron se encuentran los registros poligráficos de sueño, en los cuales se observaba casi ausente el sueño MOR, a pesar del daño, el sujeto ejecuta tareas cognitivas, no se reportan problemas de memoria.

Por otra parte, en relación a la potenciación a largo plazo (LTP) y que se ha considerado como un modelo celular de aprendizaje, Rose & Dunwiddie (1986) sugirieron que la LTP ocurre en el hipocampo relacionado al ritmo theta, ellos aplicaron un pequeño número de impulsos eléctricos en CA1 y se produjo LTP, pero únicamente cuando los impulsos fueron separados por el tiempo normal de lapso entre dos ondas theta, aproximadamente 200 milisegundos.

El ritmo theta, aparentemente es el medio natural por el cual los receptores NMDA son activados en neuronas del hipocampo, posteriormente Pavlides, Grenstein y Winson demostraron que la LTP fue dependiente de la presencia y fase del ritmo theta, ya que si el impulso es dado en el pico del ritmo theta, la LTP es inducida, pero si el impulso es dado en el valle, la LTP no es inducida (revisado en Winson, 2003).

En 1983, McNaughton y colegas registraron simultáneamente el patrón de actividad neuronal en el hipocampo de rata, e identificaron a las células de lugar. Los ensambles de las neuronas de lugar que codifican para un espacio



en la vigilia, reprocesan la información durante el sueño de ondas lentas y también durante el sueño MOR. Esto sugiere que el procesamiento de la memoria durante el sueño puede tener dos etapas, una etapa preliminar durante el sueño de ondas lentas y una última etapa durante el sueño MOR cuando ocurren las ensoñaciones. Durante el sueño MOR cada especie podría procesar la información más importante para la supervivencia, tal como la localización de alimento o el medio de depredación o escape, aquellas actividades en las que el ritmo theta está presente. Durante el sueño MOR esta información puede ser nuevamente procesada e integrada con experiencias pasadas para proporcionar el inicio de una estrategia conductual (revisado en Winson, 2003).

#### **1.4.- TEORÍA HÚMEDA DEL SUEÑO**

Como ya se menciona en la introducción, una de las estrategias utilizadas en el estudio del sueño ha sido la búsqueda de sustancias endógenas capaces de inducir y/o regular el sueño. Uno de los métodos más empleados en esta búsqueda ha sido la privación total de sueño y pMOR, con la finalidad de inducir la acumulación de los posibles factores inductores de sueño. La búsqueda de estos factores coincide con la llamada teoría húmeda del sueño.

##### **1.4.1 Pierón**

Esta aproximación se inicia con Pierón en 1913, con la descripción de los efectos de una sustancia, no dializable y termolábil, a la cual llamó hipnotoxina, que se acumula en el líquido cerebro espinal (LCE) durante la vigilia e induce sueño en perros que han dormido *ad libitum* (Revisado en: Próspero-García et al, 1997).

Los estudios de Pierón fueron retomados por Schenedorf e Ivy en 1939, quienes obtuvieron LCE de perros privados de sueño y lo inyectaron en perros

que habían dormido *ad libitum*. A los perros receptores se les había extraído LCE previamente para no incrementar la presión intraventricular, se observó que el LCE inducía sueño en los perros receptores, con lo cual validaban los resultados obtenidos por Pierón (revisado en Borbély & Tobler, 1989).

Posteriormente a la búsqueda de la hipnotoxina se incorporaron varios seguidores, entre los que destacan los grupos de investigación de Monier, Pappenheimer, Uchizono y Drucker-Colín.

#### **1.4.2 Monnier**

Monnier y colaboradores, a inicios de la década de los 60', del siglo pasado, realizaron experimentos de estimulación en los núcleos intralaminares en un conejo donador, mantenido con circulación cruzada con un conejo receptor. Observaron que se inducían ondas lentas en el EEG en ambos conejos, si la estimulación en el conejo donador disminuía, también disminuía la actividad de ondas lentas en el EEG en ambos conejos. Monier y Hosli sometieron a diálisis la sangre venosa del conejo donador e inyectaron a conejos control. El dializado indujo actividad de ondas lentas en el EEG. El efecto del dializado se conservaba si se administraba intracerebroventricularmente. A partir de estas muestras se identificó el nonapéptido Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu, que fue denominado péptido inductor de sueño delta (DSIP) (revisado en Borbély & Tobler, 1989).

#### **1.4.3 Pappenheimer**

Pappenheimer y su grupo en 1965, obtuvieron LCE de cabras privadas de sueño, y lo inyectaron a gatos y ratas, observando sueño conductual. El tiempo del efecto inductor de sueño del LCE se relacionaba con el periodo de privación. A este factor inductor de sueño se le denominó factor S. Utilizando ultrafiltración observaron que se trataba de una molécula de bajo peso molecular. Posteriormente el factor S también fue purificado de tejido cerebral

de cabras, ovejas, conejos y del tallo cerebral de crías de caballos, así como de orina obtenida de conejos, lo cual además indicaba que se trata de una molécula estable que atravesaba la barrera hematoencefálica, llegaba a torrente circulatorio y además era excretada en riñón y con los mismos efectos de la molécula obtenida del cerebro. El factor S induce un incremento en el sueño nMOR y en la vigilia, cuando es tratado con la enzima pronasa, desaparece su actividad biológica. El factor S es un glicopéptido que contiene a los aminoácidos, ácido glutámico, alanina, ácido diaminopimélico y ácido murámico (revisado en Borbély & Tobler, 1989).

#### **1.4.4 Uchizono**

El grupo de trabajo de Uchizono, a principios de la década de los 70's del siglo pasado privó de sueño a ratas con descargas eléctricas en las extremidades, después del periodo de privación, obtuvieron algunas estructuras cerebrales: tallo cerebral, incluyendo mesencéfalo e hipotálamo, lo homogenizaron, dializaron y liofilizaron. La administración intraperitoneal (i.p) de éste liofilizado en ratas control disminuyó la actividad locomotora e incrementó la actividad de ondas lentas en el EEG, es decir sueño nMOR. El componente somnogénico de este liofilizado fue denominado Sustancia Promotora de Sueño (SPS), la SPS inyectado intracerebroventricularmente también tiene un efecto inductor de sueño, incrementando el sueño nMOR, teniendo el mismo efecto en ratones. Posteriormente se identificó a uridina como uno de los componentes de la sustancia SPS (revisado en Borbély & Tobler, 1989).

#### **1.4.5 Drucker Colín**

Drucker Colín y su grupo, a principios de la década de los 70's, abordaron el problema del estudio de las moléculas inductoras de sueño. Ellos inyectaron el perfusado obtenido de gatos dormidos por el método de inyección-perfusión en la formación reticular mesencefálica (FRM) cuyo EEG

estaba siendo registrado simultáneamente e indujeron sueño en los gatos receptores (Drucker-Colín, 1973). Estos estudios dieron gran relevancia a la participación de las proteínas en la regulación del sueño.

### **1.5 PARTICIPACIÓN DE PROTEÍNAS DE SECRECIÓN EN LA REGULACIÓN DEL SUEÑO**

En 1975 Drucker y colaboradores describieron un patrón cíclico en los niveles de proteínas de perfusados obtenidos de la FRM de gatos a lo largo del cíclico sueño-vigilia. Las concentraciones mayores ocurrían durante el sueño MOR (Drucker Colín et al, 1975). También describieron la presencia de dos bandas proteicas de alto peso molecular (45 y 73 KDa) presentes sólo en los perfusados obtenidos durante el sueño MOR (Spanis et al, 1976). Posteriormente obtuvieron anticuerpos contra estos perfusados y observaron que su administración provocaba una reducción significativa del sueño MOR, sin alterar al sueño nMOR (Drucker-Colín et al, 1980).

### **1.6 PARTICIPACIÓN DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS EN LA REGULACIÓN DEL SUEÑO**

En estudios de autoradiografía realizados en ratas, para evaluar la síntesis de proteínas por la incorporación de leucina marcada con carbono<sup>14</sup>, observaron que la incorporación de ésta en el tejido cerebral, se correlaciona con la prevalencia del sueño de ondas lentas, por lo tanto sugieren que el sueño nMOR induce una alta tasa de síntesis de proteínas, sin que exista una correlación en la tasa de síntesis de proteínas con el sueño MOR o con la vigilia (Ramm & Smith, 1990), en trabajos realizados en monos se encontró una mayor incorporación de leucina marcada asociada al sueño profundo (Nakanishi et al, 1997).

## **1.7 INHIBIDORES DE SÍNTESIS DE PROTEÍNAS Y SUEÑO**

Otro enfoque en la investigación de la participación de las proteínas en la regulación del sueño, fue a través del empleo de inhibidores de síntesis de proteínas. Estos trabajos los inició Stern y colaboradores en 1972, se ha descrito que los inhibidores de síntesis de proteínas tienen efectos de manera diferencial en el sueño, incrementándolo, disminuyéndolo o afectando sueño nMOR o sueño MOR (Stern et al 1972).

### **1.7.1 Sueño nMOR**

La cicloheximida administrada i.p. disminuyó el tiempo total de sueño nMOR en el primer día de administración, mientras que su administración i.c.v. lo incrementó (Stern et al, 1972). La administración de anisomicina en el área preóptica lateral de ratas ocasiona un incremento en la etapa 2 del sueño nMOR (Methippara et al, 2008).

### **1.7.2 Sueño MOR**

El efecto de los inhibidores de síntesis de proteínas en el sueño MOR, está más documentado, y en general coincide con una reducción de sueño MOR. La cicloheximida administrada i.p. y la puromicina administrada i.p. e i.c.v., ambas disminuyen el sueño MOR en gatos, únicamente el primer día de administración, la administración i.c.v. de la ciclohexamida en los días 2 al 10 tiene el efecto opuesto en el sueño MOR, probablemente debido a un rebote de sueño (Stern et al, 1972), asimismo la administración subcutánea de cicloheximida en ratones disminuye el sueño MOR (revisado en Rojas-Ramírez et al, 1997). También se ha descrito que la reducción en el sueño MOR causada por los inhibidores de síntesis de proteínas anisomicina, cloramfenicol y vincristina en ratas, es debido a una reducción en la frecuencia de los periodos de sueño MOR, sin afectar su duración promedio (Rojas-Ramírez et al, 1977). Estos inhibidores también modificaron las características fásicas del sueño MOR (Drucker-Colín et al, 1979). El cloramfenicol, en dosis altas, reduce

selectivamente el sueño MOR en gatos y en ratones. La administración crónica de cloranfenicol ocasiona la disminución de sueño MOR, disminuyendo la frecuencia de los periodos de sueño MOR, sin tener algún efecto sobre la vigilia o el sueño nMOR (Drucker-Colín & Espejel, 1980). La administración localizada a través de microdiálisis de anisomicina tiene diferentes efectos, dependiendo del área y de la fase del fotoperiodo en que se administre: en el área preóptica administrada durante la noche incrementa la fase 2 de sueño nMOR, mientras que en el área perifornical/hipotálamo lateral, administrada durante el día ocasiona un incremento en el sueño MOR (Methippara et al, 2008).

## **1.8 ESTADO ACTUAL DE LA INVESTIGACIÓN DE LAS PROTEÍNAS Y EL SUEÑO**

Gracias al desarrollo de técnicas de biología molecular, se inició otro enfoque de la investigación del sueño, a través de la búsqueda de genes y sus productos proteicos que participan en su regulación. La activación de genes de expresión temprana, se utiliza como marcador de actividad celular, así como la activación diferencial de otros genes y su correlación con los estados de vigilancia.

Los trabajos pioneros en la búsqueda de los genes que están regulando los estados de vigilancia datan de principios de la década de los 90's; Rhyner y colaboradores, empleando la técnica de clonación de Ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA) sustractivo, estudiaron cambios en la expresión de RNAm en el cerebro anterior de ratas después de un periodo de privación de sueño total; identificaron 10 transcritos, de los cuales cuatro se expresaban en niveles bajos y seis se expresaban en altos niveles en el grupo de privación, los genes de los transcritos, no estaban reportados, la secuencia de aminoácidos de dos de los transcritos, que disminuyen su expresión, correspondieron a neurogranina y dendrina, ambas proteínas son abundantes en corteza cerebral, hipocampo y amígdala. La dendrina es abundante en espinas dendríticas. La privación de sueño disminuye los niveles de ambas proteínas en la corteza cerebral (revisado en Cirelli & Tononi, 1999a).

En otros estudios y a través del uso de las técnicas de hibridación *in situ* e inmunocitoquímica, se ha explorado la participación de genes de expresión temprana como *c-fos*, NGFI-A, *c-jun* y *jun B* en el sueño. Se ha observado que los niveles de *c-fos* y NGFI-A se incrementan en áreas cerebrales como la corteza, caudado-putamen, formación hipocampal, área preóptica medial y lateral, diversos núcleos talámicos y del tallo cerebral en ratas mantenidas en vigilia respecto a ratas a las que se les permitió dormir (revisado en Cirelli & Tononi, 1999a). El incremento en la concentración de la proteína Fos en el área preóptica se relaciona con la duración de la vigilia previa, así, la expresión del gen *c-fos* en su producto, la proteína Fos en el área preóptica durante la vigilia puede ser para formar parte integral de los mecanismos que evalúan la duración e intensidad de la vigilia previa y/o de los mecanismos homeostáticos ejecutores que se llevan a cabo durante el sueño (revisado en Cirelli & Tononi, 1999a). La aplicación de fragmentos de DNA antisentido para *c-fos* en el área preóptica medial de ratas, ocasionó un incremento del tiempo de vigilia (Cirelli et al, 1995).

Utilizando la técnica de expresión diferencial (differential display) de RNAm, Cirelli y Tononi en 1999(b) analizaron la expresión de 7,000 genes en corteza cerebral de ratas que habían dormido *ad libitum* y de ratas con vigilia espontánea o bien privadas de sueño por periodos cortos; encontraron sólo catorce transcritos que variaban su expresión por el estado conductual, ocho que se expresaron más en vigilia y que su secuencia era conocida correspondieron a genes mitocondriales; de los seis restantes, cuya secuencia no había sido reportada, cuatro se expresaban más en vigilia y dos en sueño.

Posteriormente y a través de la técnica de microarreglos de DNA, Cirelli y colaboradores (2004) analizaron los transcritos de la corteza cerebral de ratas sacrificadas durante el sueño espontáneo, privadas de sueño y durante vigilia espontánea; observaron que el 10% de los transcritos cambiaron su expresión entre el día y la noche, la mitad de ellos fueron regulados por el sueño y la vigilia, independientemente de la hora del día. Entre los genes que

incrementaron su expresión durante la vigilia, se encuentran algunos genes mitocondriales que participan en la fosforilación oxidativa y en el transportador de glucosa a nivel de la glía, los genes de chaperonas que responden a incrementos de temperatura (HSP27 y  $\alpha$ -B cristalina) y los que se activan ante un mal plegamiento de proteínas (BiP, Grp94), genes relacionados con la síntesis de glutamato (glutamina sintasa y glutaminasa), los genes que responden a la sensibilidad de la despolarización membranal y actividad sináptica (RGS2, Homer/Vesl, caseína cínasa 2 etc); los genes relacionados con la actividad dependiente de la plasticidad neuronal y potenciación a largo plazo (Arc, BDNF, Homer/Vesl y NGFI), así como los genes relacionados con procesos de traducción proteica (factor 2 de la elongación traduccional y factor de iniciación 4All). Entre los genes que se expresaron más durante el sueño, se encontraron los que regulan la liberación de calcio de las pozas intracelulares (calcineurina), los de receptores a inositol trifosfato, los genes que regulan la neurotransmisión inhibitoria (receptores a GABA y glicina), genes relacionados con la consolidación de la memoria (proteína cínasa IV dependiente de calcio), genes implicados en la plasticidad neuronal (receptor a inositol pirofosfato, proteína 12 FK506 de unión, etc.), genes que codifican para p55, cínasa de fosfatidil inositol, genes que participan en el tráfico de sustancias a través de la membrana, durante la exocitosis y liberación de neurotransmisores (SV2B, complexina II etc.), genes relacionados con el reciclaje de vesículas sinápticas (Rab4, -5, -11, 14 etc.), genes que participan en la síntesis y mantenimiento de la membrana celular en general, de la mielina y de genes que codifican para enzimas implicadas en la síntesis y transporte de colesterol. Vale la pena señalar que estos cambios a nivel del RNAm de los genes que varían según el estado de vigilia o de sueño, no necesariamente se correlacionan con cambios funcionales, los cuales son determinados por eventos traduccionales y postraduccionales (Cirelli et al, 2004).

Terao y colaboradores en 2003, analizaron la participación de otros genes de expresión temprana, incluyendo 7 miembros de la familia fos/jun (c-fos, fosB, antígenos relacionados a fra-1, 2, junB, c-jun, junD) y otros tres genes de expresión temprana (egr-1, egr-3 y nur77), en la regulación del sueño en ratones, particularmente en el cerebro basal anterior, tálamo, hipotálamo,



corteza cerebral, cerebelo, puente y medula. Observaron un incremento en la expresión de algunos de estos genes en las siguientes estructuras: el cerebro basal anterior (c-fos, fosB, fra-1, -2, nur-77 y egr-1), la corteza cerebral (c-fos, fosB, fra-2, nur-77, junB, egr-1, -3), el tálamo (c-fos, fosB, nur-77) y en el cerebelo (c-fos, fosB, fra-2, nur-77) para los grupos con privación de sueño, mientras que en hipotálamo, médula y puente no encontraron ninguna diferencia. La expresión de los genes c-jun y junD no se modifican en ninguna estructura cerebral estudiada en este trabajo. Estos resultados sugieren una expresión regional coordinada de genes en las diferentes estructuras cerebrales relacionadas con la privación de sueño. De estos resultados se propone que la corteza cerebral, cerebro basal anterior y cerebelo sean más sensibles a la privación de sueño y que el sueño favorece las funciones de las diferentes estructuras, afectando la síntesis de diferentes macromoléculas (Terao et al, 2003).

Con estas mismas técnicas de biología molecular, se ha abordado el estudio del sueño en otras especies, aunque en otras especies se utilizan criterios diferentes para denominar estados conductuales homólogos a los estados de vigilancia. Se denomina como estado de reposo y estado de actividad, por ejemplo en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), en la que diversos genes que participan en la promoción de un estado conductual han sido identificado también en la rata, por ejemplo, el gen de la enzima citocromo oxidasa, el gen BiP (Hsc70-3) (chaperona del retículo endoplásmico) y la enzima arilalquilamina la cual participa en el catabolismo de monoaminas (Shaw et al, 2000).

### **1.8.1 Proteoma y sueño**

El estudio de los procesos básicos del sueño también se ha abordado a través del enfoque proteómico, en el cual se utilizan técnicas de electroforesis bidimensional y espectrometría de masas para la identificación de las proteínas que varían con la manipulación experimental. Con la aplicación de estas técnicas en estructuras promotoras del sueño, como el cerebro basal anterior,

se ha descrito que la privación de sueño varió la expresión de 89 proteínas entre las que se encuentran once del citoesqueleto o asociadas con sinápsis, por ejemplo la tubulina y la GAP43, mostraron modificaciones postraduccionales, un incremento en la tirosinación de isoformas de la  $\alpha$ -tubulina y la fosforilación de la GAP43 se asociaron con la privación de sueño, mientras que la proteína asociada sinaptosomal 25 (SNAP25) disminuye y la proteína anifisina es fosforilada con la privación de sueño (Basheer et al, 2005).

## **2. PROTEASAS**

Las enzimas proteolíticas o proteasas hidrolizan el enlace peptídico de manera específica; mediante un ataque nucleofílico al carbono del grupo amida (revisado en Chapman et al, 1997). De esta forma regulan el procesamiento y maduración, actividad y función de proteínas localizadas tanto intra como extracelularmente. Se ha estimado que alrededor del 2 % de los genes codifican para este tipo de enzimas (Rawlings et al, 2006). Éstas desempeñan un papel fundamental en todos los organismos vivos; son esenciales para la supervivencia y es muy importante mantener su actividad bajo un estricto control; además de estar regulada su síntesis y recambio, se han descrito diversos inhibidores endógenos que regulan su actividad (Puente et al, 2003). Existen numerosas enfermedades atribuibles a la alteración de sus niveles o bien al mal funcionamiento de los inhibidores de proteasas, (Rawlings et al, 2004).

### **2.1 Función**

Las proteasas inician, modulan y terminan un amplio rango de funciones celulares a través del procesamiento de proteínas que participan en el control de procesos esenciales como replicación de ADN, ciclo celular, proliferación, diferenciación y migración, morfogénesis, remodelamiento de tejido,

crecimiento neuronal, homeostasis, reacciones inmunes, angiogénesis, apoptosis y reproducción, entre otros. Muchos microorganismos, virus y parásitos utilizan las proteasas como factores invasivos, el veneno de algunos animales contiene altas concentraciones de proteasas para la destrucción de tejidos o para evadir la respuesta inmune del hospedero (revisado en López-Otín & Overall, 2002).

## **2.2 Clasificación**

Para la clasificación de las proteasas se utilizan como criterios, la reacción que catalizan, la naturaleza química de su sitio catalítico y las relaciones evolutivas con base en su estructura. El criterio más importante en la clasificación de las enzimas es la reacción que catalizan, utilizando éste criterio, las proteasas se dividen en exopéptidasas y endopéptidasas, entre las primeras se encuentran las carboxi y las amino peptidasas, que degradan respectivamente, el extremo carboxi terminal y el amino terminal de las proteínas. Las endopeptidasas degradan enlaces internos. Basándose en su mecanismo catalítico, se han clasificado en: proteasas de ácido (ac) aspártico, de cisteína, de ac. glutámico, de treonina, de serina o bien metaloproteasas (Fig. 1). Las proteasas tipo serina, en el sitio catalítico tienen una serina y las tipo cisteína, una cisteína; utilizan, respectivamente, a los grupos HO- y HS- de sus cadenas laterales como agentes nucleofílicos. Las peptidasas de tipo aspártico, en su sitio catalítico presentan dos residuos de ac. aspártico y las metaloproteasas, tienen un ión metal en su sitio catalítico (comúnmente es el zinc); estas proteasas utilizan al aspartato o bien al metal para inmovilizar y polarizar una molécula de agua para que el oxígeno funcione como nucleófilo (Chapman et al, 1997). Las proteasas que no han sido asignadas a un grupo de subclase se denominan "otras" EC 3.4.99 (Barret, 1994; Chwieralski et al, 2006).

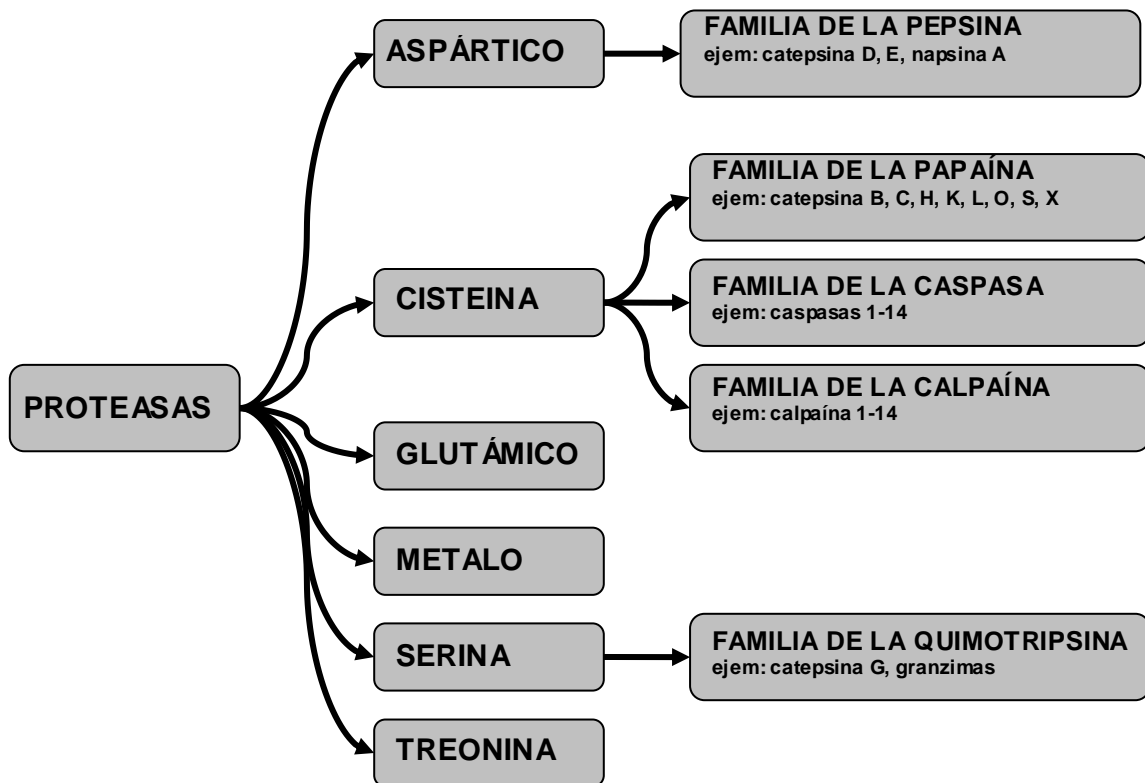


Fig. 1 Clasificación de las proteasas con base en la naturaleza química de su sitio catalítico. Tomado de Chwieralski et al 2006.

Al conjunto de proteasas que son expresadas por una célula, tejido u organismo en un momento específico o condición fisiológica se le conoce como degradoma (López-Otín & Overall, 2002). Recientemente se ha comparado el degradoma de humano con el de ratón; el de humano está constituido por al menos 553 proteasas y sus homólogos, distribuidos en 5 clases: 21 proteasas de ac. aspártico, 143 de cisteína, 186 metaloproteasas, 176 de serina y 27 de treonina. El degradoma de ratón es más complejo, con al menos 628 miembros; 514 siendo verdaderos ortólogos de las proteasas humanas. Este incremento en la complejidad, principalmente deriva de la expansión de las familias de proteasas asociadas a funciones inmunológicas y reproductivas (Puente et al, 2003).

### 2.3 Proteasas de cisteína

Las proteasas de cisteína se encuentran formadas por cerca de 80 familias, considerando una familia como un conjunto de peptidasas con similitud estadísticamente significativa en la secuencia de a.a. Las familias pueden estar constituidas por uno o más miembros o dividirse en subfamilias cuando hay evidencia de una divergencia ancestral dentro de la familia. A su vez, las familias homólogas se han agrupado en clanes. Se considera que un clan agrupa a todas las peptidasas descritas a la fecha, que provienen de un gen ancestral común; éste representa a una o más familias que muestran evidencias de sus relaciones evolutivas por la similitud de sus estructuras terciarias, y/o por la secuencia de los residuos en el sitio catalítico o por motivos comunes alrededor del sitio catalítico. (Rawlings et al, 2006).

Las proteasas de cisteína presentan, en su sitio activo, dos residuos de cisteína e histidina, la mitad de ellas, han sido descritas en virus. En los mamíferos se encuentran tres familias principales de las proteasas de cisteína, la familia de la papaína (familia C1), la de la calpaína (familia C2) y la de las caspasas (familia C14); las dos primeras pertenecen al clan CA y la tercera al clan CD (Fig. 1).

La familia C1 está integrada por enzimas homologas a la papaína (catepsinas), que generalmente son lisosomales (vacuolares) o proteínas de secreción, estas enzimas son sintetizadas con un péptido señal y un propéptido en el extremo aminoterminal. El corte proteolítico del propéptido es necesario para la activación de la proenzima, la mayoría de los propéptidos son homólogos al de la papaína, cuyo motivo de homología es "ERFNIN (Glu, Arg, Phe, Asn, Ile, Asn)". A ésta familia pertenecen las catepsinas B, C, H, K, L, M, N, S, T, V y W (Rawlings & Barret, 1994; Grzonka et al, 2001).

### 3. CATEPSINAS

#### 3.1 Estructura y mecanismo de acción

Las catepsinas son proteínas con peso molecular entre 20 y 35 KDa, la excepción es catepsina C, que es una molécula oligomérica con un peso molecular de aproximadamente 200 KDa.

Las estructuras tridimensionales de las catepsinas muestran un alto grado de similitud entre sí y con la estructura de la papaína, están formadas por dos dominios, el dominio aminoterminal formado principalmente de estructura  $\alpha$ -hélice, mientras que el extremo carboxilo terminal formado principalmente por hojas- $\beta$ , los dos dominios se abren en la parte superior, formando la hendidura del sitio activo en forma de "V", en el centro de la hendidura se encuentran los residuos del sitio activo Cys158 e His292 (Fig. 2).

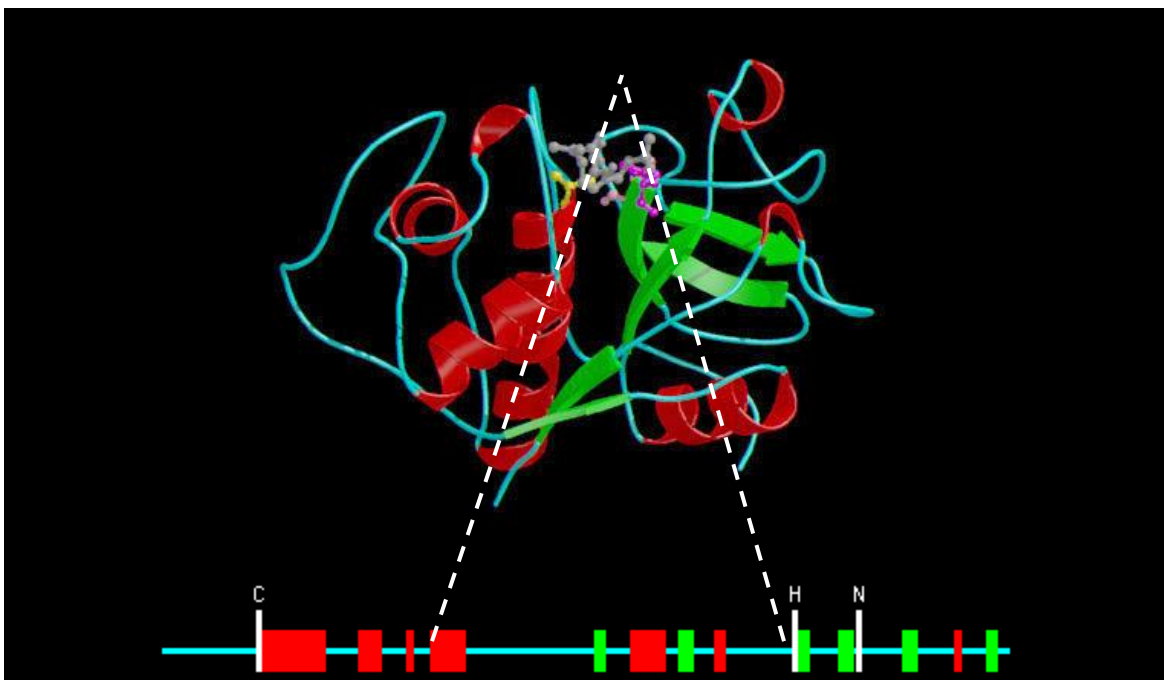


Fig. 2 Estructura de la papaína. La estructura alfa hélice, se muestra en rojo, la hoja beta en verde. La cisteína 158 en amarillo, la histidina 292 en púrpura, el ac. aspártico 308 en rosa y el E64 en gris. Tomada de MEROPS database Rawlings et al, 2006.

La Cys158 está ubicada en el extremo aminoterminal de la hélice central e Hist 292, forma parte del dominio derecho en estructura de barril, y es auxiliada por enlaces de hidrógeno entre Asn308 e His292 (Cyglér & Mort,

1997). En la forma activa de la enzima ambos a.a. están cargados formando un par iónico, Cis158 está cargado negativamente, exhibe un inusualmente valor bajo de pKa, en un rango de 2.5 a 3.5, ésta carga negativa parece ser estabilizada por un fuerte campo electrostático positivo, presumiblemente originado por el dipolo de la alfa hélice central. La cadena polipeptídica del sustrato, se une a lo largo de la hendidura del sitio activo en una conformación extendida. La amida de la cadena del sustrato, forma una red de enlaces de hidrógeno con residuos conservados de la superficie de la enzima, mientras que el extremo de cadena, se une en sitios de enlace superficiales de izquierda a derecha de la hendidura del sitio activo, las asas que salen del centro que abrazan los dominios derecho e izquierdo forman sitios de unión, la secuencia de alineamiento basada en la estructura ha mostrado que los residuos de la región del sitio activo Cis158 e His292 y los residuos de la cadena principal que interaccionan con la unión al sustrato son Gln152, Gly198, Gly199 y Trp310 junto con Pro135 en el extremo amino terminal (revisado en Turk et al, 2000).

### **3.2 Reacción catalítica**

Las catepsinas catalizan la hidrólisis de enlaces peptídico, amida, éster, tio éster y tiono éster. Esta hidrólisis se lleva a cabo en tres etapas (Fig. 3).

- I.- Asociación (unión no covalente) de la enzima libre y el sustrato.
- II.- Formación del complejo enzima sustrato (formación del complejo Michelis).
- IIIa.- Acilación de la enzima con la formación y liberación del primer producto que es la amina R'NH<sub>2</sub>.
- IIIb.- La enzima-acil reacciona con una molécula de agua (deacilación) formando el segundo producto. La liberación de este producto resulta en la regeneración de la enzima libre (Rawlings & Barret, 1994).

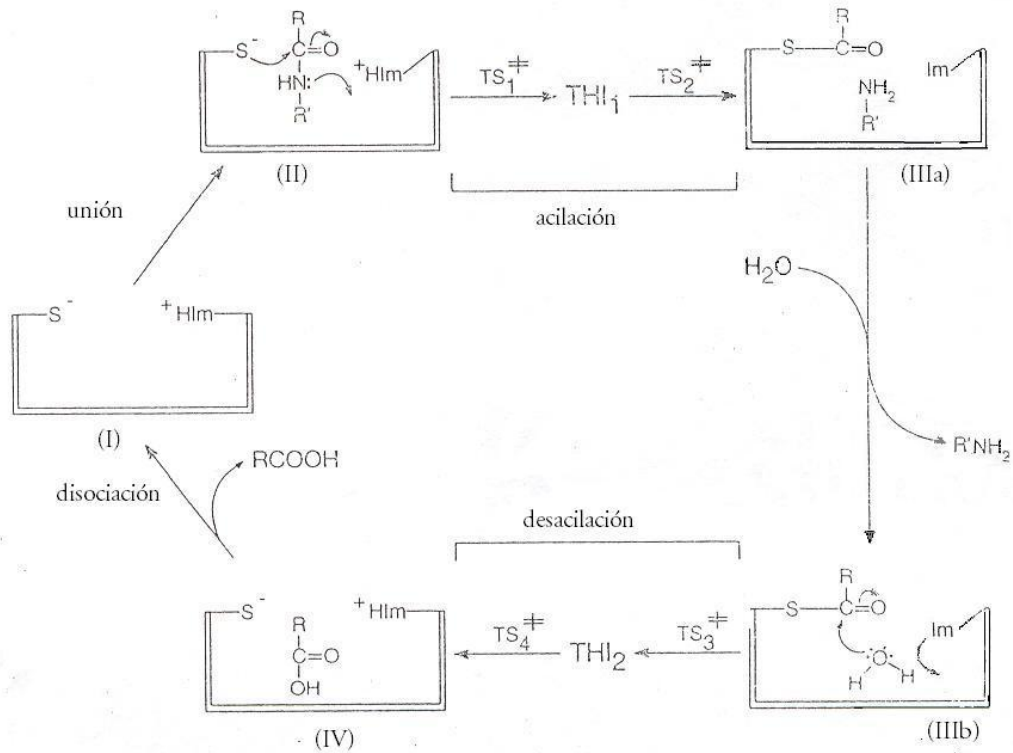


Fig. 3 Mecanismo de reacción enzima-sustrato de las proteasas de cisteína (Catepsinas). Tomado de Rawlings & Barret, 1994.

### 3.3 Síntesis, transporte y activación

La biosíntesis de las proteasas lisosomales está regulada en todos sus niveles: transcripción, procesamiento del transcrito primario, traducción, procesamiento post traduccional, glicosilación y transporte hacia los lisosomas.

El péptido señal de la pre-propeptidasa se considera como una estructura de reconocimiento, la cual dirige a la propeptidasa recién sintetizada hacia el interior del retículo endoplásmico rugoso. La propeptidasa sufre N-glicosilación en varios sitios, principalmente por N-acetil glucosamina, ac. siálico, fucosa y varios residuos de manosas, los cuales son fosforilados después de pasar a través del aparato de Golgi, estos residuos ya fosforilados, se unen a los receptores de manosa 6-fosfato, el principal receptor para proteínas lisosomales blanco en las vías secretoras, los cuales dirigen el transporte a los endosomas tardíos que maduran dentro de los lisosomas,



estos receptores se disocian de las catepsinas, después de la acidificación endosomal y regresan al aparato de Golgi y/o a la superficie celular.

El propéptido funciona como “chaperona”, en su paso a través de los compartimentos neutrales de la célula, es decir, facilita que el péptido funcional adquiera su conformación tridimensional adecuada en el ambiente ácido del endosoma (revisado en Riese & Chapman, 2000).

Posteriormente el propéptido es removido durante el paso a través del retículo endoplásmico y la procatepsina es procesada a una enzima activa, ésta se forma en el ambiente ácido de los endosomas tardíos o en los lisosomas. La remoción proteolítica del propéptido se lleva a cabo mediante la participación orquestada de diferentes proteasas tales como pepsina, neutrófilo elastasa, catepsina D y varias proteasas de cisteína. También se ha propuesto que existe el procesamiento auto catalítico a pH ácido a través de un mecanismo de reacción intermolecular (revisado en Turk et al, 2000; Riese & Chapman, 2000). La disminución de pH, probablemente disminuye la interacción entre el propéptido y la parte catalítica, sin la pérdida de la estructura secundaria, esto podría ser acompañado por la ampliación de la hendidura del sitio activo o bien podría ser parcialmente desnaturalizada y proteolíticamente degradada por catepsina D, la cual es altamente activa a pH ácido (Turk et al, 2000; Levicar et al, 2002).

Este procesamiento proteolítico y activación de las catepsinas podría ocurrir intralisosomalmente, en la membrana plasmática y/o extracelularmente, cuando las catepsinas son secretadas como proenzimas, o bien al ser internalizadas por endocitosis por la misma célula o por células estromales vecinas (revisado en Levicar et al, 2002).

### **3.4 Actividad fisiológica**

Las catepsinas participan en el recambio de proteínas intralisosomales, también tienen funciones específicas en procesos como la presentación de antígenos por el complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC clase II), reabsorción de hueso, procesamiento de preprohormonas, remodelamiento y degradación de proteínas de matriz extracelular y de proteínas en general, también degradan y procesan proteínas fuera de los lisosomas, tales como, pro-renina y la tiroglobulina (Turk et al, 2000).

En diversos procesos patológicos se altera el tránsito, secreción, y concentración de catepsinas lisosomales (revisado en Turk et al, 2000; Nagai, 2003; Shi et al, 1999; Levicar et al, 2002 and Turk et al, 2001). La actividad de las catepsinas se encuentra incrementada en gliomas y meningiomas, bajo influencia de factores autócrinos y parácrinos (revisado en Levicar et al, 2002). Las catepsinas, también participan en una variedad de procesos patológicos, tales como, inflamación, artritis reumatoide, osteoartritis, esclerosis múltiple, distrofia muscular, cáncer, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, procesos invasivos de células tumorales y angiogénesis, también participan en apoptosis y/o necrosis.

También se han descrito patologías causadas por alteraciones genéticas relacionados con las catepsinas, tales como la picnodisostosis, relacionado con las alteraciones en el gen de la catepsina K (revisado en Turk et al, 2001; Turk et al, 2000).

### **3.5 Regulación de la actividad**

La regulación de la actividad de las proteasas endosomales es muy importante en la modulación del ambiente endosomal, ésta regulación se establece a través de la activación del zimógeno y por la actividad de inhibidores endógenos.

#### **3.5.1 Inhibidores endógenos**

Los inhibidores endógenos están constituidos por tres grupos de moléculas: el propéptido, las cistatinas y el fragmento p41 li, estos tres tipos de inhibidores, forman enlaces reversibles en el sitio activo de las catepsinas (revisado en Riese & Chapman, 2000).

##### **a) Proregión.**

La acción inhibitoria de la proregión ocurre por la obstrucción del acceso del sustrato al sitio activo. El fragmento aminoterminal de la proregión, está unido a la enzima a través de la interacción con el asa de unión de la proregión, a un lado del sitio activo, opuesto al residuo aminoterminal de la forma madura, al cual, la proregión esta covalentemente unido (Cygler & Mort, 1997).

Las cistatinas están constituidas por una superfamilia, revisada en la siguiente sección.

El fragmento p41 li. Una variante de corte y empalme de la cadena invariante (li) asociada al complejo MHC de clase II contiene un segmento de 65 a.a. que se une al sitio activo de la catepsina L y la inhibe (Lennon-Duménil et al, 2001).

En procesos patológicos se ha descrito el efecto de la alteración de la actividad de los inhibidores endógenos de catepsinas, dependiendo del grado de la enfermedad, lo cual sugiere que las características patológicas están

relacionadas con un desbalance en la actividad de los inhibidores endógenos de las catepsinas (revisado en Levicar et al, 2002).

### **3.6 Catepsina H**

La proteasa catepsina H está formada por una cadena peptídica pesada, una ligera y una mini cadena; en esta última se encuentra el enlace disulfuro y ocupa el sitio activo. La mini cadena está formada por 8 residuos de a.a., este péptido se origina de la región del propéptido y ocupa la hendidura del sitio activo. En el extremo de la mini cadena, se encuentra el grupo carboxilo negativamente cargado, que proporciona un anclaje para el grupo aminoterminal del sustrato, positivamente cargado, resultando en la actividad de aminopeptidasa (revisado en Turk et al, 2000; Riese & Chapman, 2000).

Junto con otras catepsinas, participa en diversos procesos, por ejemplo, durante el desarrollo fetal del pulmón, se expresa en células epiteliales e intersticiales; en éstas últimas va disminuyendo su actividad conforme se incrementa la edad, lo cual sugiere un diferente papel fisiológico en el desarrollo (Bühling et al, 2002). En procesos patológicos como cáncer de próstata, la catepsina H se expresa en altas cantidades (Waghray et al, 2002), así como en carcinoma de mama, melanoma y gliomas; mientras que se ha observado una disminución de catepsina H en células escamosas de carcinoma de cabeza y cuello (revisado en Waghray et al, 2002). En metástasis leptomenigeal se incrementa la actividad de catepsina H (Nagai et al, 2003) y en meningioma humano se expresa una catepsina H con mayor actividad, menor peso molecular y un pH óptimo diferente a la observada en condiciones normales (Chornaya & Lyannaya, 2004).

## 4. CISTATINAS

### 4.1 Superfamilia de las cistatinas

Los inhibidores endógenos de las catepsinas son la superfamilia de las cistatinas y tiropinas, estas moléculas, son el principal medio de regulación de las catepsinas maduras, sin embargo, no se conoce con precisión el sitio subcelular donde se lleva a cabo la inhibición (revisado en Levicar et al, 2002).

Se considera a una familia de inhibidores de proteasas como un conjunto de enzimas con alto grado de homología en su secuencia de a.a.; al menos en su sitio activo. Una familia puede estar constituida por un solo miembro, si es que no se conocen homólogos, y un producto de un solo gene, puede contener varios dominios inhibitorios, que pueden pertenecer a diferentes familias. Cada familia de inhibidores se designa por la letra I seguida de un número. Una familia puede dividirse en subfamilias si se encuentra evidencia de una divergencia ancestral. (Rawlings et al, 2006).

La superfamilia de las cistatinas, familia I25, está formada por tres subfamilias:

- la subfamilia I25A, cistatinas tipo 1 o estefinas; proteínas intracelulares que carecen de enlace disulfuro y son sintetizadas sin péptido señal: A ésta subfamilia pertenecen la estefina A y B.

- la subfamilia I25B, cistatinas tipo 2; proteínas de secreción que presentan dos enlaces disulfuro. Constituida por cistatina C, D, S, SA, SN, E/M y F.

- la subfamilia I25C, cistatinas tipo 3, proteínas de secreción entre las que se encuentran algunos kininogenos (intravasculares), formados por múltiples dominios relacionados con cistatinas tipo 2, son de dos tipos, de alto peso molecular y de bajo peso molecular. Inhiben a la calpaína y a las proteasas de la familia S8, pero no a las catepsinas

Además se han descrito otras proteínas como parte de las cistatinas, como la sarcocistatina las cuales no han sido asignadas a una subfamilia (Brown & Dziegielewska, 1997).

#### **4.2 Familia de la Cistatina C**

La subfamilia I25 comprende proteínas de aproximadamente 115 a.a., contienen cuatro residuos de cisteína conservados y forman dos enlaces disulfuro, las cistatinas pueden ser glicosiladas y/o fosforiladas y contienen residuos a.a. conservados con una secuencia “QVVAG” (Gln Val Val Ala Gly).

#### **4.2 Cistatina C**

La cistatina C (CC), es una molécula inhibidora reversible de las catepsinas, está relacionada con el control, recambio de proteínas y defensa de tejidos contra la invasión por virus, bacterias y parásitos, también se ha propuesto que participa en el mantenimiento del ambiente local extracelular o puede regular intracelularmente la actividad de catepsinas en las vías de secreción de proteínas (Merz et al, 1997).

El primer antecedente de la existencia de la CC fue en 1968 cuando Fossum y Whitaker identificaron una proteína en la clara de huevo que inhibía a las proteasas ficina y papaína. Barret, en 1981, es el primero en utilizar el término cistatina, en 1983 se logra su purificación, la proteína se encuentra en forma fosforilada y no-fosforilada, su nombre se ha utilizado para la nomenclatura de proteínas evolutiva y funcionalmente relacionadas (revisado en Reed, 2000; Grzonka et al, 2001).

### **4.3.1 Características estructurales del gen**

El gen de la CC está formado por una cadena nucleotídica de 7.3 kilobases (Kb), comprende tres exones de 243, 115 y 80 pares de bases (pb), dos intrones con secuencias de 2252 y 1254 pb. La cadena codificante es de aproximadamente 4.3 Kb, está codificada en el gene CST3 localizado en el brazo corto del cromosoma 20 y puede ser asignado a la banda p11.2. El gene de la CC es de los llamados “de mantenimiento”, presenta diversas características en el extremo 5’ de la secuencia codificante, como la ausencia de una caja CAAT, alto contenido de GC y la presencia de un sitio de unión de la proteína Sp1, lo cual indica que existe una tasa de producción estable en la mayoría de los tipos celulares (Abrahamson et al, 1990; Schnittger et al, 1993).

El cDNA de la CC de rata, de 634 pb, contiene una región 3’ no traducida de 234 pb, la cual es comparable con la región no traducida de la CC de humano que es de 262 pb y presenta una señal de poliadenilación AATTAA a 9 pb de la cola de poliadenilación (Cole et al, 1989 ; ver figura 4).





de 9.3 por lo tanto la proteína está positivamente cargada al pH fisiológico, siendo una proteína básica (Grubb et al, 1984; Reed, 2000; Abrahamson et al, 1990).

	10	20	30	40	50	60
RatCysC	GTSRPPRL	GAPOEADASEEGVQRALDFAVSEYNKGSNDAYHSRAIQVVRARK	QIVAG	INYY		
HumCysC	SSPGKPPRL	VGPMASVEEEGVRRALDFAVGEYNKASNDMYHSRAIQVVRARK	QIVAG	NYF		
HumCysS	IIPGGIYDADL	NDEWQRALHFALSEYNKATEDEYYRRPLQVLRARE	QIFGG	NYF		
ChicCys	EDRSRL	GAQVVDENDEGLQRALQFMAEYNRASNDKYSSRVVRLSAKR	QIVSG	IKYI		
RatCys $\alpha$	MDPGTTGIV	GGVSEAKPATPEIQEVADKVKRQLEEKINEKY	---	EKFKWWEYK	QVAG	QILF
RatCys $\beta$	MVCGAPSA	IMPATTETQEIADKVKVQLEEKANQKF	---	DVFKALSFR	QVAG	INFF

	70	80	90	100	110	120
RatCysC	LDVEMGRIT	CIKTSQTNLINC	PFHDQPHLMRKAL	CSFOIYSVPW	KGHTLTKSS	QNA
HumCysC	LDVELGRIT	CIKTOPNLINC	PFHDQPHLKRKAF	CSFOIYAVPS	QGITLTKST	QDA
HumCysS	FDVEVGRIT	CIKTSQNLDT	CAFHEQPEIQKQLE	SFETIYEV	PWEDRMSLV	SRQEA
ChicCys	LQVEIGRIT	CPKSSGDIQS	EFHDEPEMAKYTT	EIFVWYSIP	WLNQIKLLES	KQD
RatCys $\alpha$	MKVDVGN	GRFLHK	-----	VLRGLSGDD	---	DKLLDYQINKTKNDELIDF
RatCys $\beta$	IKVDVGE	EKCQVHLR	-----	VFEPLPHENK	--	PDILSSYQTDKEKHDELITYF

Fig. 5 Comparación de la secuencia de a.a. de CC en varias especies, Se muestra en azul una de las regiones altamente conservadas que participa en la inhibición de las catepsinas; en verde se muestran las cisteínas que forman los enlaces disulfuro. Modificado de Cole et al, 1989.

La secuencia de a.a. de la CC presenta dos regiones altamente conservadas que están relacionadas con el sitio de unión inhibitorio, la secuencia pentapeptídica QIVAG (Gln Ile Val Ala Gly) está altamente conservada en la familia 1 de cistatinas y menos conservada en la familia 2 de cistatinas, un residuo de glicina cercano al extremo amino terminal, está altamente conservado en todas las cistatinas y se ha sugerido que estos sitios están implicados en la inhibición de las catepsinas, también presenta un sitio posible de glicosilación en los residuos 79 al 81: Asn-Leu-Thr. (Cole et al, 1989). De hecho existen cinco formas glicosiladas de Cistatina C (CCg) cuyo peso molecular aparente es de 23, 21, 18, 15 y 13 KDa, descritas en medio condicionante de células neuronales primordiales de hipocampo durante 48 y 96 hr (Dahal et al, 2004).

Estudios cristalográficos y de resonancia magnética nuclear de algunas cistatinas, han mostrado que su estructura presenta 3 regiones que interaccionan con las catepsinas: la región N terminal, y las 2 asas L1 y L2 que se alinean como cuñas. La estructura base está formada por una región  $\alpha$ -hélice larga que corre a lo largo de 5 hojas  $\beta$  antiparalelas. La conectividad entre las hojas  $\beta$  es: (N)- $\beta$ 1-( $\alpha$ 1)- $\beta$ 2-L1- $\beta$ 3-AS- $\beta$ 4-L2- $\beta$ 5-(C), donde AS es una estructura no relacionada con el núcleo de la molécula y que se encuentra en el lado opuesto al extremo amino terminal y a las asas L1 y L2 (Fig. 6) (Janowski et al, 2001).

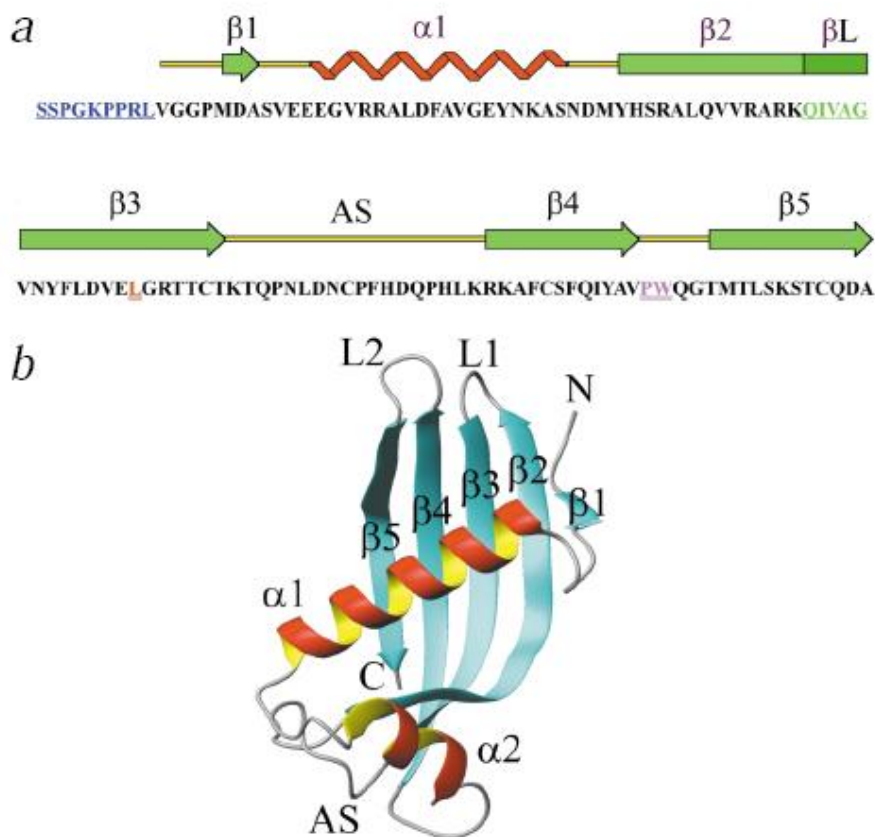


Fig. 6 Estructura primaria, secundaria y terciaria de la cistatina C de humano. a) Secuencia de a.a. y asignación de los elementos de la estructura secundaria derivados de la organización del cristal. En azul se muestra el extremo amino terminal, en verde la cadena correspondiente al rizo L1, en magenta L2. (b) Se muestra la topología correspondiente a esta clase de proteínas (tomado de Janowski et al, 2001).

### **4.3.3 Mecanismos de la inhibición de catepsinas**

Estudios espectroscópicos, cristalográficos y de cinética enzimática muestran que la CC, se une a la enzima en un proceso de una etapa, de una forma simple y reversible, y de segundo orden.

Se han encontrado tres regiones altamente conservadas en la secuencia de diversas cistatinas involucradas en la unión con las catepsinas: la región aminoterminal de 11 residuos de aminoácidos y otras 2 localizadas en las asas L1 (a.a. 54 a 58: QVAG) y L2 (a.a. 104 a 107: VPWQ); estas regiones forman una estructura en forma de cuña que interacciona con el sitio activo de la enzima (revisado en Grzonka et al, 2001 y Björk et al, 1996).

### **4.3.4 Distribución intracelular**

La CC se encuentra intracelularmente en el retículo endoplásmico y en los pliegues membranales del aparato de Golgi, lo cual es un indicativo de que es una proteína constitutivamente secretada, junto con la tasa de secreción lineal y la vida media intracelular es de 72 minutos. Durante la maduración en el retículo endoplásmico, esta proteína forma dímeros, el proceso de dimerización se lleva a cabo en el retículo endoplásmico y es un prerequisite para su transporte hacia el aparato de Golgi, la dimerización es mediada por chaperonas, la disociación de los monómeros probablemente ocurre en las fases tardías de las vías de secreción, pero no se sabe en qué etapa, de manera que, únicamente los monómeros funcionales de la CC son liberados al medio extracelular. La dimerización de la CC ocasiona su inactividad como inhibidor de proteasas, y puede representar un mecanismo para proteger las proteasas intracelulares de la inhibición por la CC. Estudiando el procesamiento intracelular se han identificado monómeros de 11 y dímeros de 33 KDa y un complejo grande inmunoreactivo mayor a 70 KDa (Merz et al, 1997).

#### 4.3.4 Sitio de síntesis y localización

La CC se encuentra en grandes cantidades en plasma seminal, LCE, en menores cantidades en lágrimas, líquido amniótico, saliva, leche y plasma sanguíneo, la amplia distribución de cistatina C, sugiere que es la proteína principal inhibidora de las proteasas de cisteína (revisado en Reed, 2000).

La concentración de la CC en LCE en relación al plasma es de aproximadamente de 5.5, lo cual indica que la CC es producida en el sistema nervioso central, la concentración de la CC en suero humano es de 1.6 +/- 0.91 µg/mL (revisado en Reed, 2000). A nivel de sistema nervioso central, la CC es sintetizada por el plexo coroideo, se ha localizado principalmente en el epitelio del plexo coroideo, en el ventrículo lateral y en el cuarto ventrículo, aunque se localizó en todas las porciones del plexo coroideo (Cole et al, 1989). La CC también se encuentra en regiones del parénquima cerebral, ha sido identificada en corteza, hipotálamo, hipocampo, en neuronas y astrocitos (revisado en Hasegawa et al, 2007, Laterza et al, 2002). La CC es secretada por células microgliales mononucleares y por fagocitos. En las células dendríticas se han descrito dos isoformas de la CC, de 13 y 15 KDa, las cuales se acumulan en lisosomas de células dendríticas primarias, pero no en células dendríticas tardías, la CC se encuentra localizada en endosomas tardíos y en los lisosomas, la distribución intracelular de la CC cambia marcadamente con la maduración de las células dendríticas, encontrándose primariamente en los organelos endocíticos de células inmaduras, mientras que en células maduras se encuentra en el complejo de Golgi (Pierre & Mellman, 1998).

#### **4.3.5 Sistema de recaptura**

La CC liberada al espacio extracelular, puede ser endocitada y transportada a los lisosomas donde generalmente es degradada, la CC endocitada se encuentra en forma monomérica, dimérica y de complejos grandes (Merz et al, 1997). Se ha descrito un sistema activo de recaptura de la CC en diversos tipos celulares en la cornea, cuerpo ciliar y retina. Los tipos celulares que tienen un sistema de recaptura son generalmente los mismos que contienen CC endógena, sugiriendo que mucha de la CC detectada intracelularmente es recapturada del espacio extracelular. La recaptura de CC, indica que el inhibidor puede ejercer una función biológica en compartimentos intracelulares, también es posible que el sistema de recaptura puede regular los niveles extracelulares de CC en el ojo (Wassélius et al, 2004).

#### **4.3.7 Producción y excreción de la CC**

La CC ha sido propuesta como marcador de función renal ya que es producida en una tasa constante, independiente de la masa muscular, edad o sexo y la carencia de secreción renal o reabsorción hacia el torrente circulatorio (revisado en Laterza et al, 2002).

#### **4.3.8 Participación en funciones no inhibitorias**

La CC está implicada en otras funciones celulares que no están relacionadas con la función de inhibidor de proteasas de cisteína, entre estas funciones se encuentra la regulación de la actividad fagocítica y la respuesta quimiotáctica de neutrófilos polimorfonucleares, la regulación a la alta de la liberación de oxido nítrico de macrófagos activados (revisado en Hasegawa et al, 2007).

#### **4.3.8.1 Protección ante la muerte neuronal**

Se ha descrito que CC se encuentra implicada en la apoptosis inducida por el estrés oxidativo en neuronas en cultivo y en apoptosis *in vivo*. La CC puede ser liberada de los lisosomas hacia el citoplasma donde se une a la neuroglobina la cual se incrementa en condiciones de hipoxia y ha sido implicada como factor de protección neuronal (Wakasugi et al, 2004).

#### **4.3.8.2 Neurogénesis**

La CC también participa en procesos de neurogénesis, junto con el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2), tiene actividad mitogénica sobre células neuronales madre. La CC glicosilada actúa como un factor autócrino/parácrino en cooperación con FGF-2 para promover la proliferación celular de células troncales primordiales neuronales *in vitro* e *in vivo*. La CC glicosilada puede promover la sobrevivencia o prevenir la muerte de las células que pueden responder a las actividades mitogénicas de FGF-2. En el ratón deficiente de CC se observa la disminución del 60% en la proliferación celular en el giro dentado respecto del ratón silvestre (Taupin et al, 2000).

En células corticales embrionarias de ratón, en cultivo, la CC promueve la astrogénesis y suprime la oligodendrogénesis, mientras que en cultivos de células primarias cerebrales, incrementa el número de células positivas a GFAP y a nestina, este efecto parece ser independiente de su efecto inhibidor de proteasas de cisteína, ya que que no es reproducido por otros inhibidores de proteasas como el E64 (Hasegawa et al, 2007).

### **4.3.8.3 Participación en procesos patológicos**

La enfermedad cerebral hemorrágica con amiloidosis, es una enfermedad hereditaria que se caracteriza por la presencia de depósitos de CC en arterias, lo cual ocasiona la degeneración progresiva de la pared vascular, incluyendo la pérdida gradual de células de músculo liso. Esta enfermedad es ocasionada por una mutación en el gen de CC, hay una sustitución de un solo nucleótido adenina por timina en el codón 68, lo cual ocasiona el reemplazo de leucina por glutamina. La CC resultado de la mutación, tiene una gran tendencia a formar agregados pesados amiloideos, sin embargo, aun inhibe efectivamente a catepsina B.

Las catepsinas B, H y L han sido implicadas en la capacidad invasiva de células tumorales, las catepsinas son secretadas por células neoplásicas, facilitando su invasión en tejido estromal; un desbalance entre catepsinas y CC puede facilitar este proceso.

También se ha observado que en la respuesta de inflamación la CC se sintetiza en monocitos o en macrófagos, (revisado en Reed, 2000).

## **5. INHIBIDORES DE PROTEASAS Y SUEÑO**

### **5.1 Inhibidores exógenos**

Hay muy pocos datos en la literatura al respecto, sólo hay un reporte de la administración subcutánea de bacitracina (inhibidor de proteasas inespecifico) en gatos, que ocasiona un incremento de sueño MOR, el efecto se observa después de tres horas de administrarla, tal efecto permanece después de 18 hr (Sastre et al, 1983).

## **5.2 Inhibidores endógenos**

La participación de los inhibidores endógenos de proteasas en la regulación del sueño, prácticamente no se ha abordado, El antecedente más directo lo constituye mi Tesis de Maestría en donde analicé el patrón electroforético de proteínas presentes en el LCE de ratas de pMOR y de ratas con rebote de sueño MOR. Describí una banda proteica que incrementaba su expresión durante la pMOR y tendía a disminuir con el rebote. Esta banda proteica se mando a secuenciar y resultó ser la cistatina C (González-Rivera et al, 2003 y González Rivera R, 2004).



## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Es indudable que las proteínas participan en la regulación del sueño, la administración de inhibidores de su síntesis disminuye el sueño MOR, mientras que los inhibidores de proteasas, ocasionan una disminución en la vigilia e incrementan el sueño MOR, sin tener efecto en el sueño nMOR. Así pues, creemos que, entre numerosas moléculas como neuropéptidos, neurotransmisores, hormonas, lípidos y proteínas; las proteasas y los inhibidores endógenos de la degradación de las proteínas deben jugar un papel relevante en la regulación de los estados de vigilancia. La investigación de la participación de inhibidores endógenos de la degradación de las proteínas que participan en la regulación del sueño prácticamente no ha sido abordada.

Como una primera aproximación, estamos interesados en analizar la variación diurna de la concentración de CC y tratar de relacionarlos con la prevalencia de los estados de vigilancia, así como caracterizar el papel de la CC y de al menos una catepsina (catepsina H) en la regulación del sueño.

Así, en este proyecto nos propusimos analizar, los niveles de la CC en LCE a lo largo del ciclo luz-oscuridad, así como el efecto de la pMOR y del rebote en la expresión de la CC y de la catepsina H y analizar el efecto de la CC sobre la arquitectura del sueño.

### III. HIPÓTESIS

Los niveles en la concentración de la Cistatina C en líquido cerebro espinal serán mayores durante el periodo en que haya la prevalencia de sueño.

La privación selectiva de sueño con movimientos oculares rápidos modificará la concentración de Cistatina C en el líquido cerebro espinal.

La administración intracerebroventricular de la Cistatina C incrementa el sueño con movimientos oculares rápidos en ratas que han dormido *ad libitum*.

### IV. OBJETIVOS

1. Analizar las variaciones en la concentración de la Cistatina C y de la Catepsina H en el líquido cerebro espinal y el plexo coroideo de ratas control a lo largo de las 24 hrs del día.
2. Analizar las variaciones en la concentración de la Cistatina C y de la Catepsina H en el líquido cerebro espinal y el plexo coroideo de ratas privadas selectivamente de sueño con movimientos oculares rápidos y con rebote de sueño con movimientos oculares rápidos.
3. Determinar el efecto de la administración i.c.v. de la Cistatina C en la arquitectura del sueño en la rata, en particular del sueño con movimientos oculares rápidos.

## V. MÉTODOS

**1. Material biológico.** En todos los experimentos se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, con un peso entre 250 y 280 gr., al inicio del experimento, se mantuvieron en un ciclo constante de luz/oscuridad 12/12 (luz encendida a partir de las 8:00 A.M.), con agua y comida *ad libitum*.

**2. Variaciones diurnas de la CC.** Se utilizaron ratas control a diferentes horas del día 09:00, 13:00, 17:00, 21:00, 01:00 y 05:00 horas (n=16 de cada grupo), se les extrajo el LCE y se trató como se describe más adelante.

**3. Privación selectiva de sueño MOR.** Las ratas fueron distribuidas en tres grupos: control (C) privado (P) y rebote (R) todos los grupos tuvieron una n=16. El grupo C, se conformó por ratas que permanecieron en una caja de acrílico con aserrín y durmieron *ad libitum*. Las ratas del grupo P tuvieron un periodo de pMOR durante 48 hr por el método de “florero invertido” o pedestal (Fig. 7), este periodo inició a las 09:00 y terminó 48 horas después. El grupo R, estuvo constituido por ratas con un periodo de pMOR, como se mencionó anteriormente, durante 46 hr, después se les permitió dormir por un periodo de 2 hr, este periodo se denomina “rebote”, el cual consistió en dejarlas en reposo en la caja con aserrín y permitirles cursar por los periodos de sueño, posteriormente se procedió a la extracción de LCE o de la disección del plexo coroideo, como se describe más adelante.

**4. Florero invertido.** Privamos selectivamente de sueño MOR a las ratas, por el método de “florero invertido” o “pedestal” descrito por Jouvet en la década de los 60's (Fig. 7). Este método consiste en colocar a la rata en una caja de acrílico con una plataforma en el centro, con un diámetro de 7.5 cm, apoyada sobre una columna de acrílico y rodeada de agua con una profundidad de 1 cm; con la finalidad que la rata no presente sueño MOR. Tomando en cuenta que durante el sueño MOR se presenta la característica

tónica de la atonía muscular, si la rata entra a sueño MOR pierde el tono muscular y cae al agua ocasionando el despertar.

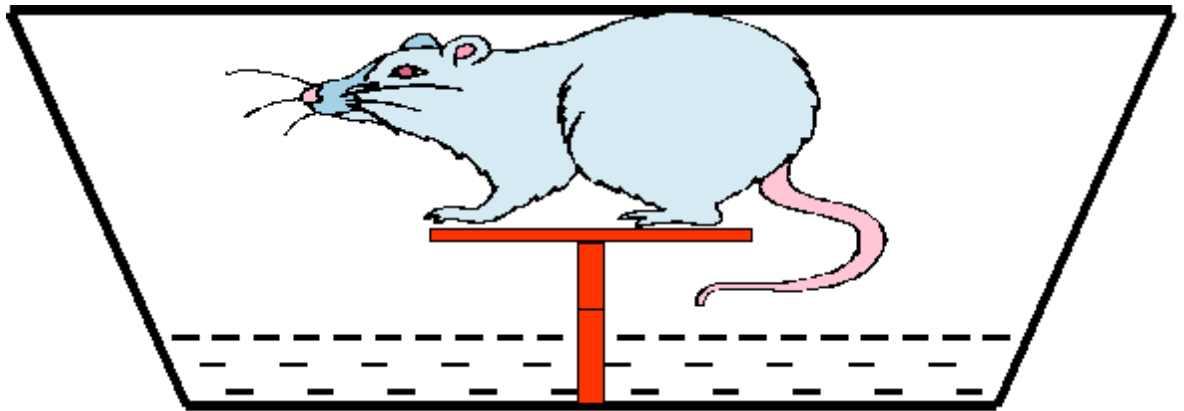


Fig. 7 Ilustración del método de privación selectiva de sueño MOR por el “Florero invertido”

También se realizaron experimentos del control de estrés del método de pMOR, el cual consiste, en las mismas condiciones anteriormente mencionadas sólo que la plataforma es de 14 cm de diámetro, en estas condiciones, cuando la rata entra a sueño MOR y se presenta la atonía muscular ya no cae al agua y por lo tanto puede cursar por todos los estados de vigilancia

## 5. Obtención de muestras biológicas

**5.1 LCE.** Las ratas de los grupos control y experimentales fueron anestesiadas con pentobarbital (30 mg/Kg) administrado de manera i.p., se les extrajo LCE por punción en la cisterna magna. El LCE fue centrifugado durante 20 min a 4,000 Xg, posteriormente, fue almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

**5.2 Plexo coroideo.** Las ratas de los diferentes grupos fueron anestesiadas con pentobarbital como anteriormente se mencionó y decapitadas, se obtuvo el cerebro y se disectó el plexo coroideo, se realizó una mezcla del plexo coroideo obtenido de tres ratas del mismo grupo y fue

homogenizado mecánicamente con un vástago de teflón en un amortiguador de Tris-sacarosa, adicionado con inhibidores de proteasas y centrifugado durante 10 min a 4 °C, el sobrenadante fue centrifugado a 39,000 Xg durante 15 minutos.

## **6. Análisis de la expresión de CC y de CH**

**6.1 Cuantificación proteica.** Se realizó la cuantificación proteica del sobrenadante del homogenado del plexo coroideo, de las ratas de los grupos C, P y R, por el método de Lowry, se utilizaron 50 µg de proteínas totales para la electroforesis.

**6.2 Electroforesis.** El LCE (10 µl/carril) fue sometido a electroforesis en gel de poliacrilamida al 17% (espesor de 0.75 mm), adicionado con SDS (SDS-PAGE) descrito por Laemmli en 1970. Las muestras de plexo coroideo (50 µg de proteínas totales/carril) se sometieron a electroforesis en un gel SDS-PAGE al 12%. En todos los casos se utilizó un carril con marcadores de peso molecular. La electroforesis se llevó a cabo aplicando una corriente constante de 150 Volts en el gel concentrador, mientras que en el gel separador se utilizó una corriente constante de 100 Volts durante 90 min.

**6.3 Inmunoelectrotransferencia.** El patrón de proteínas, obtenido de la electroforesis, fue transferido a una membrana de nitrocelulosa, en una cámara de transferencia húmeda (miniprotean BIORAD); la membrana fue bloqueada con leche libre de grasa al 10% y suero normal de cabra (Santa Cruz Biotechnology Inc.) al 2%, e incubada con el anticuerpo anti-Cistatina C (anti-CC) 1:2000 desarrollado en conejo (anticuerpo policlonal Upstate) o anti-Catepsina H 1:2000, desarrollado en conejo (anticuerpo policlonal Santa Cruz Biotechnology); como segundo anticuerpo se utilizó un anticuerpo policlonal anti-conejo 1:2000, desarrollado en cabra, que tiene acoplada la enzima fosfatasa alcalina (ZyMax) o peroxidasa (ZyMax) y se adicionó el sustrato adecuado para cada caso, con lo cual se obtuvo una banda colorimétrica resultado de la actividad de la enzima que degrada al sustrato.

**6.4 Densitometría.** Se realizó un análisis densitométrico utilizando el programa Quantity One (BIORAD) de las bandas que correspondían a la movilidad relativa reportada para la reacción antígeno-anticuerpo para la CC (14 KDa) y para la CH (28 KDa) reportadas por los proveedores. Se tomó como referencia las bandas de los pesos moleculares que fueron corridos en los mismos geles que las muestras analizadas.

## **7. Registros de sueño**

**7.1 Administración de sustancias.** Se utilizó la CC de humano disponible comercialmente (abcam) y el anticuerpo anti-cistatina C (upstate biotechnology). Todas las ratas se habituaron por 24 horas a las condiciones de la caja de registro de sueño. Al día siguiente, a las 10:00 A.M se les administró por vía i.c.v., un volumen de 4  $\mu$ l de solución salina a una velocidad de 1  $\mu$ l/min y se realizó el registró polisomnográfico durante 12 horas, este registro correspondió a la condición control, al día siguiente se formaron 5 grupos de ratas a las que se les administraron por vía i.c.v., diferentes dosis de CC: 0.0875, 0.175, 0.35 y 0.7 picomoles/4  $\mu$ l ó bien 105 ng/4 $\mu$ l de anticuerpo anti-CC.

**7.2 Registros de sueño.** Para realizar los registros de sueño se utilizaron catorce ratas, fueron implantadas, bajo anestesia general, con una mezcla de anestésicos (ketamina, rompun y combalem), con electrodos para el registro convencional de sueño, dos electrodos fueron dirigidos al hueso frontal, uno funcionó como tierra, dos electrodos fueron dirigidos al hipocampo (P:-4mm; L:-2.5mm y V:-2.5mm), para el registro del EEG, dos electrodos fueron dirigidos a la masa muscular de la nuca de la rata, para el registro del EMG. También se implantó una cánula guía (gauge 23, de 1 cm de largo) dirigida al ventrículo lateral (P:-0.8mm; L:+1.5 mm y V:-3.8 mm), para la administración vía i.c.v., de los fármacos. Todas las coordenadas fueron de acuerdo al atlas estereotáxico para rata (Paxinos & Watson, 1998). Después de la operación,

las ratas se dejaron en recuperación durante una semana, posteriormente se procedió a la habituación durante un día en las cámaras de registro.

El registro de sueño se llevó a cabo en un aparato electrónico Neurotop (Neurotop MM 3116K de NOHON KOHDEN) en el programa ICELUS (University of Michigan Programming by g sistem Mark Opp PhD. Se registró el sueño durante 12 horas, iniciando a la 10:00 A. M.

Los registros de sueño fueron calificados en épocas de 12 segundos en vigilia, sueño nMOR y sueño MOR utilizando el programa ICELUS; se registró la latencia al inicio del primer periodo de sueño nMOR y de sueño MOR, así como la duración y frecuencia de cada fase de sueño, con los datos obtenidos se procedió a obtener las gráficas correspondientes y realizar el análisis estadístico.

## **8. Registro de temperatura corporal**

Treinta minutos después de la administración vía icv, de la solución salina o de la CC, a cada rata (n=2) se les registró la temperatura rectal.

## **9. Estadística**

En cada gráfica se especifican los análisis empleados.

## VI. RESULTADOS

### Variación diurna de la CC

Analizamos la variación diurna de la CC en el LCE de ratas control (Fig. 8A), a las que se les permitió dormir *ad libitum*. Observamos que existe una variación diurna en la concentración, tanto del péptido precursor de la CC (pro-CC) (Fig. 8B), así como de la CC (Fig. 8C), presentando los valores mínimos a las 09:00 horas respecto a las demás horas muestreadas, para la pro-CC y la CC.

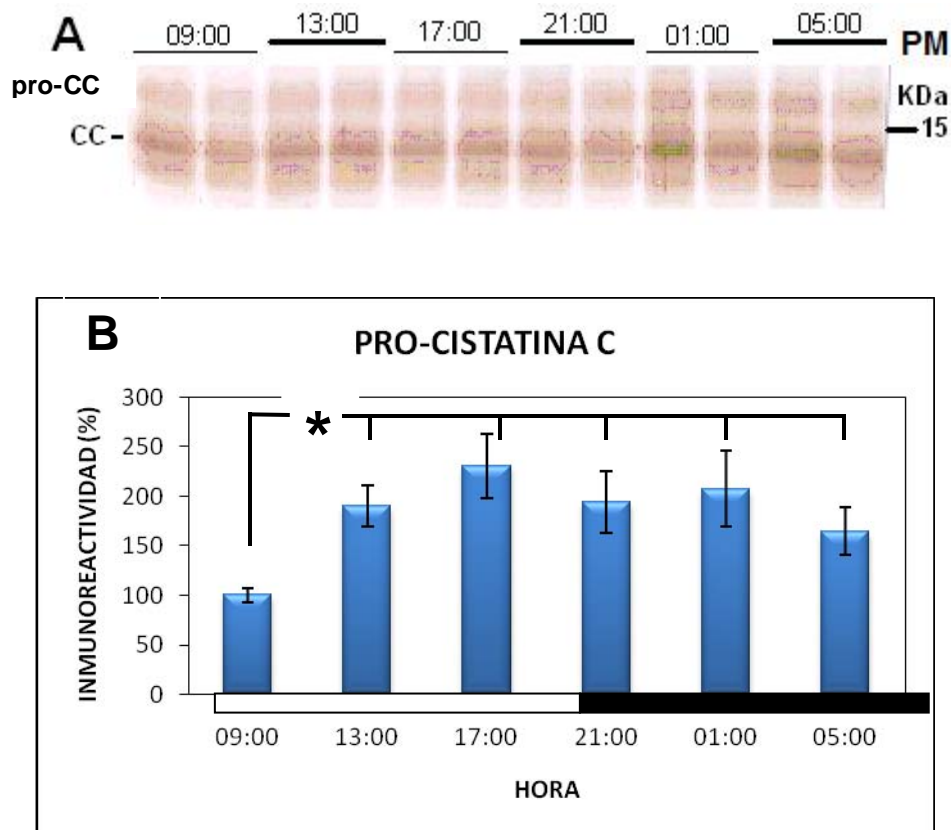


Fig. 8 El efecto del ciclo luz-oscuridad sobre la expresión de la CC. Inmunoelectrotransferencia de la pro-CC y la CC en el LCE de ratas control a diferentes horas del día (A). Las barras representan la media  $\pm$ S.E.M: de la densitometría obtenida para la banda proteica de la pro-CC (B). \* $p < 0.05$  09:00 vs las otras horas.  $n=16$



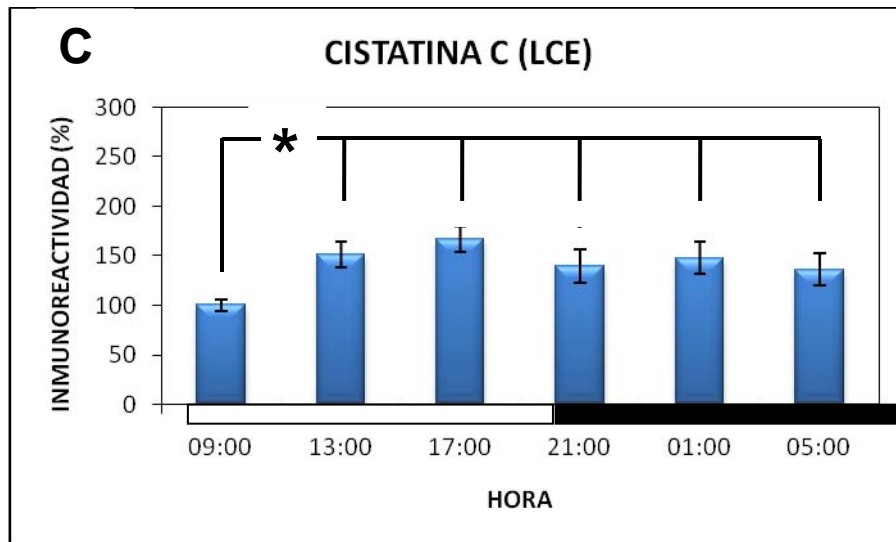


Fig. 8 El efecto del ciclo luz-oscuridad sobre la expresión de la CC en el LCE de ratas control a diferentes horas del día. Las barras representan la media  $\pm$ S.E.M: de la densitometría obtenida para la banda proteica de la CC (C). \* $p < 0.05$  09:00 vs las otras horas.  $n=16$

### Privación selectiva de sueño MOR

También analizamos la CC y la pro-CC en el LCE (Fig. 9A) de ratas control, pMOR y pMOR más rebote, utilizando además de la plataforma chica (ch) para la privación, una plataforma grande (g) como control de estrés. Observamos que el péptido de la pro-CC se incrementa en el grupo de pMOR más rebote, sin embargo también se incrementa en las ratas control de estrés de pMOR y no disminuye en el rebote (Fig. 9B). Respecto a la CC, se observa que su concentración se incrementa con la pMOR y se mantiene elevada durante el rebote, sin embargo lo mismo ocurre en el grupo control de estrés (Fig. 9C).

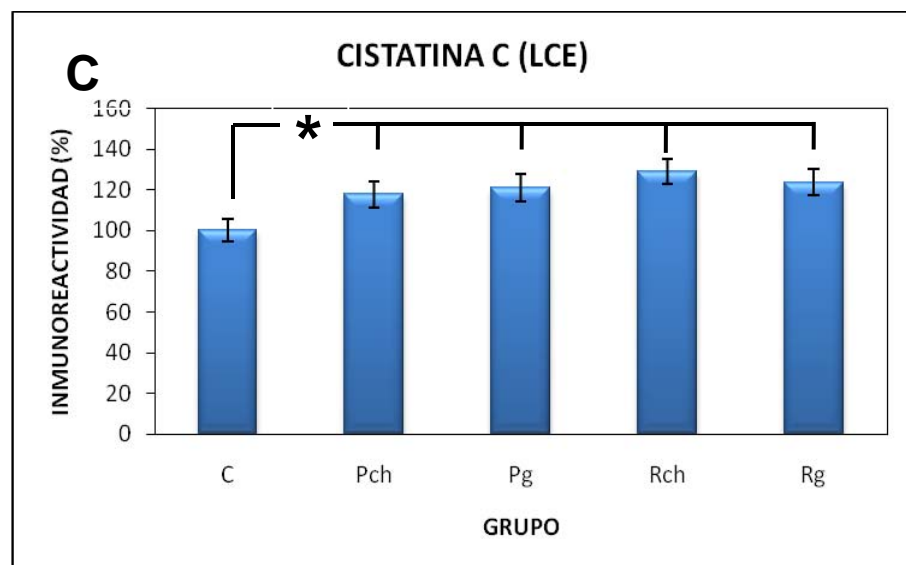
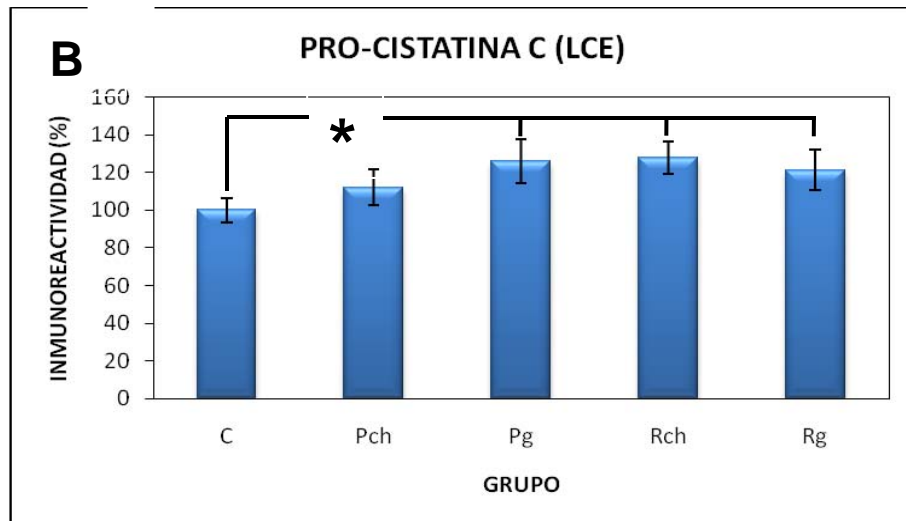
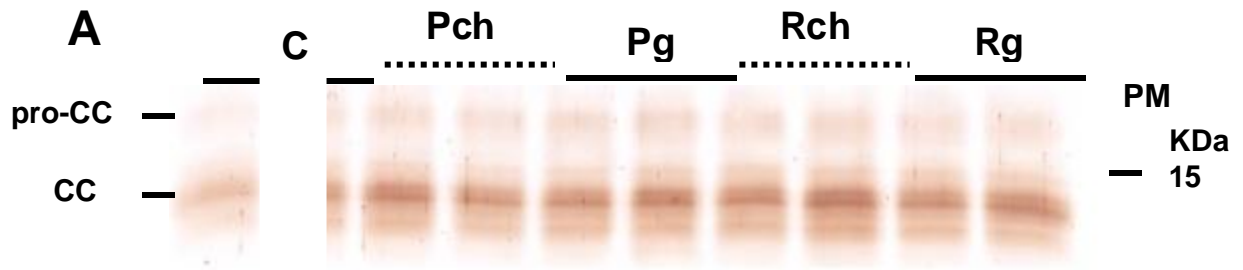


Fig. 9 Efecto de la privación selectiva de sueño MOR y el control de estrés del método de privación y sus efectos en la expresión de la pro-CC y de la CC. Inmunoelctrotransferencia de LCE, para identificar a la pro-CC y a la CC (A). Pch y Pg: privación selectiva de sueño MOR con plataforma chica y grande respectivamente; Rch y Rg: privación selectiva de sueño MOR con plataforma chica y grande mas un periodo de rebote respectivamente. Las barras representan la media  $\pm$ S.E.M: de la densitometría obtenida para la banda proteica de la pro-CC (B) y de la CC (C). \*  $p < 0.05$  en B) C vs Pg, Rch, Rg; C) C vs los otros grupos. n=16.

Respecto a la concentración de catepsina H en el plexo coroideo, observamos que se incrementa de manera significativa en el grupo de pMOR, mientras que; con el periodo de rebote tiende a disminuir sin que sea significativo (Fig. 10).

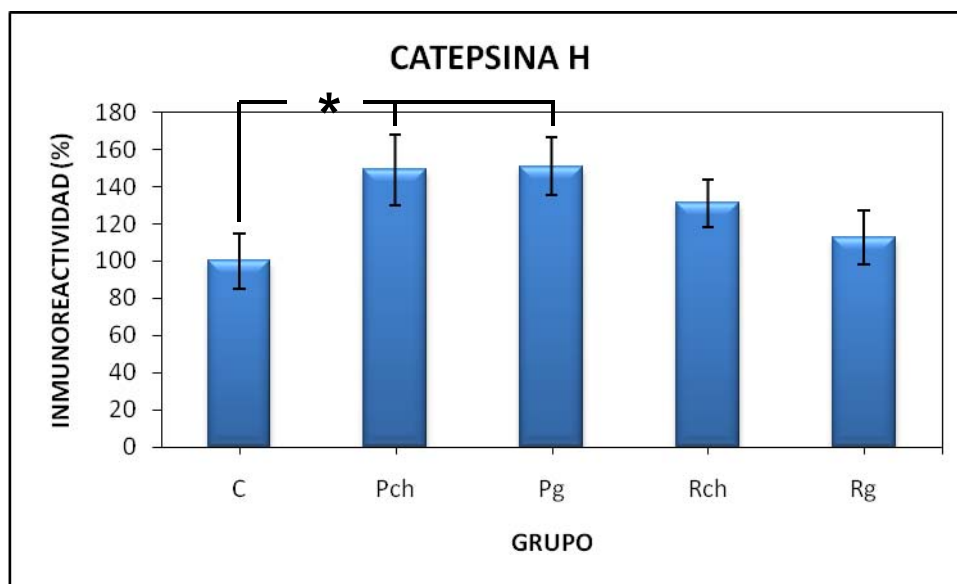


Fig. 10 Efecto de la pMOR y el control de estrés, del método de privación, sobre la expresión de CH en el plexo coroideo de los grupos C, P y R. Pch y Pg: privación selectiva de sueño MOR con plataforma chica y grande respectivamente; Rch y Rg: privación selectiva de sueño MOR con plataforma chica y grande mas un periodo de rebote respectivamente. Las barras representan la media  $\pm$ S.E.M: de la densitometría obtenida para la banda proteica de CH \* $p < 0.05$  C vs Pch, Pg. n=7

### Administración de la CC

Una vez que identificamos a la banda proteica que correspondió a la CC, para iniciar los estudios del efecto de la administración i.c.v., de la CC en los estados de vigilancia, se realizó un experimento piloto con una curva dosis-respuesta de la CC, las diferentes concentraciones de la CC empleadas fueron: 0.043, 0.087, 0.35 y 0.7 pmoles/4  $\mu$ l (n=2). De los resultados obtenidos de este experimento, observamos que la CC tiene un efecto sobre los estados de vigilancia a la concentración de 0.7 pmoles/4  $\mu$ l, por lo cual, los estudios los continuamos con esta concentración, así como también, la misma concentración molar del anticuerpo anti-CC de 105 ng/4 $\mu$ l.

Analizamos el efecto de la administración i.c.v., de la CC (0.7 pmol/4 $\mu$ l) en los estados de vigilia de la rata durante 12 horas. Observamos que el tiempo total de vigilia disminuye de manera significativa, respecto al grupo control (Fig. 11A), mientras que el tiempo total de sueño MOR se incrementa de manera significativa (Fig. 11C) sin tener efecto en el tiempo total de sueño nMOR (Fig. 11B). Asimismo analizamos el efecto de la administración de anticuerpo anti-CC (105 ng/4 $\mu$ l n=8) (Fig. 11), y no observamos ningún efecto en los estados de vigilia.

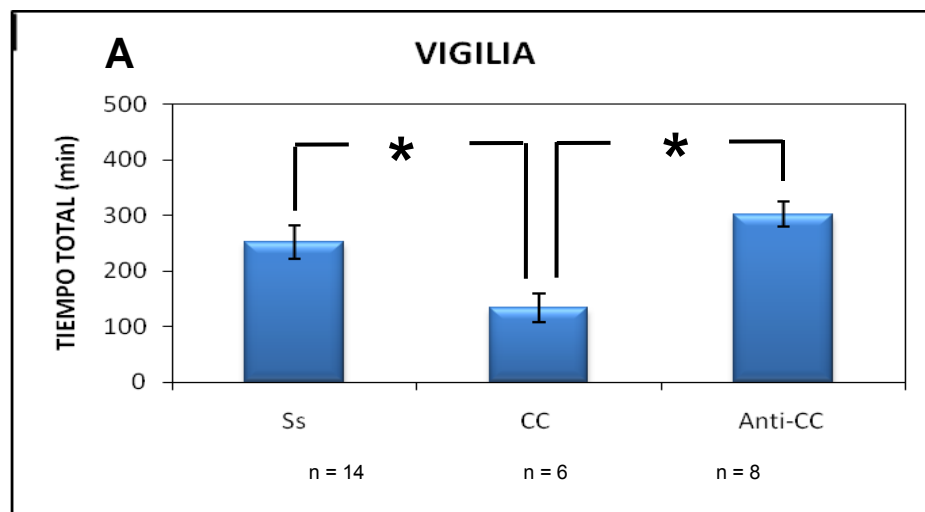


Fig. 11 Efecto de la administración i.c.v., de la CC y del anticuerpo anti-CC sobre los estados de vigilia. Las barras representan la media  $\pm$ S.E.M: del tiempo total en minutos en los que cursa en los estados de vigilia: Vigilia (A) \* $p$ < 0.05. Solución salina (SS), CC y anti-CC.

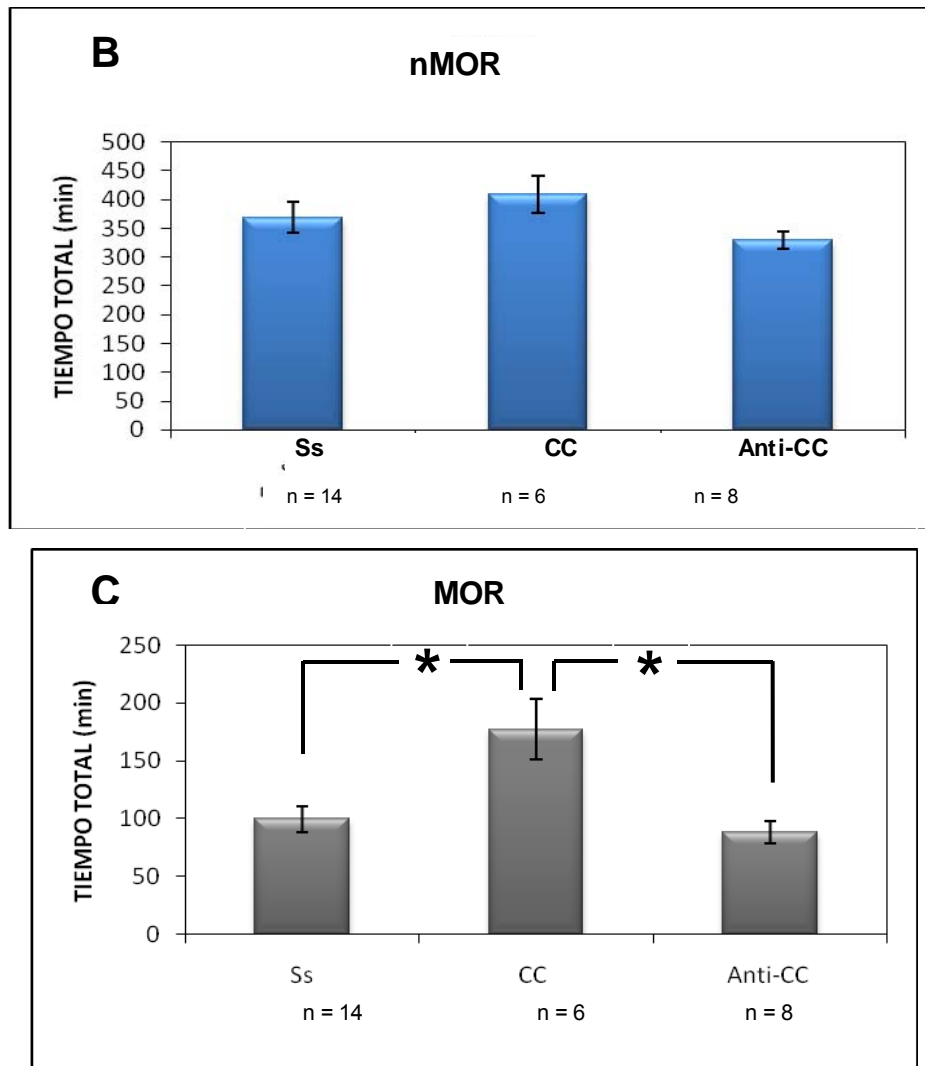


Fig. 11 Efecto de la administración i.c.v., de la CC y del anticuerpo anti-CC sobre los estados de vigilancia. Las barras representan la media  $\pm$ S.E.M: del tiempo total en minutos en los que cursa en los estados de vigilancia: sueño nMOR (B) y sueño MOR (C) \* $p < 0.05$ ; Solución salina (SS), CC y anti-CC.

Analizando estos datos a cada hora durante las 12 horas de registro, encontramos, que el efecto más importante de la CC sobre la vigilia, se observa en las últimas horas y sólo alcanza a ser estadísticamente significativo a las 19 y 21 hr (Fig. 12A), así mismo, el efecto sobre el sueño MOR solo es estadísticamente significativo a las 21 hr (Fig. 12C), mientras que no hay ningún efecto sobre el sueño nMOR (Fig. 12B).

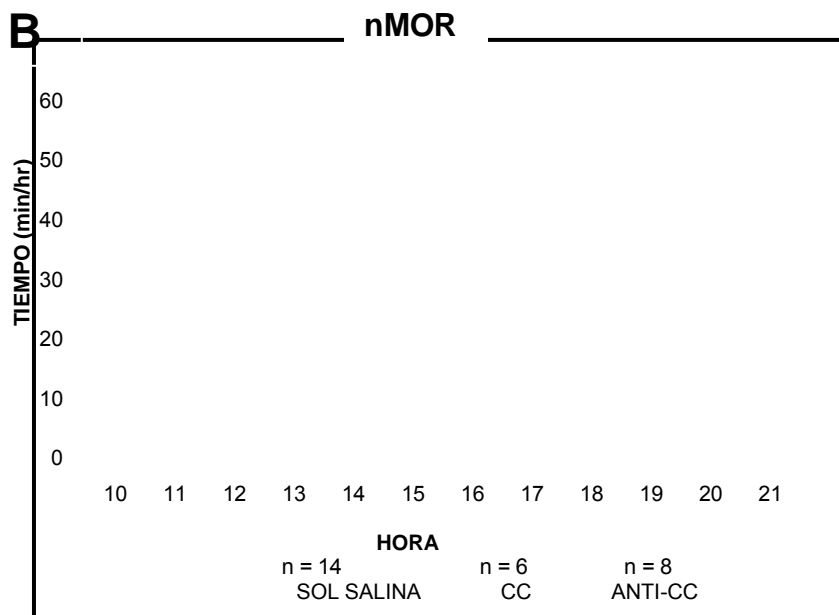
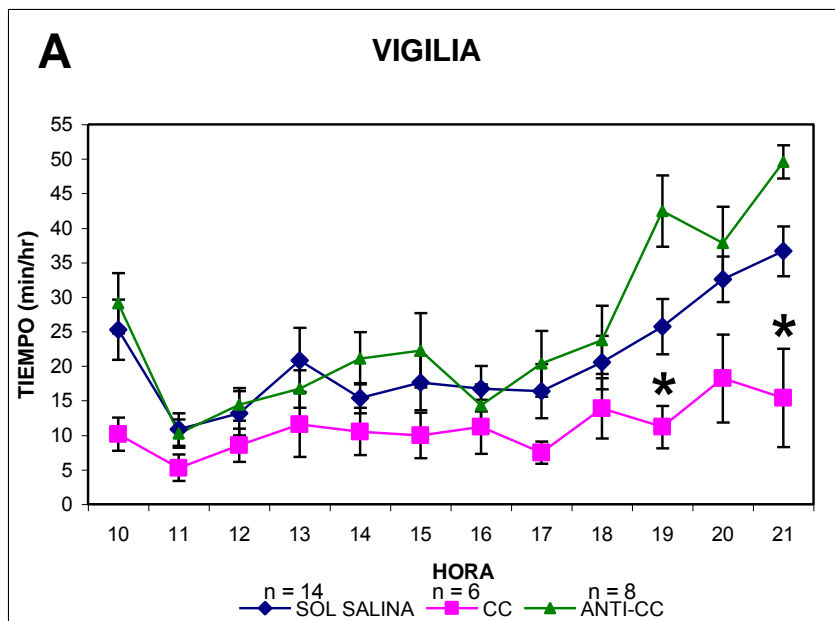


Fig. 12 Efecto de la administración de la CC en los estados de vigiliacia durante las doce horas de registro de EEG ( A \* CC vs SS) ANOVA de 2 factores con medidas repetidas y T de Student Neuman Keuls como *post hoc* \*  $p < 0.0004$ .

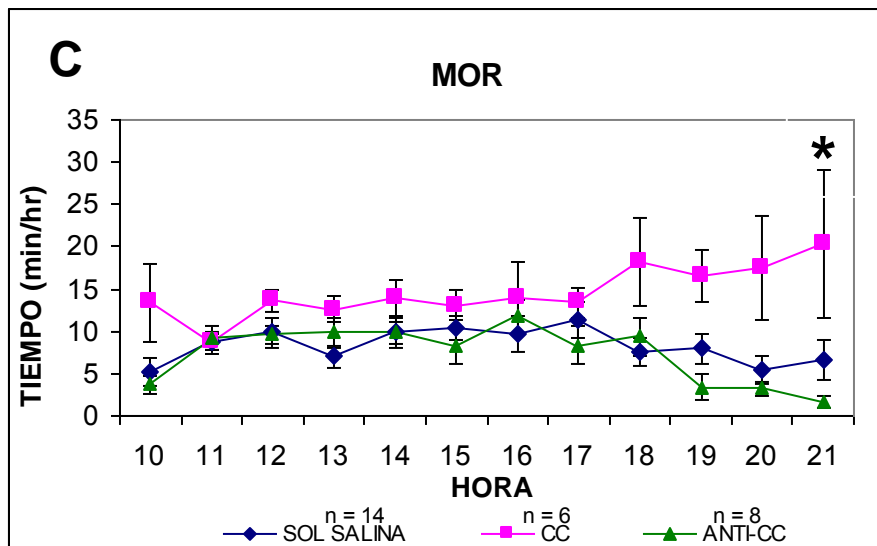


Fig. 12 Efecto de la administración de la CC en los estados de vigilia durante las doce horas de registro de EEG (C \* CC vs SS) ANOVA de 2 factores con medidas repetidas y T de Student Neuman Keuls como *post hoc* \*  $p < 0.0004$ .

Asimismo, analizamos el efecto tanto de la CC como del anti-CC en las latencias, frecuencias y duración promedio de los eventos de los estados de vigilia (ver tabla 1). El efecto que tiene la CC en el tiempo total de la vigilia y en el sueño MOR es alterando la frecuencia de los eventos y acortando la latencia al inicio de sueño MOR. La CC no modifica la frecuencia ni la latencia a los eventos de sueño nMOR.

		VIGILIA			nMOR			MOR		
		SS	CC	anti-CC	SS	CC	anti-CC	SS	CC	anti-CC
Frecuencia (eventos/ 12 hrs)	Media	66.6	44.5 <sup>a</sup>	73	107.3	102	110.1	52.2	80.3 <sup>a</sup>	56.5
	ee	6.3	4.0	7.3	7.6	8.5	9.6	4.5	2.6	1.54
Duración promedio (min)	Media	3.24	2.36 <sup>a</sup>	3.77	3.33	3.80	3.03	1.93	2.08	1.54
	ee	0.27	0.39	0.31	0.37	0.25	0.39	0.18	0.30	0.18
Latencia (min)	Media				24.5	11.8	20.1	40.6	0.1 <sup>p</sup>	37.6
	ee				6.1	5.0	4.3	12.4	0.1	8.5

Tabla. 1 Efecto de la administración de la CC y del anti-CC sobre los parámetros de sueño-vigilia. Los datos representan la media  $\pm$  S.E.M. de la frecuencia (número de eventos/12 horas) duración promedio de los eventos (minutos) y la latencia (tiempo transcurrido desde el inicio del registro de sueño a la presentación del primer evento de cada fase de sueño (minutos) <sup>a</sup> $p < 0.05$  CC vs SS, <sup>b</sup> $p < 0.05$  CC vs SS (Kruskall Wallis and Mann-Whitney *U* test), SS n= 14, CC n= 6, anti-CC n= 8.

## Registro de la temperatura

Después de la administración i.c.v., de la CC y viendo los efectos que observamos en los registros de sueño, se procedió a realizar un experimento piloto para, analizar el efecto que tiene la CC en la temperatura y como lo podemos relacionar con los efectos observados en el sueño. Los resultados observados son, que la CC en la concentración de 0.7 ng tiende a disminuir la temperatura en 2 °C respecto al grupo control (Fig. 13).

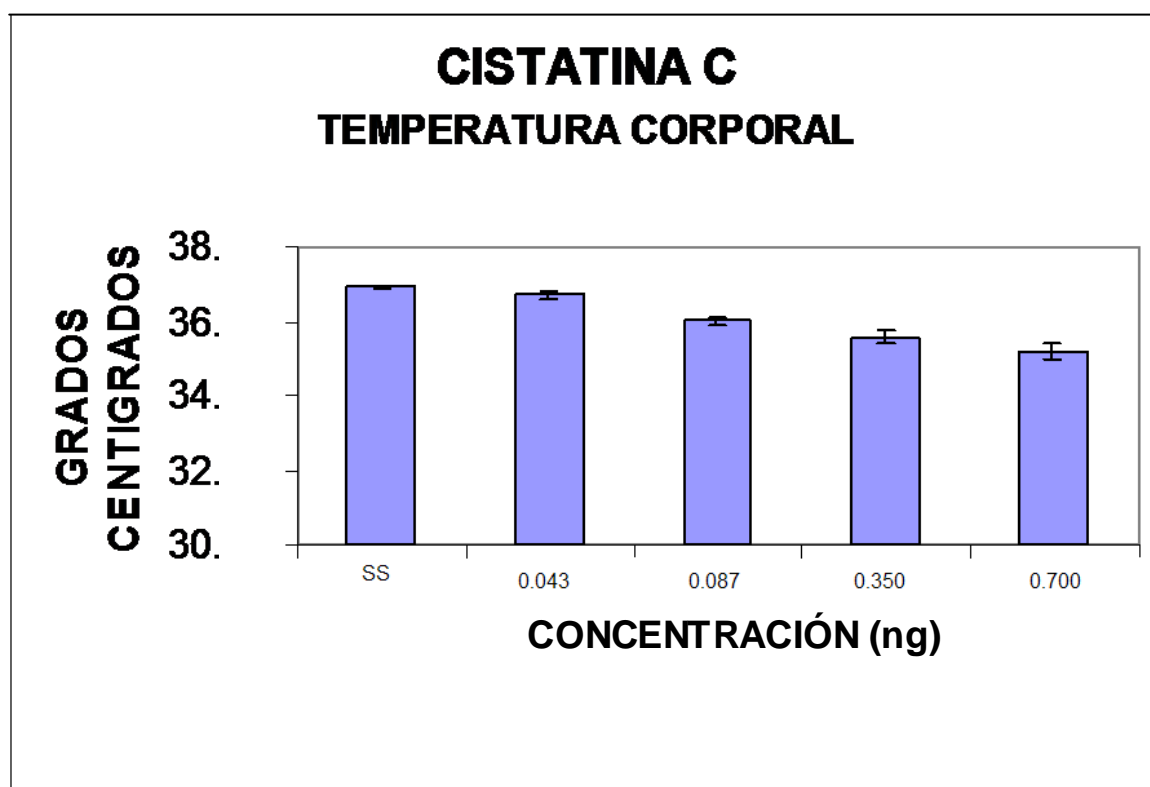


Fig. 13 Efecto de la administración i.c.v., de la CC en la temperatura corporal de la rata. No se hizo estadística porque es una n= 2.



## VII. DISCUSIÓN

A la fecha, se conocen diferentes moléculas como factores inductores de sueño, en la mayoría de ellas, su papel como inductores o moduladores del sueño se considera como una función alternativa, debido a que inicialmente fueron identificados como participantes en otros procesos.

¿Cómo se originan estos factores inductores de sueño? ¿Cómo participan de manera orquestada para inducir el sueño? No se conoce, es importante profundizar en la identificación de los procesos bioquímicos y moleculares que están participando en la modulación del sueño y en particular del sueño MOR, ya que se ha propuesto, que durante ésta fase de sueño se llevan a cabo diferentes funciones, como la consolidación de la memoria.

Las proteínas participan en la regulación del ciclo sueño vigilia, como ya lo han mostrado los trabajos pioneros de Drucker y colaboradores, desde los años 70's. A la fecha, ya se ha descrito la participación de las proteínas sintetizadas *di novo* en la regulación del sueño MOR, a través de la aplicación de inhibidores de la síntesis de proteínas (Rojas-Ramírez, 1977; Drucker-Colín et al, 1979 y Drucker-Colín et al, 1980), en trabajos recientes se ha descrito que también se incrementa la tasa de síntesis de proteínas durante el sueño profundo (Nakanishi et al, 1997), por otro lado, la administración local de un inhibidor de síntesis de proteínas (anisomicina) ocasiona un incrementando en el sueño, el efecto en el sueño es dependiendo del área cerebral donde se administra, si se administra en el área preóptica lateral incrementa el sueño nMOR fase 2, si se administra en el hipotálamo perifornical/lateral ocasiona un incremento en el sueño MOR (Methippara et al, 2008), por otro lado, ha sido descrita la participación de un inhibidor de proteasas exógeno en el incremento del sueño MOR (Sastre et al, 1983), la participación de los inhibidores endógenos de proteasas en la regulación del sueño, prácticamente no se ha abordado. Nosotros somos los pioneros, a partir de las proteínas totales presentes en el LCE de ratas privadas de sueño MOR, describimos que la concentración de la CC, se incrementa durante la privación de sueño MOR y

tiende a disminuir con el rebote (González-Rivera et al, 2003 y González-Rivera, 2004).

Los sistemas de regulación endógenos, tanto de la síntesis, como de la degradación de proteínas, estarán participando en la regulación de los diferentes estados de vigilia, por lo tanto es muy importante conocer como se lleva a cabo la interacción entre las proteasas y sus inhibidores endógenos, para regular el procesamiento, la activación, la degradación, que influyen en la vida media y la funcionalidad de las proteínas que pueden estar participando en la regulación del sueño.

Las proteínas participan en la regulación del sueño, afectando el sueño nMOR y sueño MOR, la administración de inhibidores de síntesis de proteínas alteran el sueño ya sea incrementándolo o disminuyéndolo, teniendo efectos tanto en sueño nMOR como en sueño MOR. En la literatura está descrito que la administración localizada del inhibidor de síntesis de proteínas (anisomicina) dependiendo de la estructura donde se administre afecta al sueño nMOR o sueño MOR y el efecto es dependiente del ciclo luz oscuridad.

Los datos reportados en la literatura, acerca de la participación de las proteínas en el sueño, el efecto de los inhibidores de síntesis de proteínas, la vía y sitio de administración, así como la hora del día, son muy controvertidos. Sin embargo, no cabe duda que su participación es muy importante.

Efectivamente, no se conoce la participación de las proteasas en la regulación de la vida media de las proteínas que participan en la regulación del sueño. La investigación de la participación de inhibidores de proteasas en la regulación del sueño se ha soslayado, nosotros estamos abordando el estudio de la participación de las proteínas en la regulación del sueño, a través del efecto de un inhibidor de proteasas endógeno: la CC.

En este trabajo hemos analizando el papel que juega la CC en la regulación del sueño.

## Variación diurna de la CC y de la CH

Primero exploramos como varía la concentración de la CC en condiciones control, durante las 24 hr del día, para analizar si se puede correlacionar con la alternancia en los estados de vigilia. La variación diurna de la concentración de la CC y de su precursor en el LCE, presenta el valor mínimo a las 09:00 hr, respecto a las otras horas del día, observándose el mayor pico en la concentración a las 17:00.

De estos resultados podemos sugerir que la CC no podría ser considerada como un factor inductor de sueño, de acuerdo a los criterios establecidos en 1989 (Borbély & Tobler, 1989), ya que al inicio del periodo de sueño en la rata, que corresponde al periodo de luz, la concentración de la CC es mínima, respecto a las otras horas del día y mientras transcurre el periodo de sueño se incrementa su concentración, sosteniéndose este incremento hasta las 17:00 hr. Proponemos que la CC participa en los procesos bioquímicos que se activan una vez que se ha instalado el sueño y más bien, puede estar participando en favorecer que prevalezcan las condiciones para que se presente el sueño.

Observamos una correlación en la concentración de la CC y de su precursor proCC durante las 24 hr del día, la cual corresponde con una mayor prevalencia del sueño MOR, podemos sugerir que la actividad de la CC inhibiendo a las catepsinas, favorece la presencia y/o mantenimiento del sueño MOR. Este proceso estaría ocurriendo en las estructuras promotoras del sueño MOR, a las que tendría acceso la CC presente en LCE; ya que la concentración de la CC no presenta una variación diurna en otros fluidos biológicos como orina (Conti et al, 2005), o plasma sanguíneo (Cimerman et al, 2000).

Con relación a la variación diurna de catepsinas, observamos que la inmunorreacción de la CB en el LCE de la rata era muy intensa, sin que se pudiera detectar una variación diurna, mientras que la CH no fue detectada. En el plexo coroideo no existe una variación diurna de la CC, tampoco existe una variación diurna de la CH (León, 2005); sin embargo en hígado de rata si existe

una variación diurna en la concentración y actividad proteolítica de las catepsina B y H (Waguri et al, 1990).

### **Privación de sueño MOR y CC**

Realizamos estudios de privación selectiva de sueño MOR, para ver como influye la alteración experimental de los estados de vigilancia en la concentración de la CC y de su precursor pro-CC. Observamos que la pMOR no modifica la concentración del péptido precursor, sin embargo se ve incrementada con el rebote. Se observa un incremento en la CC con la privación, y con el rebote de sueño se mantiene elevada su concentración. Sin embargo, la concentración de ambas proteínas también se incrementa en las ratas de control de estrés del método de pMOR y no disminuye en el rebote, por lo que no podemos descartar el efecto del estrés en nuestros resultados.

También analizamos la concentración de CH en el plexo coroideo, observamos que se incrementa de manera significativa en el grupo de pMOR, y con el periodo de rebote tiende a disminuir sin que ésta reducción sea significativa, nuevamente observamos que la CH, también se incrementa en las ratas control de estrés del método de pMOR. De estos resultados, podemos sugerir que entre otras catepsinas u otras proteasas, la CH participa en los procesos fisiológicos que se llevan a cabo durante la pMOR, probablemente degradando las proteínas que favorecen que se establezca el sueño MOR, una vez que se les permite dormir, existe la tendencia a disminuir la concentración de catepsina H sin que llegue a condiciones basales.

El método de pMOR empleado en este trabajo, es ampliamente utilizado, con un periodo de privación selectiva de MOR durante 48 horas, disminuye significativamente el sueño MOR, ocasionando un incremento en la vigilia, durante el rebote, no existe un incremento en el sueño nMOR ya que se presenta una prioridad para que se lleve a cabo la recuperación del MOR, éste método de privación de sueño, tiene el inconveniente, de que el primer día de privación, disminuye ambas fases de sueño, induciendo a su vez una disminución del sueño nMOR total (Grahnedt & Ursin, 1985).

Con relación al control de pMOR, está descrito que la cantidad de sueño MOR, no varía significativamente respecto al que se presenta en controles de caja, sin embargo ambos grupos difieren en la calidad del sueño nMOR 1 y 2, los controles de pMOR presentan un incremento de sueño nMOR 2 y de sueño MOR durante las primeras 3 horas en que se les permite dormir, posiblemente a causa de otros factores diferentes al método de privación (Grahstedt & Ursin, 1985), el incremento en sueño nMOR y sueño MOR, puede deberse a una cascada de eventos desencadenados por la activación de aferencias noradrenérgicas que vienen del LC (Charifi et al, 2000), posiblemente, por esta razón no logramos que en nuestros grupos experimentales de la privación de sueño lleguen a condiciones basales, en los niveles de concentración de la CC y CH, y necesitaríamos incrementar el tiempo de rebote de sueño, ya que se ha propuesto que para un periodo de privación de sueño de 72 hr, se requieren 48 horas para la normalización del sueño (Van Luitelaar & Coenen, 1985).

No podemos descartar la participación del estrés en el método de privación, al respecto, vale la pena mencionar que prácticamente todos los métodos de privación de sueño conllevan una carga de estrés, descartar su efecto resulta problemático; aunado a este hecho, el uso de una plataforma grande como grupo control de estrés no está exento de modificaciones en el patrón de sueño (Suchecki et al, 1998).

Se ha propuesto que los efectos secundarios del control del método de pMOR como el aislamiento social, el confinamiento y el estrés generado, influyen de manera importante en el sueño (Coenen, 2001), también pueden estar participando otros factores como, procesos homeostáticos y circadianos, los cuales permanecen sin ser esclarecidos (Deurveilher & Hennevin 2001). Se ha descrito que tanto la pMOR como su control de estrés ocasionan un incremento en la secreción de la ACTH y de la corticosterona (Suchecki et al, 1998), es decir, el método de privación selectiva de sueño MOR que utilizamos, también induce una activación del eje hipotálamo-hipófisis-corteza adrenal, por lo cual no podemos descartar la influencia de éste en nuestros resultados.

Incluso se ha propuesto que un buen control ambiental de la privación sea emplear una rejilla (Suchecki et al, 2000), en lugar de una plataforma grande.

### **Efecto de la CC sobre el sueño**

Por otra parte, la administración de la CC disminuye la vigilia e incrementa el sueño MOR. La disminución en la vigilia está dada por la reducción tanto en la frecuencia como en la duración promedio de los eventos, mientras que el incremento del tiempo total en sueño MOR está dado por un aumento en su frecuencia y la disminución en su latencia.

Con estos resultados podemos sugerir que el efecto de la CC en la regulación del sueño es a través de disminuir la latencia y el incremento de la frecuencia de los eventos de sueño MOR a expensas de la disminución de la frecuencia y duración promedio de los periodos de la vigilia, por lo tanto, favoreciendo que prevalezca el sueño. Proponemos que la CC funcionaría como facilitador de las condiciones bioquímicas para que los factores inductores de sueño lleven a cabo su función, esto puede ser, por la inhibición de las catepsinas que ocasiona, que no sean degradadas las proteínas que son su sustrato y que son inductores o facilitadores para que se presente el sueño, en particular del sueño MOR. El efecto de la CC de favorecer que prevalezcan las proteínas que participan en la inducción del sueño MOR, también permite que permanezcan las condiciones para que se establezca esta fase de sueño, ya que incrementa su frecuencia, pero no participa en los mecanismos bioquímicos que determinan la finalización de un periodo de sueño MOR, ya que, no tiene efecto en la duración promedio de los eventos de sueño MOR. Sin embargo, para comprobar nuestra hipótesis acerca de la función de la CC en la regulación del sueño, se necesita profundizar en la investigación de las proteasas y sus inhibidores en la regulación del sueño, así como, en la identificación de las proteínas sustrato, reguladoras del sueño MOR, así como determinar las estructuras neuroanatómicas donde se lleva a cabo la

interacción espacio temporal de los inhibidores-proteasas-proteínas para la regulación del ciclo vigilia-sueño.

El hecho de que la CC tenga efecto, disminuyendo la vigilia e incrementando el sueño MOR, sin tener efecto en el sueño nMOR, nos puede permitir sugerir que las catepsinas que participan en la regulación del sueño, tienen como sustrato proteínas promotoras de sueño MOR y que posiblemente exista otro tipo de proteasas que degraden a las proteínas promotoras del sueño nMOR. Se necesita ampliar la investigación de la participación de los diferentes tipos de proteasas y sus inhibidores en la regulación del sueño.

Cuando analizamos los registros de sueño por horas, observamos que el efecto de CC se da en las últimas horas de registro. Se ha descrito que la vida media de la CC en plasma es de 20 min y es secretada vía renal en 2 hr (Filler et al, 2005), sin embargo en el LCE no existen proteasas que degraden a la CC (Wei et al, 1998), así que cabe la posibilidad de que su vida media sea mayor. No obstante creemos que el efecto tardío sobre el registro de sueño se debe a que no es directamente la CC la que afecta los estados de vigilia, sino que más bien, ésta desencadena una serie de reacciones que traen como consecuencia el incremento en la vigilia y la disminución del sueño MOR.

El volumen total del LCE de la rata es de 300  $\mu$ l, la tasa de secreción es de 3.6  $\mu$ l/min, la tasa de recambio del volumen total es de 6.3 minutos (Takamata et al, 2001), así pues, es poco probable que el tiempo de distribución de la CC, en el LCE, sea el responsable de su efecto tardío. La CC administrada vía i.c.v., para llegar a los sitios donde llevó a cabo su función, pudo ser endocitada por las células del epéndimo o haya atravesado el epitelio y pasar al parénquima cerebral, o bien asociada con neuroglobina la cual modula el transporte de los dímeros de la CC (Wakasugi et al, 2004) otra posibilidad es que la CC se haya dimerizado, ya que la dimerización de CC ocasiona su inactividad como inhibidor de proteasas (Merz et al, 1997), puede ser que una vez dimerizada como parte del tráfico intracelular tenga su efecto cuando llega a estructuras promotoras del sueño MOR, o bien la CC administrada en el LCE llegó a las estructuras promotoras del sueño MOR a

través de neuronas especiales, llamadas de contacto con el LCE distal, ya que se ha descrito que se encuentran principalmente localizadas en contacto con el tallo cerebral y pueden ser relevantes para la modulación del sueño (Lu et al, 2008), a través de la comunicación intercelular por una transmisión de señales no sináptica (revisado en Lu et al, 2008), las cuales juegan un papel importante en la neuromodulación y regulación neuroendocrina, a través de la señalización, transporte de sustancias, entre el parénquima cerebral y el LCE. La CC pudo llevar a cabo su función en el espacio extracelular, pero también pudo funcionar intracelularmente, se ha descrito, que existe un sistema activo de recaptura de la CC (Wassélius et al, 2004), la CC pudo llevar a cabo su función promoviendo la actividad de estructuras relacionadas con la promoción del sueño MOR o inhibiendo procesos que se llevan a cabo en estructuras encargadas de la promoción o regulación de la vigilia.

Con la administración del anti-CC no observamos ningún efecto sobre los estados de vigilancia, lo cual puede ser a causa de que no administramos suficiente anticuerpo para bloquear la actividad de la CC que participa en la regulación del sueño MOR y vigilia, para saber a que concentración tenemos este efecto, necesitamos realizar una curva dosis-respuesta.

### **Efecto de la CC sobre la temperatura**

Observamos que la administración i.c.v., de la CC ocasionó una disminución en la temperatura rectal en la rata. Se ha descrito que el sueño está estrechamente relacionado con la temperatura corporal. La termorregulación durante el sueño nMOR es similar a la vigilia, sin embargo, está se altera durante el sueño MOR incluso, se ha dicho que durante esta fase de sueño, los animales no regulan su temperatura. El pico máximo de la temperatura en humanos se presenta al final de la tarde e inicio de la noche, y es mínima en la segunda mitad del periodo de sueño, coincidiendo con la mayor prevalencia de sueño MOR. El inicio de sueño tiende a coincidir con la disminución de la temperatura rectal y el final del periodo de sueño coincide con el inicio en el incremento de la temperatura. Además, la temperatura tiene



efectos en la duración del sueño, ya que si éste se inicia cerca de la hora de la temperatura mínima corporal, tiende a ser de menor duración. De hecho se ha sugerido que la fase circádica de la temperatura influye en el tiempo de sueño más que la vigilia previa (revisado en Borbély et al, 1998; Lavie, 2001). También se ha sugerido que una de las funciones del sueño es la disipación de calor.

El estudio de la temperatura y sus efectos en el sueño se ha realizado con un enfoque hemodinámico y se ha observado que durante el sueño MOR disminuye la temperatura respecto al sueño nMOR a nivel periférico (aurícula auditiva), mientras que se incrementa la temperatura en algunas regiones cerebrales como en el hipotálamo ( $0.12\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y en el puente ( $0.08\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (Parmeggiani et al, 2002). También se ha descrito el efecto de la disminución de la temperatura ambiental ( $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) o el incremento ( $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) durante 4 semanas en el sueño en la rata; la disminución de la temperatura ocasiona una disminución del sueño y posteriormente un incremento del sueño nMOR, sin afectar al sueño MOR y ocasiona un incremento permanente de la temperatura cerebral, mientras que el incremento en la temperatura ambiental ocasiona un incremento tanto en el sueño nMOR como en el sueño MOR siendo prominente el incremento en el sueño MOR, sin tener algún efecto en la temperatura cerebral (Mahapatra et al, 2005).

Por otra parte, se ha observado que sustancias que disminuyen la temperatura cerebral, por ejemplo fluoxetina, disminuyen el sueño MOR (Gao et al, 1992), atropina disminuye la temperatura hipotalámica y el sueño MOR sólo si es administrada a una temperatura ambiental relativamente baja (Szymusiak et al, 1994).

Con estos antecedentes podemos sugerir que la CC está promoviendo un incremento de sueño MOR y disminución de la vigilia por procesos independientes de su efecto en la temperatura. Nosotros sólo medimos la temperatura rectal y ésta no necesariamente es igual a la cerebral (Henker et al, 1998). Por otro lado, la disminución de la temperatura que observamos en los resultados obtenidos con la administración de CC y sus efectos en el sueño

requieren que se realice una investigación más detallada con la colocación de termistores a nivel periférico, así como en sitios promotores del sueño MOR y determinar cuánto tiempo prevalece el efecto de la CC en la disminución de la temperatura, ya que nosotros únicamente registramos el efecto de la administración de la CC sobre la temperatura rectal después de 30 minutos.

Por último, está bien documentado que un desbalance entre catepsinas y cistatina ocurre en procesos patológicos, sin embargo éste trabajo muestra que el balance catepsina H/CC varía con los estado de vigilancia del sujeto, por lo que es necesario estudiar con mayor profundidad la participación del sistema proteasas/inhibidores endógenos en el ciclo sueño-vigilia.

## **VIII. CONCLUSIONES**

La CC un inhibidor endógeno de proteasas, es una molécula reguladora del sueño, con efectos selectivos en el sueño MOR, su efecto puede ser a través de la función de inhibidor de las catepsinas o, a través de otras funciones como se ha reportado en la literatura: como mitogénico, neuroprotector, neurogénesis, desarrollo glial, neurodegeneración, astrogénesis, actividad fagocítica y quimiotaxis. Se necesita profundizar en la investigación de la participación de la CC en la regulación del sueño y en que estructuras cerebrales se lleva a cabo ésta función.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrahamson M, Olafsson I, Palsdottir A, Ulvsbäck M, Lundwall, Jensson O, Grubb A. (1990). Structure and expression of the human cystatin C gene. *Biochem J.* 268 (2): 287-294.

Anónimo (2005) Waking up to the importance of sleep. *Nature* 437 (7063): 1207.

Copyright WebSciences International and Sleep Research Society (United States). Basics of Sleep Behavior. Sleep Research Society. UCLA & SRS, 1997 WebSciences International 1251 Westwood Blvd Los Angeles CA 90024 ([www.sleephomepages.org/sleepsyllabus/sleephome.html](http://www.sleephomepages.org/sleepsyllabus/sleephome.html)).

Barret A.J. (1994). Classification of peptidases. *Methods in enzymology* 244, 1-15.

Basheer R, Brown R, Ramesh V, Begum S, McCarley RW. (2005). Sleep deprivation-induced protein changes in basal forebrain: Implications for synaptic plasticity. *Journal of Neuroscience Research.* 82: 650-658.

Basheer R, Mgner M, McCarley RW, Shiromani PJ. (1998). REM sleep deprivation increase the levels of tyrosine hydroxylase and norhepinefrine transporter mRNA in the *Locus coeruleus*. *Molecular Brain Research.* 57: 235-240.

Björk I, Brieditis I, Raub-Segal E, Pol E, Hakansson K, Abrahamson M. (1996). The importance of second Hairpin loop of cystatin C for proteinase binding characterization of the interaction of Trp-106 variants of inhibitor with cysteine proteinases. *Biochemistry* 35 (33): 10720-10726.

Boissard R, Gervasoni D, Schmidt MH, Barbagli B, Fort P, Luppi PH. (2002). The rat ponto-medullary network responsible for paradoxical sleep onset and maintenance: a combined microinjection and functional neuroanatomical study. *European Journal of Neuroscience*, 16: 1959-1973.

Borbély AA, Achermann P, Geering B, Tobler I. (1998). Processes Underlying Sleep Regulation. Watson SJ. *Psychopharmacology: The fourth Generation of Progress*. Versión No. 2, CD ROM. ACNP Inc., Lippincott-Raven, New York.

Borbély AA, Tobler I. (1989). Endogenous sleep-promoting substances and sleep regulation. *Physiol Rev*. 69:605-670.

Brown WM, Dziegielewska KM. (1997). Friends and relations of the cystatin superfamily new members and their evolution. *Protein science* 6:5-12.

Bühling F, Waldburg N, Kruger S, Wiesner O, Weber E, Welte T. (2002). Expression of cathepsins B, H, K, L and S during human fetal lung development. *Developmental Dynamics* 225: 14-21.

Bures J, Buresova O, Huston J. (1967). Techniques and basic experiments for the study of brain and behavior. Elsevier Scientific Publishing Company. The Netherlands. 231.

Chapman H, Riese RJ, Shi GP. (1997). Emerging roles for cysteine proteases in human biology *Annu. Rev. Physiol* 59:63-88.

Charifi Ch, Paut-Pagano L, Debilly G, Cespuglio R, Jouvet M, Valatx JL. (2000) Effect of noradrenergic denervation of the amygdala upon recovery after sleep deprivation in the rat. *Neuroscience Letters*. 287:41-44.

Chornaya V, Lyannaya O. (2004). Some Physicochemical properties of cathepsin H from human meningioma. *Exp Oncol*. 26(4): 278-81.

Chwieralski CE, Welte T, Bühling F. (2006). Cathepsin-regulated apoptosis. *Apoptosis* 11 (2): 143-49.

Cimerman N, Brguljan PM, Krasovec M, Suskovic S, Kos J. (2000). Twenty-four hour variations of cystatin C and total cysteine proteinase inhibitory activity in sera from healthy subjects. *Clinica chimica Acta*. 291: 89-95.

Cirelli C, Gutierrez CM, Tononi G. (2004). Extensive and divergent effects of sleep and wakefulness on brain gene expression. *Neuron*. 41: 35-43.

Cirelli C, Pompeiano M, Arrighi P, Tononi G. (1995). Sleep-waking changes after *c-fos* antisense injections in the medial preoptic area. *Neuroreport* Mar 27; 6(5):801-805.

Cirelli C, Tononi G. (1999a). Differences in gene expression during sleep and wakefulness. *Ann Med*. Apr; 31(2): 117-24.

Coenen AM. (2001). The controversial platform technique for REM sleep deprivation in rats. *Sleep-wake Research in Netherlands*. 12: 20-24.

Cole T, Dickson P, Esnard F, Averill S, Risbridger, Gautrier F, Schreiber G. (1989). The cDNA structure and expression analysis of the genes for the cysteine proteinase inhibitor cystatin C for  $\beta$ 2-microglobulin in rat brain. *Eur. J. Biochem FEBS* 186: 35-42.

Conti M, Zater M, Lallali K, Durrbach A, Moutereau S, Manivet P, Eschwège P, Loric S. (2005). Absence of circadian variations in urine Cystatin C allows its use on urinary samples. *Clinical Chemistry*. 51, 1: 72-72.

Cygler M, Mort J. (1997). Proregion structure of members of the papain superfamily. Mode of inhibition of enzymatic activity. *Biochimie* 79: 645-52.

Dahal A, Eriksson P, Davidsson P, Persson A, Ekman R, Westman-Brinkmalm A. (2004). Demonstration of multiple novel glycoforms of the stem cell survival factor CCg. *J of Neuroscience Research*. 77: 9-14.

Datta S. (2002). Evidence that REM sleep is controlled by the activation of brain stem pedunclopontine tegmental Kainate receptor. *J Neurophysiol* 87 (4): 1790-1798.

Deurveilher S, Hennevin E. (2001). Lesions of the pedunclopontine tegmental nucleus reduce paradoxical sleep (PS) propensity: evidence from a short-term PS deprivation study in rats. *European Journal of Neuroscience*, 13: 1963-1976.

Drucker-Colín R, Espejel RM. (1980). Chronic administration of chloranphenicol a protein synthesis inhibitor, selectively decreases REM sleep. *Behavioral and Neural Biology*. 29: 410-13.

Drucker-Colín R, Spanis CW, Cotman CW, McGaugh JL. (1975) Changes in protein levels in perfusates of freely moving cats: Relation to behavioural state. *Science*. 187: 963-965.

Drucker-Colín R, Tuena de Gómez-Poyou M, Gutiérrez MC, Dreyfus-Cortés G. (1980). Immunological approach to the study of neurohumoral sleep factors: Effects on REM sleep of antibodies to brain stem proteins. *Experimental Neurology* 69: 563-575.

Drucker-Colín R, Zamora J, Bernal-Pedraza J, Sosa B. (1979). Modification of REM sleep and associated phasic activities by protein synthesis inhibitors. *Exp Neurol*. Mar 63(3): 458-67.

Drucker-Colín R. (1973). Crossed perfusion of a sleep inducing brain tissue substance in conscious cats. *Brain Research*, 56: 123-134.

Everson CA & Toth LA (2000). Systemic bacterial invasion induced by sleep deprivation. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*. 278: R905-R916.

Filler G, Bökenkamp A, Hofmann W, Le Bricon T, Martínez-Bru C, Grubb A. (2005). Cystatin C as a marker of GFR-history, indications, and future research. *Clinical Biochemistry*. 38:1-8.

Gao B, Duncan WC Jr, Wehr TA. (1992). Fluoxetine decreases brain temperature and REM sleep in Syrian hamsters. *Psychopharmacology (Berl)* 106(3): 321-329.

González-Rivera R, Martínez-Vargas M, Murillo Rodríguez E, Landa A, Prospero-García O, Verdugo-Díaz L, Navarro L. (2003). Identification of a 12 KDa protein extracted from cerebrospinal fluid (CSF) of rats deprived of rapid eye movement sleep (REMS). 33rd Annual Meeting Society for Neuroscience. New Orleans, LA.

González Rivera R. (2004). Identificación y Caracterización de Proteínas con Expresión Diferencial Durante el Sueño de Movimientos Oculares Rápidos (sMOR) Tesis de Maestría, Posgrado en Ciencias Biológicas UNAM. 58.

Grahnstedt S, Ursin R. (1985). Platform sleep deprivation affects deep slow wave sleep in addition to REM sleep. *Behavioural Brain Research*, 18: 233-39.

Grubb A, Lofberg H, Barret A. (1984). The disulphide bridges of human cystatin C ( $\gamma$ -trace) and chicken cystatin. *FEBS Letters* 170 (2): 370-374.

Grzonka Z, Jankowska E, Kasprzykowski F, Kasprzykowska R, Lankiewicz L, Wiczek W, Wieczerek E, Ciarkowski J, Drabik P, Janowski R, Kozak M, Jaskólski M, Grubb A. (2001). Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. *Acta Biochimica Polonica*. 48 (1): 1-20.

Hasegawa A, Naruse M, Hitoshi S, Iwasaki Y, Taquebayashi H, Ikenaka K. (2007). Regulation of glial development by cystatin C *Journal of Neurochemistry* 100: 12-22.

[Heller HC](#), Ruby NF. (2004). Sleep and circadian rhythms in mammalian torpor. *Annu Rev Physiol*. 66: 275-289.



Henker RA, Brown SD, Marion DW, Narayan RK, Marshall LF, Tator CH, Wilberger JE. (1998). Comparison of brain temperature with bladder and rectal temperature in adults with severe head injury. *Neurosurgery*. 42 (5): 1071-1075.

Janowski R, Kozac M, Jankowska E, Grzonka Z, Grubb A, Abrahamson M, Jaskolski M. (2001). Human cystatin C, an amyloidogenic protein, dimerizes through tree dimensional domain swapping. *Nature Structural Biology*. 8 (4): 316-320.

Jouvet M. (1994). Paradoxical sleep mechanism. *Sleep Dec*. 17 (8 Suppl): s77-s83.

Koyama Y, Sakai K. (2000). Modulation of presumed cholinergic mesopontine tegmental neurons by acetylcholine and monoamines applied iontophoretically in unanesthetized cats. *Neuroscience*. 96: 723-733.

Kryger MH, Roth T, Dement WC (eds). (2000). *Principles and Practice of Sleep Medicine*. Third edition Ed. W. B. SAUNDERS COMPANY Philadelphia U.S.A. 1336.

Laterza O, Price Ch, Scott M. (2002). Cystatin C: An improved estimator of glomerular filtration rate. *Clinical Chemistry*. 48 (5) 699-707.

Lavie P. (2001). Sleep-wake as a biological rhythm. *Annual Review of Psychology*. 52: 277-303.

Lennon-Duménil AM, Roberts RA, Valentijn K, Driessen C, Overkleeft HS, Erickson A, Peters PJ, Bikoff E, Ploegh HL, Wolf Bryant P. (2001). The p41 isoform of invariant chain is a chaperone for cathepsin L. *EMBO J*. Aug 1; 20(15): 4055-64.

León Rosario PB. (2005). Estudio de la expresión diurna de la Catepsina H, en el plexo coroideo de la rata. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. U.N.A.M. 30-45.

Levicar N, Strojnik T, Kos J, Dewey R, Pilkington J, Lah T. (2002). Lysosomal enzymes, cathepsins in brain tumour invasion. *Journal of neuro-oncology* 58: 21-32.

López-Otín C, Overall CM. (2002). Protease degradomics: A new Challenge for proteomics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 3: 509-519.

Lu J, Sherman D, Devor M, Saper C. (2006). A putative flip-flop switch for control of REM sleep. *Nature* 441: 589-594.

Lu X, Geng X, Zhang L, Zeng Y. (2008). The methodology for labeling the distal cerebrospinal fluid-contacting neurons in rats. *J Neuroscience Methods* 168: 93-103.

Mahapatra AP, Mallick HN, Kumar VM. (2005). Changes in sleep on chronic exposure to warm and cold ambient temperatures. *Physiol. Behav.* 84 (2): 287-294.

Mahowald MW, Schenck CH. (2005). Insights from studying sleep disorders. *Nature* 437: 1279-1285.

Majumdar S, Mallick BN. (2003). Increased levels of tyrosine hydroxylase and glutamic acid decarboxylase in *locus coeruleus* neurons after rapid eye movement sleep deprivation in rats. *Neuroscience Letters*. 338: 193-196.

Mallick BN, Kaur S, Saxena RN. (2001). Interaction between cholinergic and GABAergic neurotransmitters in and around the *Locus Coeruleus* for the induction and maintenance of rapid eye movement sleep in rats. *Neuroscience* 104 (2): 467-485.

Maquet P, Franck G. (1997) REM sleep and amygdala *Molecular Psychiatry* 3: 195-196.

Marinesco S, Bonnet C, Cespuglio R. (1999). Influence of stress duration on the sleep rebound induced by immobilization in the rat: A possible role for corticosterone. *Neuroscience*. 92 (3): 921-933.

McGinty D, Szymusiak R. (1990). Keeping cool: a hypothesis about the mechanisms and functions of slow-wave sleep. *Trends Neurosci*. 13(12): 480-487.

Merz G, Benedikz E, Schwenk V, Johansen T, Vogel L, Rushbrook J, Wisniewski H. (1997). Human cystatin C forms an inactive dimer during intracellular trafficking in transfected CHO cells. *J Cellular Physiology*. 173: 423-432.

Methippara MM, Alam MN, Kumar S, Bashir T, Szymusiak R, McGinty D. (2008). Administration of the protein synthesis inhibitor, anisomycin, has distinct sleep promoting effects in lateral preoptic and perifornical hypothalamic sites in rats. *Neuroscience*. 151: 1-11.

Monti JM, Monti D. (2000). Role of dorsal raphe nucleus serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor in the regulation of REM sleep. *Life Sciences*. 66 (21): 1999-2012.

Nagai A, Terashima M, Harada T, Shimode K, Takeuchi H, Murakawa Y, Nagasaki M, Nakano A, Kobayashi S. (2003). Cathepsin B and H activities and cystatin C concentrations in cerebrospinal fluid from patients with leptomeningeal metastasis. *Clinica Chimica Acta*. 329: 53-60.

Nakanishi H, Sun Y, Nakamura RK, Mori K, Ito M, Suda S, Namba H, Storch FI, Dang TP, Mendelson W, Mishkin M, Kennedy C, Gillin JC, Smith CB, Sokoloff L. (1997). Positive correlations between cerebral protein synthesis rates and deep sleep in *Macaca mulatta*. *The European Journal of Neuroscience* 9 (2): 271-279

Navarro L, Murillo-Rodríguez E, García-Sierra Y, Guzmán-Marín R, Martínez-González D, Cisneros M, Martínez-Vargas M. (2000). La neuroquímica del

sueño. En: Tópicos en psiquiatría biológica. Torner Aguilar C y Velázquez Moctezuma J. Eds. 39-74 México. Universidad Autónoma Metropolitana, Sociedad Mexicana de Psiquiatría Biológica.

Ocampo-Garcés A, Molina E, Rodríguez A, Vivaldi EA. (2000). Homeostasis of REM sleep after total and selective sleep deprivation in the rat. *J. Neurophysiology*. 84 (5): 2699-2702.

Opp MR, Toth LA. (2003). Neural-immune interactions in the regulation of sleep. *Frontiers in Bioscience*. 8: d768-d779.

Parmeggiani PL, Azzaroni A, Calasso M. (2002). Systemic hemodynamic changes raising brain temperature in REM sleep. *Brain Res*. 940: 55-60.

Paxinos G, Watson Ch. (1998). The rat brain in stereotaxic coordinates. 4<sup>th</sup> Edition. Academic Press an imprint of Elsevier Science. USA 21.

Perez NM, Benedito MAC. (1997). Activities of Monoamine Oxidase (MAO) A and B in discrete regions of rat brain after rapid eye movement (REM) sleep deprivation. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 58 (2): 605-608.

Pierre P, Mellman I. (1998). Developmental regulation of invariant chain proteolysis control MHC class II trafficking in mouse dendritic cells. *Cell*. 93: 1135-1145.

Prospéro-García O, Drucker-Colín R. (1996) Control neural del ciclo vigilia-sueño: mecanismos neurofisiológicos y neuroquímicos. Factores inductores de sueño. En: Ramos Platón MJ (ed) Sueño y procesos cognitivos Ed. SÍNTESIS Madrid. 131-159.

Prospéro-García O, Jiménez Anguiano A, Navarro L, Sánchez M, Murillo-Rodríguez E, Palomero M, Díaz M, Gómez M (1997) De la hipnotoxina a los neuropéptidos: A casi un siglo de progreso. Revisado en: Velázquez-Moctezuma J (ed) Medicina del Sueño: Aspectos Básicos y Clínicos. UAM, Soc. Mex. Sueño. México D.F. 57-75.

Puente XS, Sánchez LM, Overall ChM, López-Otín C. (2003). Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nature Reviews Genetics*. 4: 544-558.

Ramm P, Smith CT. (1990). Rates of cerebral protein synthesis are linked to slow wave sleep in the rat. *Physiology & Behavior*. 48: 749-53.

Rawlings ND, Barret AJ. (1994). Families of Cysteine peptidases. *Methods in enzymology* 244: 461-511.

Rawlings ND, Morton FR, Barrett AJ. (2006). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res*. 34: D270-D272.

Rawlings ND, Tolle DP, Barret AJ. (2004). Evolutionary families of peptidase inhibitors *Biochem J*. 378: 705-716.

Rechtschaffen A, Bergmann BM, Everson CA, Kushida CA, Guilleland MA. (1989). Sleep Deprivation in the Rat: X. Integration and Discussion of the findings. *Sleep*. 12 (1): 68-87.

Reed C. (2000). Diagnostic applications of cystatin C. *British Journal of Biomedical Science*. 57 (4): 423-429.

Riese RJ, Chapman HA. (2000). Cathepsins and compartmentalization in antigen presentation. *Current Opinion in immunology*. 12: 107-113.

Rojas-Ramírez JA, Aguilar-Jiménez E, Posadas-Andrews A, Bernal-Pedraza JG, Drucker-Colín RR. (1977). The effects of various protein synthesis inhibitors on the sleep-wake cycle of rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 53 (2): 147-150.

Rose GM, Dunwiddie TV. (1986). Induction of hippocampal long-term potentiation using physiologically patterned stimulation. *Neurosci Lett*. 69: 244-248.

Sastre JP, Sallanon M, Buda C, Jouvet M. (1983). Bacitracin, a peptidase inhibitor, increases paradoxical sleep in the cat. *C R Scaences Acad Sci III*. 296 (20): 965-8.

Schnittger S, Rao VV, Abrahamson M, Hansmann I. (1993). Cystatin C (CST3), the candidate gene for hereditary Cystatin C amyloid angiopathy (HCCAA), and other members of the cystatin gene family are clustered on chromosome 20p11.2. *Genomics*. 1: 50-55.

Shaw PJ, Cirelli C, Greenspan RJ, Tononi G. (2000). Correlates of sleep and waking in *Drosophila melanogaster*. *Science*. 287 (5459):1834-1837.

Shi GP, Sukhova G, Grubb A, Ducharme A, Rhode LH, Lee RT, Ridker PM, Libby P, Chapman HA. (1999). Cystatin C deficiency in human atherosclerosis and aortic aneurysms. *The Journal of Clinical Investigation* 104 (9) 1191-1197.

Siegel JM. (2005). Clues to the functions of mammalian sleep. *Nature*. 437: 1264-1271.

Spanis CW, Gutiérrez MC, Drucker-Colín RR. (1976). Neurohumoral correlates of sleep: further biochemical and physiological characterization of sleep perfusates. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 5: 165-173.

Spiro J. (2005). Sleep. *Nature*. 437 (7063): 1253.

Stenberg D. (2007). Neuroanatomy and neurochemistry of sleep. *Cell Mol Life Sci*. 64: 1187-1204.

Stern CW, Morgane PJ, Panksepp J, Zolovick AJ, Jalowiec JE. (1972). Elevation of REM sleep following inhibition of protein synthesis. *Brain Research*. 47: 254-258.

Stickgold R. (2005). Sleep-dependent memory consolidation. *Nature*. 437(7063): 1272-1277.

Suchecki D, Lobo L, Hipólido D, Tufik S. (1998). Increased ACTH and corticosterone secretion induced by different methods of paradoxical sleep deprivation. *J Sleep Research*. 7: 276-281.

Suchecki D, Duarte Palma B, Tufik S. (2000). Sleep rebound in animals deprived of paradoxical sleep by the modified multiple platform method. *Brain Research*. Sep 1; 875(1-2): 14-22.

Szymusiak R, Danowski J, McGinty D. (1994). REM sleep-suppressing effects of atropine in cats vary with environmental temperature. *Brain Res*. Feb 4; 636 (1):115-118.

Takamata A, Seo Y, Ogino T, Tanaka K, Fujiki N, Morita H, Murakami M. (2001). Effects of pCO<sub>2</sub> on the CSF turnover rate in rats monitored by Gd-DTPA enhanced T<sub>1</sub>-weighted magnetic resonance imaging. *Japanese Journal of Physiology*. 51: 555-562.

Taupin P, Ray J, Fischer W, Suhr S, Hakansson K, Grubb A, Gages F. (2000). FGF-2-Responsive neural stem Cell proliferation requires CCg, a novel autocrine/paracrine cofactor. *Neuron*. 28: 385-397.

Terao A, Greco MA, Davis RW, S  ller HC, Kilduff TS. (2003). Region-specific changes in immediate early gene expression in response to sleep deprivation and recovery sleep in the mouse brain. *Neuroscience*. 120: 1115-1124.

Tortero P, Morales FR, Chase MH. (2002). GABAergic mechanism in the pedunculopontine tegmental nucleus of the cat promote active (REM) sleep. *Brain research*. 944: 1-9.

Toth LA, Tolley EA, Krueger JM (1993). Sleep as a prognostic indicator during infectious disease in rabbits. *Proc Soc Exp Biol Med*. Jun; 203(2): 179-192.

## Potential participation of cystatin C in rapid eye movement sleep (REMS) modulation

Rubén González-Rivera<sup>a</sup>, Luz Navarro<sup>a,\*</sup>, Marina Martínez-Vargas<sup>a</sup>, Khalil Guzman-Vasquez<sup>a</sup>, Pablo León-Rosario<sup>a</sup>, Abraham Landa<sup>b</sup>, Oscar Prospero-García<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Depto. Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM. Apdo. Postal 70-250, Mexico, D.F. 04510, Mexico

<sup>b</sup> Depto. Microbiología, Facultad de Medicina, UNAM. Apdo. Postal 70-250, Mexico, D.F. 04510, Mexico

Received 14 July 2006; received in revised form 29 August 2006; accepted 29 August 2006

### Abstract

It has been hypothesized that proteins modulate rapid eye movement sleep (REMS). Studies have shown an increase in the liberation of proteins in the mesencephalic reticular formation of cats during REMS. It has also been determined that protein-synthesis inhibitors diminish REMS and that protease-inhibitors increase this sleep phase. These and other studies support the importance of “di novo” protein molecules in sleep, and in particular, in REMS regulation. In this context, it is important to determine the role of endogenous proteases and their endogenous inhibitors in sleep regulation. In this study, we found that Cystatin C (CC), an endogenous protease inhibitor, diminishes wakefulness and increases REMS. We have also found an increase in CC expression after REMS deprivation and a tendency to decrease after a 2 h period of REMS rebound. We further showed that REMS deprivation increases the expression of Cathepsin H (CH), a protease inhibited by CC. These results suggest that naturally occurring protease-inhibitors enhance REMS, perhaps by facilitating the availability of proteins.

© 2006 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** REM sleep deprivation; Sleep inducing factor; Diurnal variation; Proteins; Proteases; Cathepsin

Several experimental approaches have been used to reveal the mechanisms involved in the generation of the different sleep phases, and hence their function. One of these approaches is to search for sleep inducing molecules. This search began at the turn of the 20th century with the description of Pieron's hypno-toxin, a hypothetical substance contained in the cerebrospinal fluid (CSF) of animals and even humans, capable of inducing sleep [22]. Presently, there are dozens of described substances with sleep promoting properties that have been identified as neurotransmitters, lipids, neuropeptides, and hormones, among others. Most of these molecules have an effect on non-REMS or delta sleep. However, the molecules that promote REMS are in general peptides or proteins with more or less high molecular weight [4,12].

Drucker-Colin reported an increase in protein concentration in the extracellular *milieu* of the mesencephalic reticular formation (MRF) of cats during REMS periods [9]. In addition, the

administration of this fluid to recipient cats increased REMS, whereas the antibodies against this perfusate inhibited this sleep phase [11]. It has also been observed that protein-synthesis inhibitors diminish REMS [10,25], whereas protease inhibitors increase it [27].

After these early studies no further efforts to characterize these or other high molecular weight proteins involved in sleep regulation have been made. However, many sleep-inducing peptides have been described. Strategies such as mRNA differential display or cDNA microarrays [6,7], have been used to identify genes whose expression varies with sleep. Although there is at least one report analyzing changes in proteome expression during sleep deprivation [3], the isolation of proteins has been largely forgotten.

The participation of the endogenous protease inhibitors in sleep regulation is a new concept we would like to introduce. In this line of research, we analyzed the protein amount in the CSF of rats after REMS deprivation as well as in rats after REMS deprivation plus 2 h of sleep rebound. We identified a protein band of approximately 13.5 kD which increases after REMS deprivation. We isolated it and sent it for analysis by liquid chromatography and mass spectrometry (LC MS/MS; Yale Cancer

\* Corresponding author at: Grupo de Neurociencias, Depto. Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM, Apdo. Postal 70-250, México, D.F. 04510, Mexico. Tel.: +52 555623 2367; fax: +52 555623 2241.

E-mail address: [lnavarro@servidor.unam.mx](mailto:lnavarro@servidor.unam.mx) (L. Navarro).



Center Mass Spectrometry Resource & W. M. Keck Foundation Biotechnology Resource Laboratory). The protein band was identified as cystatin C (CC). The levels of CC increased after REMS deprivation and had a tendency to decrease after the REMS rebound [13], which is a pattern that concurs with that expected for a sleep inducing factor [4]. CC is an endogenous cysteine-protease reversible inhibitor found in several body fluids, including the CSF [5,14]. CC selectively and reversibly inhibits cathepsins B, H, L, and S. These are lysosomal enzymes whose biological function is not thoroughly understood. However, they have been implicated in antigen processing [19], glioma invasiveness [15], and ischemic neuronal death [30], among others. These findings suggest that the excessive expression of the proteases may lead to a dysfunction or structural damage of the organ.

The aim of this study was to determine the effect of the exogenous administration of CC as well as its blockade by antibodies on the sleep-waking cycle. Moreover, we sought to describe CC and CH variations in correlation with the sleep-wake cycle.

Male Wistar rats (250–300 g) were maintained under a controlled dark–light cycle (12:12, lights on at 08:00 a.m.) with food and water *ad libitum*.

Ninety-six rats maintained under the above mentioned controlled conditions were used in this experiment. CSF was extracted by puncturing the *cisterna magna* of anesthetized (pentobarbital) rats at different hours of the day: 9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 01:00, and 05:00. Sixteen rats per point were used. Rats were killed and the choroid plexus was isolated.

Sixteen rats were REMS-deprived using the inverted flower pot technique for 48 h. Deprivation began at 09:00 h and finished at 09:00. Eight of them were allowed to sleep for 2 h in control conditions. We also used a control group ( $n=8$ ). The CSF was extracted at the end of these periods.

The inverted flower pot was a small acrylic platform (diameter: 6 cm; height: 6 cm) surrounded by water 1 cm deep. Rats were provided with food and water at all times during the sleep deprivation period. Due to the shallow level of the water they could walk across the cage as they pleased. When the animals entered into REMS, which is characterized by loss of postural tone, they fell from the platform and woke up [8].

All rats were anesthetized with pentobarbital, and CSF was extracted from the *cisterna magna* (as mentioned above). CSF was centrifuged at  $4000 \times g$ , 20 min, at  $4^\circ\text{C}$ . Pellets were discarded and supernatants were maintained at  $-20^\circ\text{C}$  until further use.

Rats were anesthetized with pentobarbital, and decapitated. The brains were extracted and choroid plexuses were dissected. The choroid plexuses of three rats were pooled homogenized in tris-sucrose buffer with proteases inhibitors centrifuged at  $600 \times g$ , 10 min,  $4^\circ\text{C}$ . Supernatant was centrifuged at  $39,000 \times g$ , 15 min,  $4^\circ\text{C}$ . Total proteins were quantified by Lowry's method.

To assess CC or CH protein expression, homogenized choroid plexuses or CSF were run in 17% analytical SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) as described elsewhere [16]. Briefly, tissue homogenates (50  $\mu\text{g}$  of protein) were mixed 1:1 with sample Laemmli buffer and heated ( $95^\circ\text{C}$ ,

5 min) prior to loading on a 0.75 mm thick gel. Samples were subjected to electrophoresis (150 V, 2 H) and gels were transferred onto nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, U. K.) at 100 V for 1 h at  $4^\circ\text{C}$ . The membrane was incubated with 3% PBS-tween, 10% non-fat dry milk, and 2% goat normal serum for 30 min at room temperature (rt), followed by incubation with anti-CC (Upstate Biotechnology) or anti-CH (Santa Cruz Biotechnology) 1:2000 overnight at  $4^\circ\text{C}$ . The blot was washed with PBS-tween (3 times, 5 min/each), then incubated 1 h at rt in a 1:2000 dilution of goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase conjugate, and developed with diaminebenzidine (0.5 mg/ml in PBS plus 0.3  $\mu\text{l/ml}$  30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Density of bands was analyzed using Quantity One software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California).

Fourteen male Wistar rats (250–350 g) were used for the sleep recordings. They were implanted under anesthesia with a set of electrodes that included three stainless steel screw electrodes, one implanted on the frontal bone which was used to ground the animal, and the other two on the hippocampus ( $P=4.0$ ,  $L=2.5$ ,  $V=2.5$ ) to record electroencephalographic activity. Two additional wire electrodes were placed on the neck muscles to record electromyographic activity. One stainless steel cannula was also implanted aimed at the right lateral ventricle ( $P=0.8$ ,  $L=1.5$ ,  $V=3.8$ ) and was used to administer the drugs.

One week after the surgery, control rats were acclimatized to the recording conditions for 24 h. In the first day of the experiment, they received an ICV administration of saline (4  $\mu\text{l}$ ) at 10:00 am with the aid of a Hamilton microsyringe controlled by an infusion pump at 1  $\mu\text{l/min}$  and then connected to the recording system. All rats were recorded for 12 h using amplifiers (Neurotop MM 3116 K de NIHON KOHDEN) and software was used to collect and analyze the data (ICELUS program. University of Michigan Programming by g system. Dr. Mark Opp).

The next day rats were ICV injected with either: Human CC (ABCAM; 0.7 pmol/4  $\mu\text{l}$ ;  $n=6$ ) or Anti-CC (Upstate Biotechnology; 105 ng/4  $\mu\text{l}$ ;  $n=8$ ) at 10:00 am, and recorded for 12 h. The sleep-waking cycle was evaluated by computing the total time spent in waking, non-REMS (nREMS) and REMS. Latency to the onset of the first nREMS and REMS was also evaluated, as well as mean duration and frequency of these periods.

Results are reported as mean values  $\pm$  SEM. Significant differences were obtained by using a one-way ANOVA test and a Tuckey HSD, as *post hoc* test, considering  $p < 0.05$  statistically significant.

We analyzed the diurnal variation of CC in the CSF. Cystatin C polyclonal antibody recognized one band of approximately 13.5 kDa, as well as another band with higher molecular weight, which we identified as pro-CC, the precursor peptide (Fig. 1). It has been reported that pro-CC is 20 amino acids longer than CC [1] and the anti-CC employed recognizes both CC and its precursor peptide, as stated by the supplier (Upstate biotechnology). Densitometry was obtained for these bands and a statistical analysis was made. We found a statistical difference between 09:00 with respect to all the other hours analyzed for CC as well as for pro-CC (Fig. 1). We also analyzed CH in choroid plexus and we did not find variation across the day (data not shown).

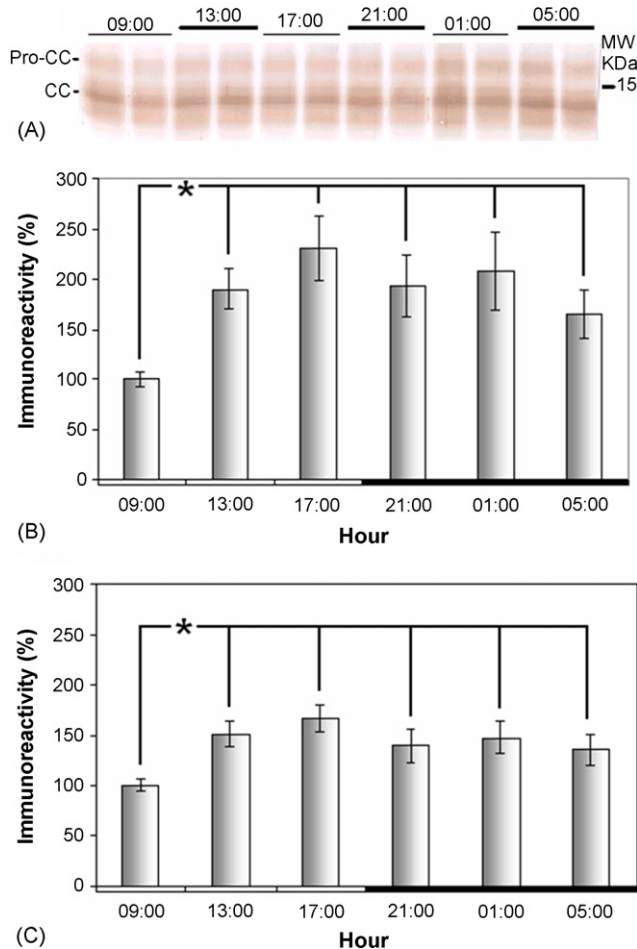


Fig. 1. Effect of light/dark cycle on CC expression. (A) Western immunoblotting of CC and pro-CC in CSF of control rats at different hours of the day. Bars represent mean  $\pm$  S.E.M. of densitometry obtained for the pro-C (B) and CC (C) bands. \* $p < 0.05$  09:00 vs. all other hours.  $N = 16$ .

In addition, we extracted cerebrospinal fluid from the REMSd rats and analyzed CC and the precursor peptide immunoreactivity (Fig. 2). An increase of CC in the REMSd group as well as in rebound group was detected. Pro-CC was only different in the rebound group. CC and CH determination in the choroid plexuses of these rats did not show differences for either (data not shown); while CH was higher in the REMSd group and had a tendency to decrease in the rebound group (Fig. 2).

ICV injection of CC caused a decrease in wakefulness and an increase in REM sleep compared to saline injection. Non-REM sleep was not affected. ICV injection of anti-CC did not produce any change in wake, non-REM or REMS compared to saline (Fig. 3). The lack of an effect of anti-CC might be because at the doses employed not all endogenous CC was bound to the antibody and the unbound portion could have inhibited the proteases. We did not find an effect of CC or anti-CC on total time nREMS (Fig. 3). The effects of CC in wakefulness as in REMS could be explained by variations in frequency of these sleep phases (Table 1) as well as by a shorter latency in CC group.

At the present time, many molecules are known as sleep-inducing factors. Most of these molecules were originally

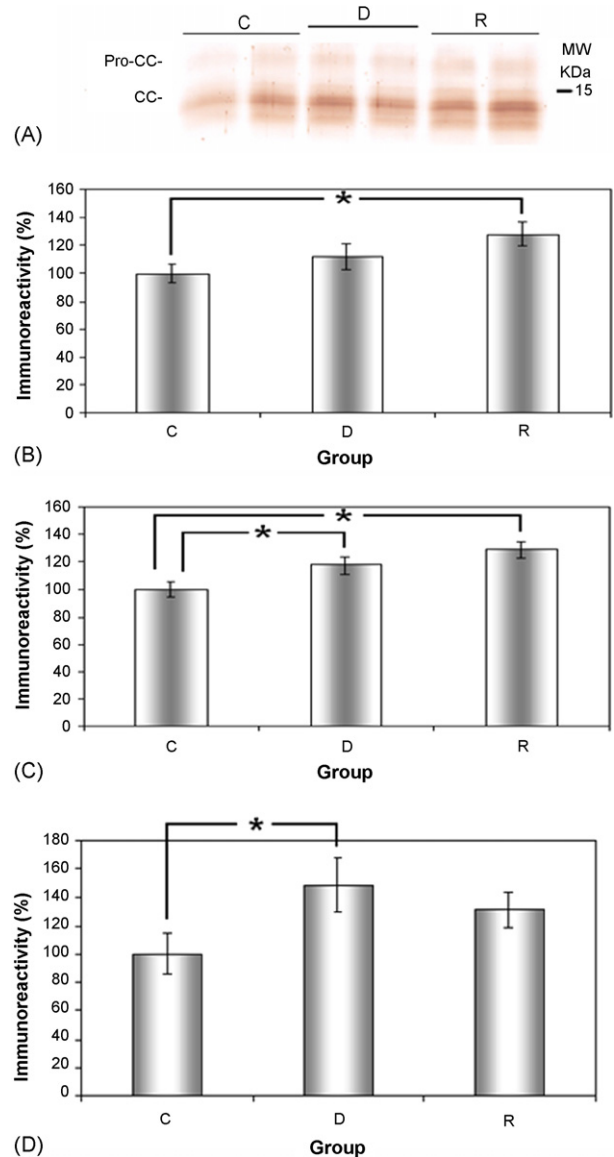


Fig. 2. Effect of sleep deprivation and sleep rebound on CC and CH expression. (A) Western immunoblotting of CC and pro-CC in CSF of control, C; 48 h of REMS deprivation, D; and 48 h of REMS deprivation plus 2 h of sleep rebound, R. Bars represent mean  $\pm$  S.E.M. of densitometry obtained for the pro-CC (B) and CC (C) bands. (D) mean  $\pm$  S.E.M. of densitometry obtained for CH band in choroid plexus. \* $p < 0.05$ .

described to accomplish other functions and their role in sleep seems to be an additional function [23]. Since many of these substances are peptides in nature, the fundamental role of genomic products in sleep regulation becomes evident.

“*Di novo* proteins synthesis” is quite important for sleep expression. This is supported by early studies using protein synthesis inhibitors [25] and protease inhibitors [27]. It is further supported by studies evaluating brain protein synthesis [24] or the more recent and modern approaches in which the search for genes involved in sleep regulation has been the main goal. In our present study we observe that endogenous molecules that regulate protein degradation are playing a role in sleep regulation. Our results also indicate that the level of this molecule, in the CSF, is minimal at 9:00 am, when lights are turned on and

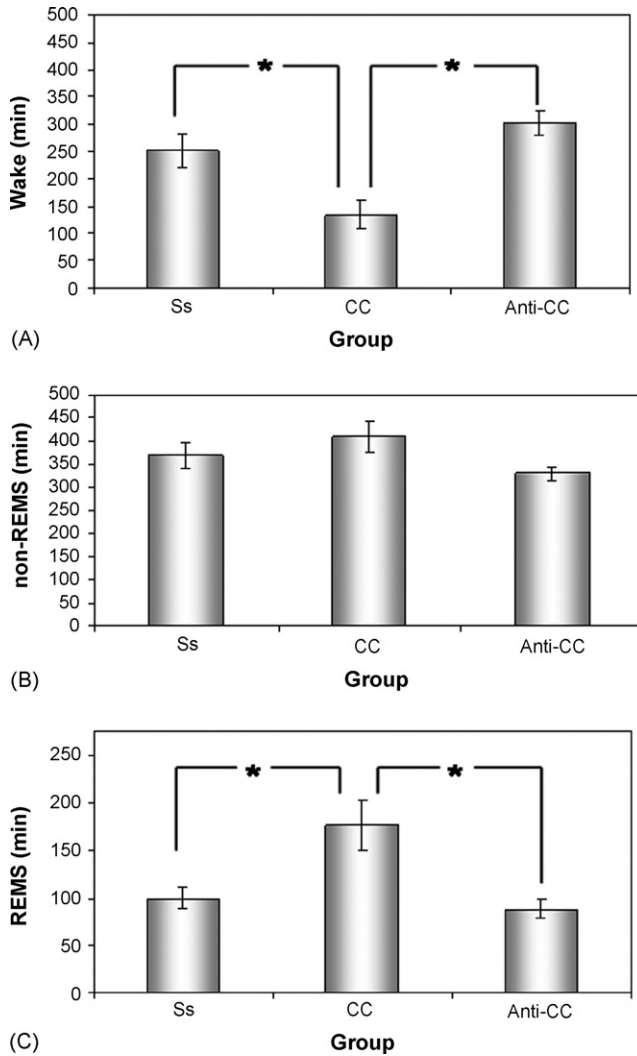


Fig. 3. Effects of ICV administration of CC and anti-CC on sleep. Bars represent mean  $\pm$  S.E.M. of total time minutes in sleep-wake states: wakefulness (A); non-REM sleep (B); and REM sleep (C). \*  $p < 0.05$ ; Saline solution (SS)  $n = 14$ , Cystatin C (CC)  $n = 6$  and anti-CC  $n = 8$ .

increases as the light phase progresses remaining constant along of the day. This variation is not expected in a sleep-inducing factor, but suggests that CC may be participating in the maintenance of sleep. This conclusion is supported by the increase of CC during the sleep rebound of sleep deprived rats. Therefore, we believe that CC may be inhibiting molecules such as CH during the sleep rebound that increased their concentration during REMSd.

We can only speculate how and where the interaction between CH and CC occurs. CC is widely distributed in biological fluids, such as CSF. CC in CSF mainly originates in the choroid plexus, but also is expressed in microglial cells, astrocytes and neurons [17,20]. CH is a lysosomal enzyme [14], and its level in the CSF of healthy subjects is very low [18]. Furthermore, the existence of transporters capable of the uptake of CC in the eye has been described [29]. Therefore, neural structures related to REMS could be using a similar mechanism to uptake CC and explain intracellular actions of CC.

Certain pathologies in which CC levels are altered in the CSF have been documented. For example, CC in CSF diminishes in multiple sclerosis, or leptomeningeal metastasis patients [18]. In these pathologies there is also an increase of CH/CC CSF index, mainly in leptomeningeal metastasis. We did not find any report of sleep alteration for this pathology, yet it has been reported that patients with multiple sclerosis presents initial or mild insomnia [28] which agrees with increased protein degradation. However, in the CSF of Creutzfeldt-Jakob disease patients, there is an increase of CC levels [26] but also of cathepsin S [2]. Sleep alterations in the sleep architecture of these patients have been described, mainly through disorganized polysomnograms [21].

Nevertheless these pathologies produce many more alterations than CC or cathepsin levels, so many further studies are needed to propose Cathepsin/CC index as a sleep modulator parameter.

The involvement of proteins in sleep modulation implicates genomic control. Therefore, the search for new proteins is crucial to understand genomic control of sleep. To our knowledge this is the first report that correlates an endogenous protease inhibitor with sleep regulation and concurs with previous reports showing that protein synthesis inhibitors decrease

Table 1  
Effects of ICV administration of CC and anti-CC on sleep parameters

		Wakefulness			nREMS			REMS		
		SS	CC	Anti-CC	SS	CC	Anti-CC	SS	CC	Anti-CC
Number of bouts/12 h	Mean	66.6	44.5 <sup>a</sup>	73.0	107.0	102.0	110.1	52.2	80.3 <sup>a</sup>	56.5
	S.E.M.	6.3	4.0	7.3	7.6	8.5	9.6	4.5	2.6	5.0
Mean duration (min)	Mean	3.24	2.36 <sup>a</sup>	3.77	3.33	3.80	3.03	1.93	2.08	1.54
	S.E.M.	0.27	0.39	0.31	0.37	0.25	0.39	0.18	0.30	0.18
Latency (min)	Mean				24.5	11.8	20.1	40.6	0.1	37.8
	S.E.M.				6.1	5.0	4.3	12.4	0.1 <sup>b</sup>	8.6

Data represent mean  $\pm$  S.E.M. of frequency (number of phases in 12 h), duration mean event (minutes) and latency (time elapsed from the beginning of recording to the first phase onset, in min).

<sup>a</sup>  $p < 0.05$  CC vs. SS.

<sup>b</sup>  $p < 0.05$  CC vs. SS (Kruskall Wallis and Mann-Whitney  $U$  test). Saline solution, SS  $n = 14$ , CC  $n = 6$  and anti-CC  $n = 8$ .

REMS [10,25], whereas exogen protease inhibitors increase it [27].

This finding opens a new door to investigate the role of proteins, hence the genome, in the sleep–wake cycle modulation.

### Acknowledgements

Partially supported by CONACYT 25128N and PAPIIT 215203. The authors thank Alicia Ochoa Sanchez for her technical assistance and Beth Wheeler for her English revision

### References

- [1] M. Abrahamson, A. Grubb, I. Olafsson, A. Lundwall, Molecular cloning sequence analysis of cDNA coding for the human cysteine proteinase inhibitor cystatin C, *FEBS* 216 (1987) 229–233.
- [2] C.A. Baker, D. Martin, L. Manuelidis, Microglia from Creutzfeldt-Jakob disease-infected brains are infectious and show specific mRNA activation profiles, *J. Virol.* 76 (2002) 10905–10913.
- [3] R. Basheer, R. Brown, V. Ramesh, S. Begun, R.W. McCarley, Sleep deprivation-induced protein changes in basal forebrain: implications for synaptic plasticity, *J. Neurosci. Res.* 82 (2005) 650–658.
- [4] A.A. Boberly, I. Tobler, Endogenous sleep-promoting substances and sleep regulation, *Physiol. Rev.* 69 (1989) 605–670.
- [5] H.A. Chapman, R.J. Riese, G.P. Shi, Emerging roles for cysteine proteases in human biology, *Annu. Rev. Physiol.* 59 (1997) 63–88.
- [6] C. Cirelli, Functional genomics of sleep and circadian rhythm. Invited review: how sleep deprivation affects gene expression in the brain: a review of recent findings, *J. Appl. Physiol.* 92 (2002) 394–400.
- [7] C. Cirelli, C.M. Gutierrez, G. Tononi, Extensive and divergent effects of sleep and wakefulness on brain gene expression, *Neuron* 41 (2004) 35–43.
- [8] H.B. Cohen, W.C. Dement, Sleep: changes in threshold to electroconvulsive shock in rats after deprivation of ‘paradoxical’ phase, *Science* 150 (1965) 1318–1319.
- [9] R. Drucker-Colín, C.W. Spanis, C.W. Cotman, J.L. McGaugh, Changes in protein levels in perfusates of freely moving cats: relation to behavioral state, *Science* 187 (1975) 963–965.
- [10] R. Drucker-Colin, J. Zamora, J. Bernal-Pedraza, B. Sosa, Modification of REM sleep and associated phasic activities by protein synthesis inhibitors, *Exp. Neurol.* 63 (1979) 458–467.
- [11] R. Drucker-Colín, M. Tuena de Gómez-Puyou, M.C. Gutierrez, G. Dreyfus-Cortés, Immunological approach to the study of neurohumoral sleep factors: effect on REM sleep of antibodies to brain stem proteins, *Exp. Neurol.* 69 (1980) 563–575.
- [12] F. García-García, R. Drucker-Colín, Endogenous and exogenous factors on sleep–wake cycle regulation, *Prog. Neurobiol.* 58 (1999) 297–314.
- [13] R. González-Rivera, M. Martínez-Vargas, E. Murillo-Rodríguez, A. Landa, O. Prospero-García, L. Navarro, Identification of a 12 KDa Protein Extracted from Cerebrospinal Fluid (CSF) of Rats Deprived of Rapid Eye Movement Sleep (REMS) Neuroscience, 33th Annual Meeting, November 2003, N. Orleans.
- [14] Z. Grzonka, E. Jankowska, F. Kasprzykowski, R. Kasprzykowska, L. Lankiewicz, W. Wiczak, E. Wiczczak, J. Ciarkowski, P. Drabik, R. Janowski, M. Kozak, M. Jaskólski, A. Grubb, Structural studies of cystein proteases and their inhibitors, *Acta Biochim. Pol.* 48 (2001) 1–20.
- [15] S.D. Konduri, N. Yanamandra, K. Siddique, A. Joseph, D.H. Dinh, W.C. Olivero, M. Gujrati, G. Kouraklis, A. Swaroop, A.P. Kyritsis, J.S. Rao, Modulation of cystatin C expression impairs the invasive and tumorigenic potential of human glioblastoma cells, *Oncogene* 21 (2002) 8705–8712.
- [16] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [17] T. Miyake, Y. Gahara, M. Nakayama, H. Yamada, K.I. Uwabe, T. Kitamura, Up-regulation of cystatin C by microglia in the rat facial nucleus following axotomy, *Mol. Brain Res.* 37 (1996) 273–282.
- [18] A. Nagai, M. Terashima, T. Harada, K. Shimode, H. Takeuchi, Y. Murakawa, M. Nagasaki, A. Nakano, S. Kobayashi, Cathepsin B and H activities and cystatin C concentrations in cerebrospinal fluid from patients with leptomeningeal metastasis, *Clin. Chim. Acta* 329 (2003) 53–60.
- [19] T.Y. Nakagawa, A.Y. Rudensky, The role of lysosomal proteinases in MHC class II-mediated antigen processing and presentation, *Immunol. Rev.* 172 (1999) 121–129.
- [20] D.E. Palm, N.W. Knuckey, M.J. Primiano, A.G. Spangenberg, C.E. Johanson, C. Cystatin, a protease inhibitor, in degenerating rat hippocampal neurons following transient forebrain ischemia, *Brain Res.* 691 (1995) 1–8.
- [21] D. Petit, J.F. Gagnon, M.L. Fantini, L. Ferini-Strambi, J. Montplaisir, Sleep and quantitative EEG in neurodegenerative disorders, *J. Psychosom. Res.* 56 (2004) 487–496.
- [22] H. Pieron, *Le probleme physiologique du sommeil*, Masson, Paris, 1913.
- [23] O. Prospero-García, M. Méndez-Díaz, The role of neuropeptides in sleep modulation, *Drug News Perspect.* 17 (2004) 512–522.
- [24] P. Ramm, C.T. Smith, Rates of cerebral protein synthesis are linked to slow wave sleep in the rat, *Physiol. Behav.* 48 (1990) 749–753.
- [25] J.A. Rojas-Ramirez, E. Aguilar-Jimenez, A. Posadas-Andrews, J. Bernal-Pedraza, R. Drucker-Colin, The effect of various protein synthesis inhibitors on the sleep–wake cycle of the rats, *Psychopharmacology (Berl.)* 53 (1977) 147–150.
- [26] J.C. Sanchez, E. Guillaume, P. Lescuyer, L. Allard, O. Carrette, A. Scherl, J. Burgess, G.L. Corthals, P.R. Burkhard, D.F. Hochstrasser, Cystatin C as a potential cerebrospinal fluid marker for the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease, *Proteomics* 4 (2004) 2229–2233.
- [27] J.P. Sastre, M. Sallanon, C. Buda, M. Jouvet, La bacitracine, un inhibiteur des peptidases, augmente le sommeil paradoxal chez le chat, *C. R. Acad. Sci. Paris* 296 (1983) 965–968.
- [28] B.R. Stanton, F. Barnes, E. Silver, Sleep and fatigue in multiple sclerosis, *Mult Scler* 124 (2006) 481–486.
- [29] J. Wasselius, K. Johanson, K. Hakansson, M. Abrahamson, B. Ehinger, Cystatin C uptake in the eye, *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 243 (2006) 583–592.
- [30] T. Yamashima, Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates, *Prog. Neurobiol.* 62 (2000) 273–295.

Turk B, Turk D, Turk V. (2000). Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1477: 98-111.

Turk V, Turk B, Turk D. (2001). Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *The EMBO J*. 20 (17): 4629-4633.

van Luijtelaar EL, Coenen AM. (1985). Electrophysiological evaluation of three paradoxical sleep deprivation techniques in rats. *Physiological & Behavior*. 36: 603-609.

Velázquez-Moctezuma J, Shalauta MD, Gillin JC, Shiromani PJ. (1990). Microinjections of nicotine in the medial pontine reticular formation elicits REM sleep. *Neurosci Lett*. 115: 265-268.

Waghray A, Keppler D, Sloane B, Schuger L, Chen Y. (2002). Analysis of a truncated form of cathepsin H in human prostate tumor cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 277 (13): 11533-11538.

Waguri S, Watanabe T, Kominami E, Uchiyama Y. (1990). Variation in immunoreactivity of angiotensinogen and cathepsin B and H in rat hepatocytes over 24 hours. *The American Journal of Anatomy*. 187: 175-182.

Wakasugi K, Nakano T, Morishima I. (2004). Association of human Neuroglobin with cystatin C, a cysteine proteinase inhibitor. *Biochemistry* .43 (18): 5119-5125.

Wassélius J, Johansson K, Häkansson K, Abrahamson M, Ehinger B. (2004). Cystatin C uptake in the eye. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology incorporating German Journal of ophthalmology*. Jun 243 (6): 583-592.

Wei L, Berman Y, Castaño EM, Cadene M, Beavis RC, Devi L, Levy E. (1998). Instability of the amyloidogenic Cystatin C variant of hereditary cerebral

hemorrhage with amyloidosis, icelandic type. *J. Of Biological Chemistry*. 173 (19): 11806-11814.

Winson J. (2003). The meaning of dreams. *Scientific American-American Edition*. 28 (SPI 2): 54-61.

Yoshimoto M, Higuchi H, Kamata M, Yoshida K, Shimizu T, Hishikawa Y. (1999). The effects of benzodiazepine (triazolam), cyclopyrrolone (zopiclone) and imidazopyridine (zolpidem) hypnotics on the frequency of hippocampal theta activity and sleep structure in rats. *European Neuropsychopharmacology* 9: 29-35.