

BRUNA VISNIAUSKAS

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DAS ATIVIDADES DE
METALOPEPTIDASES NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL EM MODELOS DE
PRIVAÇÃO DE SONO**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina, para obtenção do título de Mestre
em Ciências

São Paulo

2010

Visniauskas, Bruna

Avaliação das alterações das atividades de metalopeptidases no sistema nervoso central em modelos de privação de sono. / Bruna Visniauskas. -- São Paulo, 2010.

xii, 145f.

Tese (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina.
Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia.

Título em inglês: Paradoxical Sleep Deprivation and Metallopeptidases Activities Changes in Rat Central Nervous System.

1. Enzima conversora de angiotensina-I. 2. Thimet oligopeptidase. 3. Privação de sono paradoxal. 4. Peptídeos opióides. 5. Hormônio liberador de gonadotrofinas.

BRUNA VISNIAUSKAS

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DAS ATIVIDADES DE
METALLOPEPTIDASES NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL EM MODELOS DE
PRIVAÇÃO DE SONO**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina, para obtenção do título de Mestre
em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Jair Ribeiro Chagas

São Paulo

2010

BRUNA VISNIAUSKAS

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DAS ATIVIDADES DE
METALLOPEPTIDASES NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL EM MODELOS DE
PRIVAÇÃO DE SONO**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Emer Suavinho Ferro

Prof. Dr. Cláudio Antônio Barbosa de Toledo

Prof. Dr. Luiz Juliano Neto

Prof. Dr. Monica Levy Andersen (Suplente)

Aprovada: 28/06/2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

Chefe do Departamento de Psicobiologia

Profa. Dra. Maria Lucia Oliveira de Souza Formigoni

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia

Prof. Dr. Marco Túlio de Mello

Esta tese foi realizada no Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, com o apoio financeiro da Associação Fundo de Incentivo à Psicofarmacologia (AFIP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Dedicatória

Aos meus pais, por quem tenho grande admiração, que sempre me apoiaram e acreditaram em mim.

Agradecimentos

Ao prof. Jair Ribeiro Chagas pela orientação, os conhecimentos que fazem crescer de forma intelectual e humana e sem dúvida pela amizade.

Ao prof. Sergio Tufik por incentivar um estudo com proteases e sono e sempre com grande entusiasmo ensinar aos estudantes como fazer ciência no Brasil.

A Prof.^a Monica Levy Andersen por me ensinar a planejar experimentos com privação de sono e ensinar grande zelo o respeito aos animais.

Ao prof. Vitor Oliveira por disponibilizar algumas ferramentas necessárias para esse trabalho e pelo auxílio nas discussões desse trabalho.

A Prof.^a Adriana K. Carmona pelas discussões e valiosas sugestões no decorrer do projeto e preparação do manuscrito.

A Prof.^a Vânia D´Almeida pelo uso dos equipamentos em seu laboratório e pelo auxílio no planejamento dos experimentos iniciais.

Os estudantes do laboratório Renan, Guilherme, Aline, Isis, Sergio por me auxiliarem e terem muita paciência.

Aos colegas do laboratório LEIM, Letícia, Karina, Bruno, Lisandro e Francine que me deram muito força nos experimentos e pela amizade.

Aos amigos e funcionários do departamento de Psicobiologia, Laura, Bruna, Flávia, Dani, Juliana Perry, Kil, Andrea, Andréia, Marilde e Dunga.

A grande amiga Karina Soares Cunha pelo incentivo e amizade.

Aos colegas do departamento de Biofísica por sempre estarem de prontidão quando eu precisei, Prof. Nilana, Fernanda, Mauricio, Marcelo, Larissa, Gabu.

Ao prof. David Deperthes pela oportunidade de realizar um estágio em seu laboratório. Ao Fábio Dupart Nascimento pelo grande suporte e apóio durante o estágio realizado.

As agências CNPq e FAPESP pela bolsa e auxilio financeiro aos projetos do laboratório.

SUMÁRIO

Dedicatória	vi
Agradecimentos	vii
Listas.....	xi
Resumo.....	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Sono	1
1.2 Neuropeptídeos e sono.....	5
1.3 Enzimas proteolíticas e neuropeptídeos	7
1.3.1 Enzima conversora de angiotensina-I (ECA, EC.3.4.15.1)	10
1.3.1.1 Funções fisiológicas	11
1.3.1.2 Sistema renina-angiotensina-aldosterona.....	11
1.3.1.3 ECA e sistemas calicreína-cininas.....	14
1.3.1.4 Substratos da ECA <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	15
1.3.2 Thimet oligopeptidase (EP24.15, TOP, EC3.4.24.15)	16
1.3.2.1 Funções fisiológicas	17
1.3.2.2 Substratos da EP24.15 <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	18
1.4 Privação de sono.....	20
1.4.1 Modelos de privação de sono	21
1.4.2 Métodos de privação de sono	22
2. OBJETIVOS.....	25

3. MATERIAIS E METODOS	26
3.1 Síntese se peptídeos em fase sólida	26
3.2 Privação de sono paradoxal	28
3.3 Extração de RNAm e proteínas	29
3.4 Determinação de atividade enzimática	30
3.5 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)	31
3.6 Western blot	33
3.7 Análises estatísticas	34
4. RESULTADOS	35
4.1 Preparação e teste de substrato para as enzimas proteolíticas	35
4.2 Hidrólise dos substratos por extratos de tecidos do SNC.....	36
4.3 Atividades e expressão gênica da ECA nos tecidos do SNC.....	40
4.4 Atividades e expressão gênica da EP24.15 nos tecidos do SNC.....	45
5. DISCUSSÃO.....	53
6. CONCLUSÕES	62
7. REFERÊNCIAS	63
8. ANEXOS	77

Lista de ilustrações

Figura 1.	Representação esquemática do sistema renina-angiotensina-aldosterona e seus efeitos fisiológicos nos diferentes.....	12
Figura 2.	Perfil de HPLC do substrato fluorogênico Abz-FRK(Dnp)P-OH.....	35
Figura 3.	Perfil de HPLC do substrato fluorogênico Abz-GFDPFRQ-EDDnp	36
Figura 4.	Leitura no fluorímetro após a incubação do substrato Abz-FRK(Dnp)P-OH com extrato total do hipotálamo de rato controle	37
Figura 5.	Produtos de hidrólise do substrato Abz-FRK(Dnp)P-OH após incubação com extrato de hipotálamo	37
Figura 6.	Leitura no fluorímetro após a incubação do substrato Abz - GFDPFRQ-EDDnp com extrato total do hipotálamo de rato controle.....	38
Figura 7.	Atividade específica da ECA no extrato total do diferentes regiões do SNC	39
Figura 8.	Atividade específica da EP24.15 no extrato total do diferentes regiões do SNC	39
Figura 9.	Representação <i>Box plot</i> dos níveis de RNAm e atividade da ECA no extrato total do hipotálamo	40
Figura 10.	Representação <i>Box plot</i> dos níveis de RNAm e atividade da ECA no extrato total do córtex	41

Figura 11.	Representação <i>Box plot</i> dos níveis de RNAm e atividade da ECA no extrato total do hipocampo	42
Figura 12.	Representação <i>Box plot</i> dos níveis de RNAm e atividade da ECA no extrato total do tronco encefálico	43
Figura 13.	Representação <i>Box plot</i> dos níveis de RNAm e atividade da ECA no extrato total do estriado	44
Figura 14.	Representação <i>Box plot</i> dos níveis de RNAm, expressão e atividade da EP24.15 extrato total do hipotálamo	45
Figura 15.	Representação <i>Box plot</i> dos níveis de RNAm, expressão e atividade da EP24.15 no extrato total do córtex	47
Figura 16.	Representação <i>Box plot</i> dos níveis de RNAm, expressão e atividade da EP24.15 no extrato total do hipocampo	48
Figura 17.	Representação <i>Box plot</i> dos níveis de RNAm, expressão e atividade da EP24.15 no tronco encefálico.	50
Figura 18.	Representação <i>Box plot</i> dos níveis de RNAm, expressão e atividade da EP24.15 no extrato total do estriado	51
Figura 19.	Comparação dos níveis sérico de progesterona com os dados atividade da EP24.15 no extrato de total do hipotálamo	57

Lista de Tabelas

Tabela 1. Protocolo utilizado para síntese de peptídeos em fase sólida utilizando microondas.....	27
Tabela 2. Substratos e inibidores validados para determinação das atividades de ECA e EP24.15 em tecidos do SNC de ratos	31
Tabela 3. Seqüências de primers da ECA, EP24.15 e Beta-actina e seus respectivos códigos de acesso no Genbank.....	32

Lista de abreviaturas e símbolos

Abz: ácido orto-aminobenzóico

ACTH: hormônio liberador de corticotrofina

Ang I: Angiotensina I

Ang II: Angiotensina II

Ang IV: Angiotensina IV

Ang 1-7: Angiotensina 1-7

cDNA: Ácido desoxirribonucléico complementar

CRF: fator de liberação da corticotrofina ou CRH

DIPEA: N,N'- diisopropiletilamina

DMF: N,N'- dimetilformamida

ECA: enzima conversora de angiotensina-I (EC 3.4.15.1)

EDDnp: etilenodiamino 2,4-dinitrofenil

EEG: eletroencefalograma

EP24.15: endopeptidase 24.15 ou thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15)

Fmoc: 9-fluorenilmetiloxicarbonil

FSH: hormônio folículo estimulante

GAPDH: Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GnRH: hormônio liberador de gonadotrofinas ou LHRH

GH: hormônio de crescimento

HOBt: 1-hidroxibenzotriazol

HPLC: cromatografia líquida de alta pressão

ICV: intra-cérebro-ventricular

JA-2: N-[1-(R, S)-carboxi-3-fenilpropil]-Ala-Aib-Tyr-p-aminobenzoato

LC: locus ceruleus

LDT: tegmento látero-dorsal

MHC-1: moléculas de histocompatibilidade de classe I

MPMM: método da plataforma múltipla modificada

MSH: hormônio estimulante de melanócitos

NREM: movimento não rápido dos olhos (*non rapid eye movement*)

NTS: núcleo do trato solitário

PGO: ondas ponto-genículo-occipitais

PKA: proteína quinase A

PKC: proteína quinase C

PPT: tegmento pedúnculo-pontino

PSP: privação de sono paradoxal

PSP96: privação de sono paradoxal por 96h

REM: movimento rápido dos olhos (*rapid eye movement*)

RNA_m: Ácido ribonucléico mensageiro

RT-PCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real

RT24: rebote de privação de sono por 24h

RT48: rebote de privação de sono por 48h

RT96: rebote de privação de sono por 96h

RT-PCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real

SAOS: síndrome da apnéia obstrutiva do sono

SDS: sulfato dodecil de sódio

SNC: sistema nervoso central

SRAA: sistema renina-angiotensina-aldosterona

TBTU: tetrafluroborato de 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3 - tetrametilurônio

TFA: ácido trifluoracético

TSH: hormônio estimulante da tireóide

VLPO: núcleo pré-óptico ventro-lateral

RESUMO

Visniauskas, B. **Avaliação das alterações de metalopeptidases no sistema nervoso central em modelos de privação de sono.** 2010 Tese (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina.

Os neuropeptídeos desempenham um papel fundamental no controle do ciclo vigília-sono e as suas ações podem ser reguladas pela atividade das enzimas proteolíticas. Enzimas proteolíticas são essenciais para metabolização de neuropeptídeos, seja pela liberação a partir de precursores protéicos inativos ou ativos, ou pela inativação de neuropeptídeos ativos. Utilizando substratos com supressão interna de fluorescência, *Western blot*, inibidores específicos e PCR em tempo real, avaliamos as alterações na expressão e atividade da enzima conversora de angiotensina-I (ECA - EC 3.4.15.1) e thimet oligopeptidase (EP24.15 - EC 3.4.24.15) no sistema nervoso central de ratos em modelos de privação de sono paradoxal. Ratos machos foram distribuídos em cinco grupos: controle, privação de sono paradoxal por 96h (PSP96) e recuperação do sono (rebote após privação 24, 48 e 96 horas após PSP96). Encontrou-se variações nas atividades, na expressão e nos níveis de RNAm da ECA e EP24.15 em extratos do hipotálamo, hipocampo, tronco encefálico, córtex e estriado. Mudanças significativas nos parâmetros avaliados (atividade, níveis de RNAm e expressão protéica) foram observadas nos grupos PSP96 e nos rebotes. As alterações de atividade da ECA e EP24.15 podem implicar em mudanças no metabolismo das angiotensinas, bradicinina, peptídeos opióides (dinorfinas e encefalinas), substância P e GnRH e relacionar-se a algumas das mudanças fisiológicas (estresse, memória e cognição, nocicepção e alterações endócrinas) observadas durante e após a privação do sono.

Palavras-chaves: Enzima conversora de angiotensina-I, Thimet oligopeptidase, privação de sono paradoxal, memória, peptídeos opióides, GnRH, sistema nervoso central.

ABSTRACT

Visniauskas, B. **Sleep Deprivation and Metallopeptidases Activities Changes in Rat Central Nervous System.** 2010 Dissertation (Masther's in sciences) – Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina.

Neuropeptides have a fundamental role on sleep-wake cycle control and their actions are regulated by proteolytic processing. Proteolytic enzymes are essential for the metabolism of neuropeptides, either by release from active or inactive precursor protein, or the inactivation of active neuropeptides. Using fluorescence resonance energy transfer substrates, Western blot, specific inhibitors and real time PCR, we have demonstrated changes in the expression and activity of angiotensin I-converting enzyme (ACE - EC 3.4.15.1) and thimet oligopeptidase (EP24.15 – EC 3.4.24.15) in the central nervous system of rats submitted to paradoxical sleep deprivation. Male rats were distributed in 5 groups: control, paradoxical sleep deprivation during 96h (PSD96), and sleep recovery (recovery after sleep deprivation 24, 48 and 96h after PSD96). Alterations in the activities, expression and mRNA levels of ACE and EP24.15 were found in extracts of the hypothalamus, hippocampus, brainstem, cortex and striatum. Significant changes in these parameters (activity, mRNA levels, protein expression) were observed in groups PSD96 and recovery. Modifications on ACE and EP24.15 activities can result in alterations in the metabolism of angiotensins, bradykinin, opioid peptides (dynorphins and enkephalins), substance P and GnRH and be related to some of the physiological changes (stress, memory and cognition, nociception and endocrine changes) observed during and after sleep deprivation.

Keywords: Angiotensin-I converting enzyme, Thimet oligopeptidase, paradoxical sleep deprivation, memory, opioid peptides, GnRH, central nervous systems

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sono

O sono representa um estado comportamental reversível de desligamento da percepção do ambiente com modificação do nível de consciência e da responsividade a estímulos internos e externos. Trata-se de um processo ativo envolvendo múltiplos e complexos mecanismos fisiológicos e comportamentais em vários sistemas e regiões do sistema nervoso central (SNC) (KRYGER *et al.* 2005).

O estudo da fisiologia do sono tem-se destacado como área de grande interesse tanto pelo aspecto básico, fornecendo informações sobre o funcionamento, regulação e papel desse estado de consciência, quanto pelas importantes implicações para a saúde pública, advindas dos distúrbios de sono, como causa ou como conseqüência de outras patologias, por exemplo, as cardiovasculares. (SIEGEL 2004;HOFFMANN *et al.* 2004;TUFIK 2008).

O sono nos mamíferos apresenta duas fases distintas: o sono de ondas lentas ou NREM (*non-rapid eye movement*) e o sono paradoxal ou REM (*rapid eye movement*). Os termos NREM e REM são utilizados preferencialmente em humanos e sono de ondas lentas e sono paradoxal no sono de animais (TUFIK *et al.* 2009).

Em humanos, as fases NREM e REM se alternam durante a noite em ciclos de aproximadamente 90 minutos, sendo que na primeira metade da noite predomina o sono NREM e na segunda metade o sono REM. As três medidas necessárias para definir os estágios do sono são o eletroencefalograma (registro da atividade cerebral),

eletromiograma (registro do tônus muscular) e o eletrooculograma (registro de movimentos oculares).

O ciclo vigília-sono apresenta ritmo circadiano que está sob o controle do núcleo supraquiasmático localizado no hipotálamo (MOORE 2007). A alternância entre as diferentes fases e estágios do sono é o resultado da interação das estruturas neurais envolvidas no controle do sono REM (ou paradoxal), sono NREM (ou de ondas lentas) e a vigília. As mudanças de uma fase para outra e de estágio dependem do equilíbrio entre a excitação e a inibição dessas conexões (STAUNTON 2005;HIPOLIDE 2008;SIEGEL 2009).

A vigília é mantida principalmente pela ação do sistema ativador reticular ascendente (SARA) do tronco encefálico, do qual fazem parte os núcleos monoaminérgicos, colinérgicos e células glutamatérgicas que se localizam ao longo de toda a região. Estes neurônios projetam-se para o tálamo e excitam células que, por sua vez, projetam-se para diversas áreas do córtex cerebral, produzindo a ativação cortical que é uma característica da vigília. Os neurônios reticulares do tronco cerebral também se projetam para o hipotálamo, as células histaminérgicas da região posterior participam da ativação cortical, e para o prosencéfalo basal, que contém neurônios colinérgicos de projeção para o córtex (STAUNTON 2005;HIPOLIDE 2008;SIEGEL 2009).

O sono NREM ou ondas lentas apresenta quatro estágios. O estágio I é a transição entre a vigília e o sono, caracterizado pela lentificação do EEG. No estágio II surgem os fusos, que são rajadas de disparo neuronal com alta frequência, ondas de

alta voltagem e alta amplitude. Nos estágios III e IV, mais profundos (predomínio de ondas lentas), diminui a frequência de surgimento dos fusos. Nesta fase, a atividade neuronal é baixa, diminui o tônus muscular, a taxa metabólica e a temperatura corporal atingem seus menores níveis. Há um decréscimo na atividade simpática, com diminuição da frequência cardíaca e da pressão arterial. (HOFFMANN *et al.* 2004)

O sono REM ou paradoxal não possui estágios, mas apresenta eventos fásicos (repetitivos) e eventos tônicos (constantes durante todo o episódio de REM). Os eventos fásicos são os movimentos oculares rápidos (REM – *rapid eye movement*), flutuações cardio-respiratórias, ereções penianas e entumescimento clitoriano, pequenos abalos musculares e as ondas ponto-genículo-occipitais (PGO) no EEG. Os eventos tônicos são a atonia muscular, a dessincronização do EEG (que se torna semelhante ao da vigília), a perda do controle autonômico da temperatura (STAUNTON 2005;HIPOLIDE 2008;SIEGEL 2009).

O sono paradoxal ou REM é regido pelo sistema colinérgico. Nesta fase há aumento no disparo das células colinérgicas da região denominada tegmento pedúnculo-pontino/látero-dorsal (PPT/LDT) no tronco cerebral e também em células colinérgicas do prosencéfalo basal. Ao contrário da vigília, as células noradrenérgicas, localizadas principalmente no locus ceruleus (LC), e as serotonérgicas dos núcleos da rafe apresentam atividade significativamente reduzida, sugerindo o papel destes neurotransmissores na geração do sono paradoxal. O sono paradoxal pode ser inibido pela estimulação de células do LC ou pelo bloqueio de receptores glutamatérgicos no LDT/PPT. Os neurônios do núcleo da rafe, quando inativos, permitem o surgimento das

ondas PGO. Existem dois tipos de neurônios: *sp-on*, inativos durante a vigília e o sono de ondas lentas, mas extremamente ativos durante o sono paradoxal; estão distribuídos ao longo da região pontina PPT/LDT, sugerindo atuação na supressão do tônus muscular no sono paradoxal por meio de projeções excitatórias ao tronco cerebral inferior e, a partir daí, por projeções inibitórias aos motoneurônios da medula espinhal. Os neurônios *sp-off* estão continuamente ativos durante a vigília, mas tornam-se quase inativos durante o sono paradoxal, sendo que alguns destes neurônios são os noradrenérgicos e serotoninérgicos do LC e da rafe. O mecanismo dos movimentos rápidos dos olhos parece ser dependente dos núcleos vestibulares, que por sua vez, produzem os efeitos óculo motores por meio da complexa circuitaria neuronal existente ao nível do colículo superior e do tegmento mesencefálico (STAUNTON 2005;HIPOLIDE 2008;SIEGEL 2009).

Várias evidências indicam que o núcleo do trato solitário (NTS) esteja envolvido na geração do sono (HIPOLIDE 2008). Estimulação elétrica de baixa frequência no NTS produz sincronização cortical, um indicativo de sono sincronizado. E ao contrário, lesão desta estrutura produz dessincronização do EEG em animais que estavam dormindo. O NTS projeta-se para o tálamo, hipotálamo, região pré-óptica, amígdala, mas não para o córtex (HIPOLIDE 2008).

O sono de ondas lentas ou NREM está associado ao aumento da atividade de células da área núcleo pré-óptico ventro-lateral (VLPO). Esta região contém células gabaérgicas que projetam para o núcleo túbero-mamilar do hipotálamo posterior e para os núcleos colinérgicos e monoaminérgicos do tronco encefálico, tendo então uma ação

inibitória sobre os geradores da vigília e da ativação cortical. Durante o sono NREM as células gabaérgicas do núcleo reticular do tálamo têm seu modo de disparo alterado devido à ausência da influência das monoaminas e da acetilcolina (STAUNTON 2005;HIPOLIDE 2008;SIEGEL 2009). Estes neurônios passam a apresentar um ritmo de disparo em rajadas (*bursts*) de potências de ação, que hiperpolarizam os neurônios tálamo-corticais e geram os fusos registrados nos estágios II e III do sono NREM. À medida que o sono se aprofunda, os neurônios tálamo-corticais tornam-se cada vez mais hiperpolarizados, e neste estado passam a gerar o ritmo delta, sincronizando as células corticais. No estágio mais profundo do sono NREM, os neurônios corticais passam a gerar seu próprio ritmo espontâneo de ondas lentas, disparando de maneira altamente sincronizada (STAUNTON 2005;HIPOLIDE 2008;SIEGEL 2009).

1.2 Neuropeptídeos e sono

Os neuropeptídeos participam na regulação das funções do SNC como nocicepção, cognição, modulação do estresse, consumo alimentar, tônus adrenérgico (HOOK *et al.* 1994) e na regulação dos estados de vigília-sono (STEIGER and HOLSBOER 1997) entre outras. Os peptídeos ACTH, fator liberador de corticotrofina (CRF ou CRH), arginina vasopressina e substância P facilitam a vigília e, portanto exercem um papel modulador no sono (HIPOLIDE 2008).

O neuropeptídeo orexina, também chamado de hipocretina, sintetizado exclusivamente na área peri-fornical da região tuberal do hipotálamo, é descrito como um potente promotor de efeitos no ciclo vigília- sono. Além de estimular a alimentação

promove a vigília (TAHERI and HAFIZI 2002). Pedrazzoli e colaboradores mostraram que no líquido cefalorraquidiano de ratos privados de sono por 96 horas ocorre aumento de orexina/hipocretina sugerindo, que os níveis desse neuropeptídeo permanecem elevados devido ao processo de adaptação e à vigília forçada, levando conseqüentemente ao aumento de consumo alimentar (PEDRAZZOLI *et al.* 2004). A deficiência do sistema orexina/hipocretina está diretamente relacionada ao distúrbio de sono conhecido como narcolepsia, tanto em humanos quanto em cães e camundongos (CHEMELLI *et al.* 1999).

Os peptídeos somatostatina, opióides e hormônio estimulante de melanócitos (MSH) são considerados substâncias hipnogênicas, ou seja, induzem sono. Esses peptídeos co-localizam com neurotransmissores e funcionam como neuromoduladores. Porém existem poucas evidências indicando que a ausência de um desses peptídeos resultaria em insônia prolongada (PROSPERO-GARCIA and MENDEZ-DIAZ 2004;HIPOLIDE 2008)..

Em estudos humanos e pré-clínicos mostrou-se que a administração periférica de vários peptídeos resulta em mudanças específicas no EEG do sono em seres humanos (STEIGER and HOLSBOER 1997). Trabalho de revisão de Axel Steiger mostrou que o neuropeptídeo somatostatina, quando administrado ICV, aumenta o sono paradoxal em ratos e aumenta os níveis circulantes de GH. A grelina também quando administrada ICV promove sono, especificamente sono de ondas lentas e aumenta os níveis séricos de GH. A vasopressina, o mais importante cofator para ação do CRH no stress, aumenta a vigília em ratos (STEIGER and HOLSBOER 1997).

Andersen e colaboradores analisaram o envolvimento da substância P no ciclo vigília-sono. Ao administrar-se substância P em camundongos C57BL/6J, sem ativar os mecanismos de dor, verificou-se redução da eficiência do sono, aumento da latência do sono e aumento da frequência de despertares. Portanto a substância P produziu alterações marcantes no ciclo vigília-sono desses animais (ANDERSEN *et al.* 2006).

Cape e colaboradores mostraram que a neurotensina administrada nos neurônios colinérgicos do prosencefalo basal reduz o sono de ondas lentas, sono paradoxal e aumenta a frequência de despertares (CAPE *et al.* 2000).

Estudo realizado com mulheres adultas mostrou que o sono parece exercer profundos efeitos sobre a secreção de gonadotrofinas (ROSSMANITH 1998). Durante a primeira fase folicular do ciclo menstrual ocorre uma secreção tardia do hormônio luteinizante (LH) e aumento na amplitude dos pulsos do LH no período do sono. Esse fenômeno parece estar associado com aumento da atividade opióide no hipotálamo, pois a respostas hipofisária ao hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH ou LHRH) não está modificada mas o antagonista opióide naloxona reduz a secreção de LH no sono (ROSSMANITH 1998).

A administração intravenosa do neuropeptídeo Y em indivíduos jovens normais do sexo masculino levou a uma diminuição na latência do sono e aumento de estágio II da fase NREM (ANTONIJEVIC *et al.* 2000).

1.3 Enzimas proteolíticas e neuropeptídeos

Enzimas proteolíticas também são denominadas proteases ou peptidases,

correspondem a enzimas que quebram ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas. Participam, entre muitas outras funções, na geração ou inativação de peptídeos biologicamente ativos. Por estarem gerando novas moléculas bioativas e também por metabolizarem apresentam uma grande relevância no controle de vários processos biológicos em todos os organismos vivos (LOPEZ-OTIN and BOND 2008).

Com base no mecanismo de catálise e natureza química do resíduo de aminoácido presente no sítio catalítico as proteases são divididas em cinco classes: aspártico peptidases, glutâmico peptidases, metalopeptidases, cisteínopeptidases, serinopeptidases e treoninopeptidases. Como resultado direto das múltiplas ações são responsáveis na regulação do destino, localização e atividade de muitas proteínas, modulam interações entre proteínas-proteínas, contribuem para a transformação de informação celular e na geração, transdução e amplificação de sinais moleculares (LOPEZ-OTIN and BOND 2008).

Os neuropeptídeos inicialmente são sintetizados como precursores inativos como, por exemplo, a pré-pró-encefalina, pré-pró-opiomelanocortina e pré-pró-neuropeptídeo Y. A geração dos pró-neuropeptídeos e neuropeptídeos é feita por enzimas proteolíticas classicamente enzimas intracelulares da família das subtilisinas (furinas e convertases) que reconhecem pares de resíduos básicos, Lys-Arg, Arg-Arg, Arg-Lys, Lys-Arg como sítio de clivagem para geração de proteínas maduras. (HOOK *et al.* 1994; ZHOU *et al.* 1999; SEIDAH and PRAT 2002). Em seguida outras peptidases (aminopeptidases, carboxipeptidases e endopeptidases) podem participar na geração do peptídeo ativo. Recentemente demonstrou-se em animais *knockout* que a catepsina

L tem papel importante na geração de neuropeptídeos (HOOK 2006;HOOK *et al.* 2008;FUNKELSTEIN *et al.* 2009).

A catepsina L e proteínas convertases (PC) são endopeptidases que a partir da POMC geram vários neuropeptídeos ativos. Por exemplo, a POMC é hidrolisada pela enzima pró-hormônio convertase 1 (PC1) que gera o ACTH e a carboxipeptidase E gera MSH dos 2 tipos α e γ (α -MSH) e (γ -MSH). A conversão da POMC em vários diferentes neurotransmissores e hormônios peptídicos é realizada de forma específica nos tecidos. Por exemplo, o ACTH é produzido a partir de POMC na hipófise anterior, mas α -MSH e β -endorfina são produzidas a partir de POMC na hipófise (HOOK 2006).

Os precursores protéicos podem conter uma ou várias cópias do mesmo neuropeptídeo, por exemplo, o precursor pré-pró-encefalina contém múltiplas cópias de encefalinas, enquanto o precursor pré-pró-neuropeptídeo Y contém apenas uma cópia do neuropeptídeo ativo (HOOK 2006).

Embora exemplos das diversas famílias de proteases (aspartil, serino, cisteinil e metalopeptidases) são encontradas no SNC, a grande maioria das enzimas descritas, envolvidas no metabolismo de peptídeos, pertence à classe das metalopeptidases (SHRIMPTON *et al.* 2002). As metalopeptidases apresentam no sítio ativo um cátion divalente Zn^{2+} , que é responsável pela ativação da molécula de água que, por sua vez, catalisa a hidrólise da ligação peptídica. Duas metalopeptidases muito importantes na geração e metabolização de peptídeos biologicamente ativos são a enzima conversora de angiotensina-I e thimet oligopeptidase (SHRIMPTON *et al.* 2002;BOHLEN UND and ALBRECHT 2006).

1.3.1 Enzima conversora de angiotensina-I (ECA, EC. 3.4.15.1,)

A ECA é uma metalopeptidases da família M2 do clã MA (Banco de dados MEROPS 2010). A ECA é uma ectoenzima de membrana e está amplamente distribuída no organismo dos mamíferos (PAUL *et al.* 2006;BADER 2010), sendo também encontrada nas células do SNC (BOHLEN UND and ALBRECHT 2006). Uma forma solúvel, resultante da clivagem da enzima de membrana é encontrada no plasma (WEI *et al.* 1991), fluidos corpóreos como a urina, (HATTORI *et al.* 2000), líquor e líquido amniótico (PAUL *et al.* 2006).

A ECA apresenta duas isoformas: forma somática, contendo dois sítios (N- e C-terminal) com alta massa molecular (150-180 kDa) presente no endotélio, epitélio e células neuroepiteliais e a isoforma menor (90-110 kDa) presente em células germinativas, correspondente ao domínio carboxi-terminal da forma somática (EHLERS *et al.* 1989).

Ingrid Fleming tem sugerido uma nova ação da ECA, como um transdutor de sinal. A ECA é fosforilada na Ser-1270, na sua porção intracelular, pela proteína quinase C que desencadeia uma cascata de sinalização via ativação de c-Jun que pode levar aumento de ciclooxigenase-2 (COX-2) e influenciar na expressão gênica (FLEMING *et al.* 2006).

1.3.1.1 Funções fisiológicas

1.3.1.2 Sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA)

A ação do SRAA no sistema circulatório e na manutenção da pressão arterial é conhecida há décadas (PAUL *et al.* 2006). O SRAA é responsável por regular a pressão arterial. Uma das principais funções da ECA é a sua participação no sistema renina-angiotensina-aldosterona. Quando ocorre a queda no fluxo sanguíneo renal, que pode ter sido provocada pela diminuição da pressão arterial, a protease ácida renina (EC.3.4.23.15) é secretada no sangue pelas células justaglomerulares renais. A renina age sobre o angiotensinogênio (α - globulina sintetizada no fígado e tecidos adiposos e liberado na circulação) liberando o decapeptídeo angiotensina I ou Ang I (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu). Este é convertido em Ang II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) pela ação da ECA que cliva o di-peptídeo His-Leu, na porção C-terminal da Ang I. A ação biológica do SRAA é mediada pelo octapeptídeo Ang II através dos receptores específicos de Ang II, denominados AT₁ e AT₂. O peptídeo Ang II é um potente agente vasoconstritor, a qual leva a um aumento na resistência periférica e, conseqüentemente aumento de pressão arterial. A Ang II circulante além do seu efeito vasoconstritor, pode estimular a secreção de aldosterona no cortex adrenal aumentando a retenção renal de sódio (através da aldosterona) e água (através da liberação de vasopressina) (BADER 2010). A Ang II circulante pode atravessar a região do órgão circunventricular (CVOs), e ativar o órgão subfornical que envia projeções para núcleo paraventricular que modula diretamente a atividade simpática.

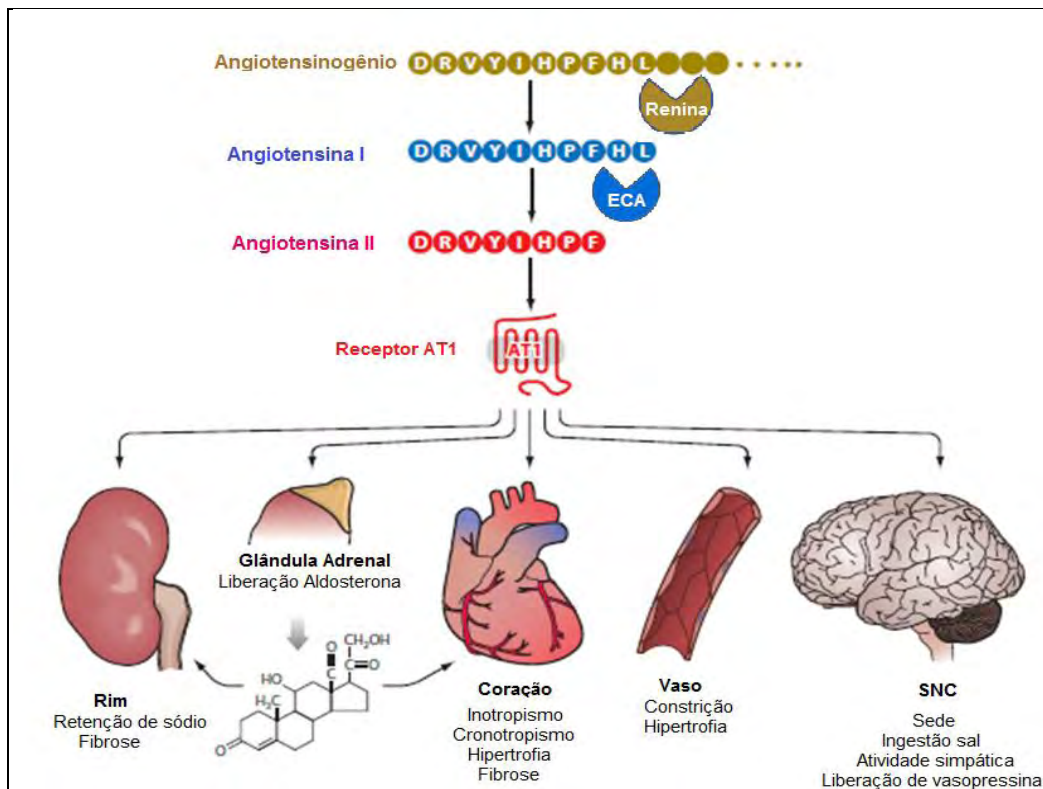


Figura 1. Representação esquemática do sistema renina-angiotensina-aldosterona e seus efeitos fisiológicos nos diferentes tecidos. Modificado (BADER 2010).

Recentemente novos componentes do SRAA foram descritos (PAUL *et al.* 2006). Através da enzima conversora da angiotensina II (ECA-2; EC. 3.4.17.23), que retira fenilalanina da porção amino terminal da Ang II gerando Ang 1-7 (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro). A Ang 1-7 promove vasodilatação e diminuição da pressão arterial, este peptídeo é ligante do receptor Mas que é expresso no cérebro, testículos, rins, coração e vasos (BADER 2010).

Há mais de 30 anos demonstrou-se que o angiotensinogênio, a renina e a ECA são também sintetizadas em regiões do cérebro (FISCHER-FERRARO *et al.* 1971). Várias revisões recentes ressaltam a importância e possíveis implicações da existência do sistema SRAA completo no cérebro (MCKINLEY *et al.* 2003;PAUL *et al.* 2006;BOHLEN UND and ALBRECHT 2006;WRIGHT *et al.* 2008;ALBRECHT 2010). Os fragmentos Ang III (Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) e Ang IV (Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe), cuja função era desconhecida, foram descritos no sistema nervoso central (PAUL *et al.* 2006;BOHLEN UND and ALBRECHT 2006). A formação de Ang III se dá a partir da metabolização pela aminopeptidase A (EC. 3.4.11.7) na Ang II, retirando o aspartato amino terminal. A ação subsequente da aminopeptidase N (EC. 3.4.11.2), remove a arginina e promove a formação de Ang IV.

A presença dos componentes do SRAA foi mostrada com técnicas de imunohistoquímica, hibridização *in situ*, auto-radiografia e ensaios de competição. Algumas regiões mostraram uma marcação predominante nas regiões do hipotálamo como no órgão circumventricular, núcleo do trato solitário e núcleo paraventricular, estriado, medula ventrolateral, hipocampo, córtex pré-frontal (MCKINLEY *et al.* 2004;PAUL *et al.* 2006). Os receptores AT₁, AT₂, AT₃ e AT₄ estão presentes diversas regiões do SNC (MCKINLEY *et al.* 2003).

No SNC o receptor AT₁ e Ang II são sintetizados localmente nas regiões da área postrema, órgão vascular da lâmina terminal e órgão subfornical. Podendo enviar projeções angiotensinérgicas para o núcleo paraventricular, núcleo supra-óptico, núcleo do trato solitário e medula ventrolateral. Estudos sugerem que a Ang II pode agir como

neurotransmissor (MCKINLEY *et al.* 2004;ALBRECHT 2010). A Ang II pode estimular neurônios do órgão subfornical, que envia projeções para os núcleos pré-ópticos medianos. Essas projeções angiotensinérgicas para o núcleo pré-óptico conectam com o núcleo paraventricular para liberar vasopressina, aumentando a atividade simpática e conseqüentemente a pressão arterial. Também tem sido sugerido que os fragmentos Ang IV e Ang 1-7 também podem agir como neurotransmissores (ALBRECHT 2010).

Além de gerar Ang II no SNC, o SRAA, em particular a ECA está envolvido no processamento de neuropeptídeos, regulação sistêmica da pressão arterial, manutenção do balanço de eletrólitos (PAUL *et al.* 2006), estimulação do comportamento da sede (MCKINLEY *et al.* 2004), modulação do apetite por sal e parece também afetar o aprendizado e memória (WRIGHT *et al.* 2008).

1.3.1.3 ECA e sistema caliceína-cininas

Outra importante função da ECA é inativar o peptídeo vasodilatador bradicinina (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg). Esse sistema está envolvido na transmissão de dor (DRAY and PERKINS 1993), controle da pressão arterial (SCHOLKENS 1996) e no processo de geração e manutenção do estado inflamatório (BHOOLA *et al.* 1992). Trabalhos recentes indicam que na membrana celular a ECA e o receptor de bradicinina B2 podem interagir resultando na modulação das respectivas atividades (SABATINI *et al.* 2008).

1.3.1.4 Substratos da ECA *in vitro* e *in vivo*

A ECA é uma carboxidipeptidase que age na extremidade carboxi-terminal livre liberando, em geral, dois resíduos de aminoácidos e pode atuar sobre diversos oligopeptídeos biologicamente ativos (ACHARYA *et al.* 2003). Além da Ang I e bradicinina, ensaios *in vitro* mostraram que a ECA pode hidrolisar hemopressina (RIOLI *et al.* 2003), peptídeo β -amilóide (MINERS *et al.* 2008), corticotrofina (SCHOLZEN *et al.* 2007), neurotensina (SKIDGEL and ERDOS 2004) e os peptídeos opióides, β -endorfina, met-enkefalina e dinorfina (AKAHORI *et al.* 2008). Foi mostrado que na substância P a ECA pode gerar dipeptídeo e tripeptídeo (SKIDGEL and ERDOS 2004).

A ECA hidrolisa *in vitro* (RIEGER *et al.* 1993) e *in vivo* (JUNOT *et al.* 2001) o tetrapeptídeo Ac-SDKP (N-Acetil-Ser-Asp-Lys-Pro). Este peptídeo regula negativamente a hematopoese, impedindo que as células pluripotentes da medula óssea entrem na fase S do ciclo celular. A inibição da enzima na medula óssea resulta no acúmulo do peptídeo Ac-SDKP (HAZNEDAROGLU and OZTURK 2003).

Na literatura estão descritos muitos substratos para avaliar a atividade da ECA. A primeira metodologia foi desenvolvida por Friedland & Silverstein em 1977 que utiliza o substrato Hip-His-Leu. A atividade da ECA é determinada pela velocidade de geração do dipeptídeo His-Leu que é derivatizado e medido no fluorímetro (FRIEDLAND and SILVERSTEIN 1976). Recentemente, para avaliar a atividade da ECA, foi descrito um substrato fluorogênico de alta sensibilidade e especificidade, Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)-Pro-OH, para dosagem em fluídos em tecido humano e de rato. (ALVES *et al.* 2005; CARMONA *et al.* 2009). Outro substrato, derivado da seqüência Ac-SDKP (Abz-

Ser-Asp-Lys(Dnp)-P-OH) permite ainda distinguir seletivamente entre a atividade do sítio N-terminal e C-terminal da ECA, sendo praticamente hidrolisado apenas pelo domínio N-terminal (ARAUJO *et al.* 2000).

1.3.2 Thimet oligopeptidase (EP24.15, TOP, EC 3.4.24.15)

A thimet oligopeptidase ou endopeptidase 24.15 (EP24.15) pertence a família M3 das metalopeptidases. A EP24.15 está presente em aves e mamíferos e muito certamente em mais grupos de animais (TISLJAR 1993). Orłowski e colaboradores em 1983 isolaram EP24.15 de extrato de cérebro de ratos (ORŁOWSKI *et al.* 1983). Inicialmente confundida com oligopeptidase A (EC 3.4.22.19) descrita anteriormente por Camargo e Graeff (CAMARGO and GRAEFF 1969) foi posteriormente identificada como uma nova enzima recebendo a classificação EC. 3.4.24.15 (CAMARGO 1991).

Experimentos imuno-histoquímicos em cérebro de rato revelaram uma marcação predominantemente nuclear para EP24.15, porém, após o sub-fracionamento celular, a fração nuclear obtida do cérebro de rato apresenta pouca atividade enzimática (TISLJAR 1993). Experimentos de microscopia eletrônica confirmam a presença de EP24.15 no núcleo de células de cérebro de rato, e também no citoplasma (FONTENELE-NETO *et al.* 2001). Esse estudo mostrou que nos compartimentos neuronais a EP24.15 está associada às membranas dos elementos secretórios, como o cis-Golgi, organelas tubo vesiculares, endossomos e finalmente às vesículas sinápticas (FONTENELE-NETO *et al.* 2001), confirmando outro estudo anterior em que a EP24.15 foi também identificada associada às membranas sinápticas do cérebro de rato (ACKER

et al. 1987). A maior parte da atividade da EP24.15 é obtida na fração solúvel do citoplasma, onde pode estar participando da degradação de oligopeptídeos (FONTENELE-NETO *et al.* 2001). Recentemente foi mostrado que a EP24.15 pode ser secretada o que parece ocorrer através de uma via secretória não convencional, e depende da interação com a proteína 14.3.3 (CARRENO *et al.* 2005) e calmodulina (RUSSO *et al.* 2009). Portanto a EP24.15 está presente no núcleo, citoplasma e no meio extracelular, sugerindo que a enzima pode trafegar por esses 3 compartimentos celulares.

1.3.2.1 Funções fisiológicas

O metabolismo de peptídeos no citoplasma é um importante aspecto da proteólise celular em que a EP24.15 parece estar envolvida, devido à sua presença no citoplasma e também à presença de peptídeos possíveis substratos da EP24.15. Essa endopeptidase tem sua ação restrita a peptídeos entre 6 a 17 resíduos de aminoácidos, tamanho que inclui vários peptídeos biologicamente ativos (OLIVEIRA *et al.* 2001). Foram descritos substratos *in vitro* como a somatostatina, Ang I gerando Ang 1-7, neurotensina (VINCENT *et al.* 1997), e os peptídeos opióides como dinofirina A₁₋₈, β -neoendorfina (SHRIMPTON *et al.* 2002) e nociceptina/orfanina (NOBLE and ROQUES 1997) e *in vivo* como a bradicinina (SANDEN *et al.* 2008) e o GnRH (MOLINEAUX *et al.* 1988a;WU *et al.* 1997).

A EP24.15 pode hidrolisar os peptídeos que são gerados pelo proteasoma, de fato, essa teoria foi verificada em dois trabalhos (SILVA *et al.* 1999;PORTARO *et al.*

1999) onde se mostrou que os epítomos apresentados pelo MHC classe I não são hidrolisados eficientemente pela EP24.15 *in vitro*, podendo ser considerados inibidores competitivos com alta afinidade por esta protease. Mostrou-se ainda que a apresentação destes epítomos possa ser modulada pelo inibidor da EP24.15 (CPP-AAY-pAb) e/ou pela adição desta enzima em um sistema onde se mede a proliferação de células T CD8 (SILVA *et al.* 1999). Juntos estes trabalhos indicam fortemente que a EP24.15 tem um papel importante nesta rota de apresentação dos peptídeos antigênicos, e ainda que esta pode estar protegendo estes peptídeos no citoplasma, e não os degradando como seria esperado por se tratar de uma peptidase. Embora exista ainda alguma controvérsia sobre a função exata da EP24.15 nesse sistema, (SILVA *et al.* 1999; SARIC *et al.* 2001), parece claro que essa protease desempenha um papel essencial na apresentação dos antígenos peptídicos gerados no citoplasma (ROCK *et al.* 2004).

1.3.2.2 Substratos da EP24.15 *in vivo* e *in vitro*

Alguns trabalhos mostram atividade da EP24.15 *in vivo* e *in vitro* sobre a bradicinina (SHRIMPTON and SMITH 2000; SANDEN *et al.* 2008). A EP24.15 modula negativamente a resposta do receptor B2, e age como uma peptidase intracelular na degradação de bradicinina internalizada através deste receptor (SANDEN *et al.* 2008). Foram mostradas evidências da secreção da EP24.15 pelo epitélio da traquéia bovina, sendo nesse tecido a principal via de metabolização da bradicinina (DENDORFER *et al.* 1997). No fígado de rato uma peptidase, primeiramente denominada de BIE

(Bradykinin-Inactivating-Endopeptidase) tem grande semelhança com a EP24.15 e apresenta importante participação na degradação da bradicinina (MOLINA *et al.* 1996;MOLINA *et al.* 2000)

Outros trabalhos têm sugerido uma participação da EP24.15 na doença de Alzheimer. Sugere-se a ação direta da EP24.15 sobre a proteína precursora do peptídeo β -amilóide, com a liberação desse peptídeo (KOIKE *et al.* 1999) , o que é pouco provável pois se trata de uma proteína grande. Outro trabalho sugere uma ação indireta da EP24.15 porém mostrando que a atividade da enzima é essencial para a liberação do peptídeo β -amilóide (YAMIN *ET AL.* 1999;SHRIMPION *ET AL.* 2002).

O GnRH ou LHRH é um decapeptídeo (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂) sintetizado no núcleo arqueado e tem projeção para axônios da eminência mediana do hipotálamo (ROSSMANITH 1998) que atua sobre a hipófise promovendo a liberação dos hormônios FSH e LH que vão atuar estimulando os ovários e testículos. A EP24.15 está localizada na região da eminência mediana associada com GnRH nos terminais axonais (WU *et al.* 1997), sugerindo uma relação funcional entre a endopeptidase e hormônio (WU *et al.* 2009). Tullai e colaboradores demonstraram que a EP24.15 pode ser fosforilada *in vitro* pela proteína quinase A na Ser-644 modificando os parâmetros cinéticos para hidrólise do GnRH (TULLAI *et al.* 2000).

A neurolisina (EC.3.4.24.16 ou EP24.16) é uma metaloprotease com grande similaridade de seqüência com a EP24.15. O peptídeo neurotensina (pGlu-Leu-tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu), um importante neurotransmissor (CAPE *et al.* 2000) é clivado na ligação Arg-Arg pela EP24.15 e Pro-Tyr pela EP24.16, gerando dois

fragmentos inativos (CHECLER *et al.* 1983).

1.4 Privação de sono

Devido às exigências e oportunidades da sociedade moderna tornou-se hábito a redução do tempo de dormir. A prevalência de distúrbios de sono e a restrição crônica de sono têm aumentado nos habitantes em cidades industrializadas (TUFIK *et al.* 2009). Efeitos da privação de sono no balanço energético têm sido relatado durante décadas (SPIEGEL *et al.* 2005).

Em seres humanos algumas das condições de privação de sono são a insônia e a síndrome da apnéia obstrutiva do sono (SAOS). Estudo realizado pelo Departamento de Psicobiologia da UNFESP em 2007 na cidade de São Paulo com 1054 voluntários mostrou que 32,8% dos indivíduos apresentavam SAOS (TUFIK *et al.* 2010).

A privação de sono é uma das principais ferramentas de estudo que nos levam à compreensão da fisiologia e dos mecanismos de regulação do ciclo vigília-sono.

A importância do sono paradoxal ou REM foi comprovada mediante estudos de supressão desta fase do sono. Em humanos e em animais, observou-se que à medida que aumenta o tempo de privação de sono paradoxal estímulos mais intensos e mais freqüentes são necessárias para impedir que ele entre nessa fase do sono. Nos casos extremos torna-se praticamente impossível impedir a entrada em sono REM (SUCHECKI and D'ALMEIDA V 2008). Outra evidência da importância do sono paradoxal é o chamado efeito rebote. Após um período de privação de sono paradoxal (PSP), na noite de recuperação o indivíduo tem maior quantidade de sono paradoxal,

aparentemente como compensação do período perdido. Esse efeito ocorre tanto em humanos quanto em animais (SUCHECKI and D'ALMEIDA V 2008;TUFIK *et al.* 2009).

Na privação de sono paradoxal são encontradas alterações no comportamento sexual (ANDERSEN *et al.* 2000;ANDERSEN *et al.* 2004b;ANDERSEN *et al.* 2009;CALEGARE *et al.* 2010), estresse oxidativo (D'ALMEIDA *et al.* 1997;D'ALMEIDA *et al.* 1998;DE OLIVEIRA *et al.* 2002;CALEGARE *et al.* 2010), ansiedade e depressão (ADRIEN 2002), aprendizagem e memória (SILVA *et al.* 2004;ALVARENGA *et al.* 2009), balanço energético, resistência à insulina e obesidade (SPIEGEL *et al.* 2005;VAN CAUTER *et al.* 2008;KOBAN *et al.* 2008) entre muitas outras (TUFIK *et al.* 2009).

1.4.1 Modelos de privação de sono

A adoção de modelos animais em experimentos de privação de sono tornou-se necessária, permitindo que fossem feitas avaliações bioquímicas, farmacológicas, neuronatômicas e comportamentais. Ratos (*Rattus norvegicus*) e camundongos (*Mus musculus*) são freqüentemente utilizados em estudos de vigília, privação e restrição de sono. Estes animais apresentam sono polifásico (vários ciclos sono-vigília por dia) e dormem aproximadamente 13 horas. A análise do EEG mostrou semelhanças ao sono humano (TIMO-IARIA *et al.* 1970;STAUNTON 2005).

1.4.2 Métodos de privação de sono

Alguns métodos instrumentais foram desenvolvidos para reduzir, suprimir ou privar animais de sono paradoxal. A primeira metodologia instrumental para a PSP em animais foi à técnica *flower-pot*, desenvolvida por Jouvét e colaboradores (JOUVET *et al.* 1964). Nesse estudo eram utilizados gatos que ficavam posicionados sobre um vaso de flor (*flower-pot*) invertido com o nível da água abaixo da sua superfície. A atonia muscular presente no sono paradoxal faz com que o animal acorde ao encostar o focinho ou, ainda, o corpo inteiro na água. Pouco tempo depois, este método foi adaptado para ratos por Cohen e Dement utilizando plataforma circulares de 6,5 cm de diâmetro (COHEN and DEMENT 1965). O grupo controle era colocado sobre uma plataforma de 14 cm de diâmetro sob as mesmas condições ambientais. Estudo posterior mostrou que o grupo controle perdia 50% de sono paradoxal. (PORKKAHEISKANEN *et al.* 1995). Essa metodologia recebeu outras críticas por manter o animal em isolamento e restringir os movimentos, o que poderia levar a interpretações erradas dos resultados (SUCHECKI and D'ALMEIDA V 2008). Outros estudos foram realizados para discriminar as alterações observadas após a PSP e reduzir os efeitos do estresse. Na tentativa de eliminar a restrição de movimento Van Hulzen e Cohen propuseram a plataforma múltipla. O rato é colocado dentro de um grande tanque de água contendo sete plataformas permitindo que o animal se movimente (VAN HULZEN and COENEN 1981). Mas essa metodologia não eliminava o isolamento social, Suchecki e Tufik propuseram o método da plataforma múltipla modificada (MPMM), utilizando grupos socialmente estáveis (10 animais de uma

gaiola), em vez de animais provenientes de várias gaiolas. Os resultados deste trabalho sugerem que as variáveis relacionadas com o estresse do MMPM podem ser atenuadas em grupos estáveis (SUCHECKI and TUFIK 2000). Recentemente estudo do mesmo grupo mostrou que durante o período de PSP96, o MPMM foi capaz de suprimir totalmente o sono paradoxal nos animais e que também reduzia em 38% o sono de ondas lentas (MACHADO *et al.* 2004). Portanto essa técnica é denominada de privação de sono paradoxal.

Foi proposto também um modelo crônico de privação, a restrição de sono. Esse método consiste em submeter os animais à plataforma múltipla por 18 horas (início às 16 h) durante 21 dias. Após cada período de 18 horas de PS, os ratos podem dormir por seis horas (janela de sono iniciando às 10 h). Como resultado da restrição, obtém-se uma supressão completa da PSP e perda do sono de ondas lentas, que são parcialmente compensados durante a janela de dormir de 6 h. A escolha desse intervalo de tempo (10 h às 16 h) deve-se ao fato de ser o período em que o sono paradoxal atinge sua maior concentração e o sono de ondas lentas é estabilizado (MACHADO *et al.* 2005).

Outro método descrito usado para suprimir o sono, o *gentle handling*, consiste em manusear delicadamente o animal assim que este apresenta indícios de sonolência (SANTOS *et al.* 2008a; CALEGARE *et al.* 2010). Este método permite tanto a privação total do sono quanto a fragmentação do sono.

O método do disco giratório consiste em colocar dois animais (um privado de sono e outro controle) sobre um disco giratório. Por meio do registro polissonográfico o

computador é acionado toda vez que o rato experimental inicia o sono que se deseja suprimir, assim o disco começa a girar. O animal experimental precisa andar no sentido contrário ao do disco para não cair na água. O animal controle também se encontra no mesmo disco tem que se locomover podendo ser acordado em fases não determinadas do seu ciclo sono-vigília. Essa metodologia recebeu algumas críticas como a locomoção forçada que o animal é obrigado a executar, a falta de um controle adequado, já que o animal controle do disco pode ser também parcialmente privado de sono (RECHTSCHAFFEN *et al.* 1983).

2 OBJETIVOS

Considerando a importância das metalopeptidases na metabolização de neuropeptídeos envolvidos do SNC e na regulação do sono procuramos determinar o efeito da privação de sono paradoxal em ratos sobre a expressão e atividade de duas importantes peptidases a ECA e EP24.15.

Espera-se também correlacionar as variações de expressão e atividades dessas peptidases com os efeitos observados da privação de sono sob diversos sistemas como cardiovascular, endócrino, reprodutor e nas funções nociceptivas, cognitivas e de resposta ao estresse.

3. MATERIAIS E METODOS

3.1 Síntese de peptídeos em fase sólida

Para avaliar a atividade das enzimas ECA e EP24.15 utilizamos substratos peptídicos com supressão intramolecular de fluorescência. Estes substratos foram desenvolvidos para tornar mais sensível e rápida a determinação da atividade de enzimas proteolíticas (CHAGAS *et al.* 1991;HIRATA *et al.* 1994) e têm sido usados com sucesso no estudo de especificidade de todas as classes de peptidases (CARMONA *et al.* 2009).

Nestes substratos, do tipo Abz-peptidil-EDDnp, na porção amino-terminal está presente o grupo fluorescente ácido orto-aminobenzóico (Abz) e na porção carboxi-terminal é introduzido o grupo supressor da fluorescência etilenodiamino 2,4-dinitrofenil (EDDnp). Enquanto a cadeia peptídica estiver integra e estes dois grupos (fluorescente - Abz e supressor de fluorescência – EDDnp) estiverem relativamente próximos, a fluorescência do composto será baixa. Após a hidrólise, em solução, os grupos Abz e EEDnp afastam-se e a fluorescência aumenta várias vezes, sendo este aumento proporcional à velocidade de hidrólise.

Para a síntese dos substratos peptídicos utilizou-se a estratégia Fmoc, em fase sólida e as etapas de acoplamento e desproteção foram realizadas sob irradiação de microondas e estão descritas na tabela 1 (Discovery, CEM Company, Estados Unidos) (BACSA *et al.* 2006).

Tabela 1. Protocolo utilizado para síntese de peptídeos em fase sólida utilizando microondas.

Etapas	Reagentes	Irradiação das microondas
Acoplamento	5 equivalentes de TBTU 5 equivalentes de HoBt 1 equivalente de DIPEA	100W por 30 segundos
Desproteção	20% piperidina em DMF	50W por 5 minutos

Nas etapas de purificação de substratos fluorescentes foi utilizado o sistema de HPLC preparativo (SCL-10A, Shimadzu, Japão), constituído de duas bombas modelo CTO-10A, injetor Rheodyne com aplicador de 2ml, coluna Interchrom C-8 (150 x 21,2 mm), monitor UV (SPD-10A) para detecção em $\lambda = 212$ nm e monitor de fluorescência (RF-10AXL) ajustado para $\lambda_{ex} = 320$ nm e $\lambda_{em} = 420$ nm. Os tampões utilizados foram solvente A (TFA 0,1% em água) e solvente B (Metanol/água 9:1, TFA 0,1%). O fluxo foi mantido em 3 ml/min e os gradientes variados segundo a necessidade de cada peptídeo.

Para o HPLC analítico foi utilizado o sistema HPLC (LC-20A Prominence, Shimadzu, Japão), o substrato peptídico foi analisado em sistema gradiente 10 a 100% utilizando os solventes A (TFA 0,1% em água) e B (Metanol/água 9:1, TFA 0,1%), coluna Ultrasphere C-18 (250 x 4.6 mm), monitor Diode Array (SPS-M20A) e monitor de fluorescência (RF-10AXL) ajustado para $\lambda_{ex} = 320$ nm e $\lambda_{em} = 420$ nm.

O material foi caracterizado por espectrometria de massa (Varian, 1200L Quadrupole, Estados Unidos). A concentração dos substratos fluorogênicos foi

determinada pela medida fotométrica a 365nm do grupo Dnp, utilizando seu coeficiente de extinção molar ($17300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) e comparados com a análise de aminoácidos (LC-10A/C-R7A, Shimadzu, Japão) com derivatização por orto-diftalaldeído.

3.2 Privação de sono paradoxal

Foram utilizados 80 ratos *Wistar* machos, de 3 meses de idade, da mesma linhagem, provenientes do Biotério do Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo. Os experimentos foram conduzidos segundo princípios éticos (INSTITUTE OF LABORATORY ANIMAL RESOURCES 1996; ANDERSEN ML *et al.* 2004) e sob aprovação do Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo. (Aprovação: CEP0144/09)

Os animais foram submetidos a PSP96 pelo método da plataforma múltipla, a sala foi mantida em condições de temperatura constante ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e sob um ciclo claro-escuro de 12 horas, iniciando-se a fase clara às 7 horas da manhã. A ração e água foram fornecidos *ad libitum* por meio de uma grade localizada sobre o tanque. A água do tanque foi trocada diariamente. Os ratos foram distribuídos em 5 grupos: Grupo Controle: os animais foram mantidos em suas gaiolas e manipulados apenas para a limpeza da forração da gaiola. Foram mantidos na mesma sala que o grupo experimental para igualar suas condições experimentais. Grupo privação de sono por 96 horas: os animais foram submetidos à PSP pelo MPMM por 96 horas e sacrificados logo após o término desses períodos. Grupo rebote de privação de sono: os animais

foram submetidos à PSP pelo MPMM por 96 horas e após esse período, retornaram às suas gaiolas de moradia e puderam dormir por 24 horas, 48 horas ou 96 horas, chamado de período rebote.

3.3 Extração de RNAm e proteínas

Ao final de cada experimento, os animais foram imediatamente eutanaziados pelo método da decapitação em uma sala adjacente. Os cérebros foram removidos imediatamente após o sacrifício para a dissecação do estriado, hipocampo, hipotálamo, córtex e tronco encefálico. As regiões escolhidas estão envolvidas na ativação do sono ou são sabidamente afetadas pela privação de sono (MACHADO *et al.* 2008).

Para a extração de proteínas as amostras foram homogeneizadas em tampão apropriado. Para cada 1g de tecido foram adicionados 3 ml de Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 contendo NaCl 50 mM e 0,1% Triton X-100. O homogenato obtido foi centrifugado a 1000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante resultante foi aliqotado e armazenado a -80°C até sua utilização.

Para a extração de RNAm utilizou-se o método do Trizol® (Invitrogen Life Sciences, Estados Unidos). A fim de se obter RNAm livre de contaminações de DNA genômico, que pode interferir na análise de RT-PCR, as amostras foram incubadas com a enzima DNase I (Invitrogen Life Sciences, Estados Unidos) a 37°C por 30 minutos. A DNase I foi inativada através da adição EDTA 1mM e incubando por 65°C por 10 minutos. A qualidade e quantidade do RNAm foi avaliada em equipamento

espectrofotometro (NanoDrop 8000, Termo scientific, Estados Unidos) e em gel de agarose 2%.

3.4 Determinação de atividade enzimática

Para medida da atividade enzimática da ECA utilizou-se o substrato Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)-Pro-OH na concentração final de 10 μ M em tampão Tris-HCl 100 mM, pH7.0 contendo NaCl 100 mM e $ZnCl_2$ 10 μ M conforme descrito (CARMONA *et al.* 2006). Foram utilizados 20 μ l de extrato tecidual para um volume final de 200 μ l de incubado. Como controle positivo foi utilizada ECA purificada de pulmão de coelho (Sigma Chemical Company) e como controle negativo utilizamos o inibidor Lisinopril (Sigma Chemical Company) na concentração final de 0,5 μ M conforme descrito na tabela 2.

Para medida da atividade da EP24.15 utilizou-se o substrato Abz-GFDPFRQ-EDDnp em tampão Tris-HCl 50 mM em pH7.4, NaCl 100 mM conforme foi descrito (OLIVEIRA *et al.* 2001). Foram utilizados 20 μ l de extrato tecidual para um volume final de 200 μ l de incubado. A Enzima foi ativada por DTT na concentração final 0.5 mM, durante 5 minutos a 37°C, antes da adição do substrato. Como controle positivo utilizamos enzima recombinante EP24.15 e como controle negativo o inibidor específico JA-2 (N-[1-(R, S)-carboxi-3-fenilpropil]-Ala-Aib-Tyr-p-aminobenzoato (SMITH *et al.* 2000) na concentração 2 μ M, ambos cedidos pelo prof. Vitor Oliveira do Departamento de Biofísica da UNIFESP.

Tabela 2. Substratos e inibidores validados para determinação das atividades de ECA e EP24.15 em tecidos do SNC de ratos.

Enzima	Substrato	Inibidor	Referência
ECA	Abz-FRK(Dnp)P-OH	Lisinopril (0,5 μ M)	(CARMONA <i>et al.</i> 2006)
EP24.15	Abz-GFDPFRQ-EDDnp	JA2 (2 μ M)	(OLIVEIRA <i>et al.</i> 2001)

Os parâmetros cinéticos para a hidrólise dos peptídeos com fluorescência suprimida pelas enzimas ECA e EP24.15 foram determinados em fluorímetro com leitor de microplacas (Gemini XS, Molecular Devices Company, Estados Unidos). As medidas foram feitas em triplicatas, com λ_{ex} = 320nm e λ_{em} = 420nm. A partir da leitura das amostras obtém-se uma curva de fluorescência por unidade de tempo e a inclinação desta curva resulta na atividade enzimática.

Foram realizadas dosagens de proteínas de cada amostra, pelo método de Bradford (BRADFORD 1976) e a atividade enzimática convertida em atividade específica em Unidades Arbitrárias de Fluorescência por mg de proteína por minuto (UAF/mg/min). Os fragmentos resultantes da hidrólise dos substratos fluorogênicos pelas enzimas foram identificados por HPLC analítico e espectrometria de massa.

3.5 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)

A técnica de PCR em tempo real permitiu a quantificação relativa de RNAm das proteases e a correlação com as atividades enzimáticas medidas.

Para quantificação relativa de RNAm das proteases e a correlação com as

atividades enzimáticas medidas foi utilizada a técnica de PCR em tempo real e metodologia de quantificação relativa Sybr Green, (Universal Master Mix, Applied Biosystems, Estados Unidos). Para utilização em nosso laboratório foram validados os *primers* da ECA e beta-actina (Tabela 3). Estudos preliminares já nos permitiram validar os *primers* da EP24.15. Lee e colaboradores mostraram que os genes beta-actina e GAPDH não sofrem modificações nos experimentos de privação de sono por 96 horas, portanto foram escolhidos como controle endógeno para normalização (LEE *et al.* 2009).

Tabela 3. Seqüências de primers da ECA, EP24.15 e Beta-actina e seus respectivos códigos de acesso no Genbank.

Genes	Pares de <i>primers</i>	Código acesso <i>Genbank</i>
ECA	sense: 5´TGATGTGGAGATGAGCATGAGGCA3´ anti-sense: 5´AGGCTTCAGTGAGTCTTTCGGGAT3´	NM_012544
EP24.15	sense: 5´TGATGTGGAGATGAGCATGAGGCA3´ anti-sense: 5´AGGCTTCAGTGAGTCTTTCGGGAT3´	NM_172075.2
Beta-actina	sense: 5'AGGCCAACCGTGAAAAGATG3' anti-sense: 5´CCAGAGGCATACAGGGACAAC3´	NM_031144.2

Na reação de RT-PCR foram utilizadas aproximadamente 200 ng de cDNA como molde os primers sense e anti-sense na concentração final de 100 nM e adicionados

10µl de Sybr Green, essa solução foi colocada em placa óptica de 96 poços (Applied Biosystems, Estados Unidos) e lacrada com adesivo ópticos (Applied Biosystems, Estados Unidos) e submetido a amplificação e detecção através do RT-PCR em tempo real (7500, Applied Biosystems, Estados Unidos) por 40 ciclos.

3.6 Western Blot

Os extratos biológicos foram diluídos a fim de se obter 50µg de proteína total em 15ul de solução que foram desnaturadas a 95°C durante 5 minutos e aplicados nos pocinhos do gel de poliacrilamida na concentração 10%. Em um dos pocinhos foram aplicados 2µl do padrão de peso molecular (Kaleidoscope, BioRad, Estados Unidos). O tampão de corrida consistiu de Tris-HCl 25 mM, Glicina 192 mM e 0,1% SDS, as proteínas foram separadas através da aplicação de 230 volts por 1 hora. Após a corrida as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond C, Millipore, Estados Unidos) utilizando tampão gelado Tris-HCl 25 mM, Glicina 192 mM, 20% Metanol, 0,05% SDS durante 2 horas a 250 mA. Após a transferência, a membrana foi submetida a um processo de bloqueio com PBS 1X, contendo 1%, BSA, durante uma noite sob agitação. O tampão de bloqueio foi descartado, a membrana foi lavada três vezes com PBS 1X e 0,1% Tween-20, em seguida, foi adicionado o anticorpo anti-EP24.15 (Proteimax, Brasil) diluído 1:1000 em PBS 1X e 0,1% Tween-20 sob agitação durante 4 horas. Após a incubação com anticorpo primário a membrana foi lavada com PBS 1X e 0,1% Tween-20. Foi adicionado o anticorpo secundário (anti-

coelho marcado com Alexa-Flúor 680, Invitrogen, Estados Unidos) diluído 1:10.000 em PBS 1X e 0,1% Tween-20. Após a incubação do anticorpo secundário por uma hora e meia a membrana foi lavada durante uma hora com PBS 1X e 0,1% Tween-20. As membranas foram escaneadas (Odyssey, Li-Cor Biosciences, Estados Unidos) usando filtros apropriados. Como controle endógeno utilizamos anti-GAPDH (Proteimax, Brasil) na diluição 1:3000 em PBS 1X e 0,1% Tween-20 sob agitação durante 4 horas. Após a incubação a membrana foi lavada com PBS 1X e 0,1% Tween-20. Foi adicionado 1:10.000 do anticorpo secundário (anti-coelho marcado com Alexa-Flúor 680, Invitrogen, Estados Unidos).

3.7 Análises estatísticas

A distribuição normal dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov ($P < 0,05$). Os resultados foram analisados através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$) seguido do teste de Mann-Whitney quando apropriado ($P < 0,01$). Os dados foram representados pela mediana e quartis inferiores e superiores. O programa STATISTICA 6.0 foi empregado para efetuar as análises.

4. RESULTADOS

4.1 Preparação e teste de substratos para as enzimas proteolíticas

Foram sintetizados e purificados em sistema HPLC os substratos para as enzimas ECA e EP24.15. Na figuras 2 e 3 estão os perfis de HPLC dos substratos peptídicos Abz-FRK(Dnp)P-OH e Abz-GFDPFRQ-EDDnp.

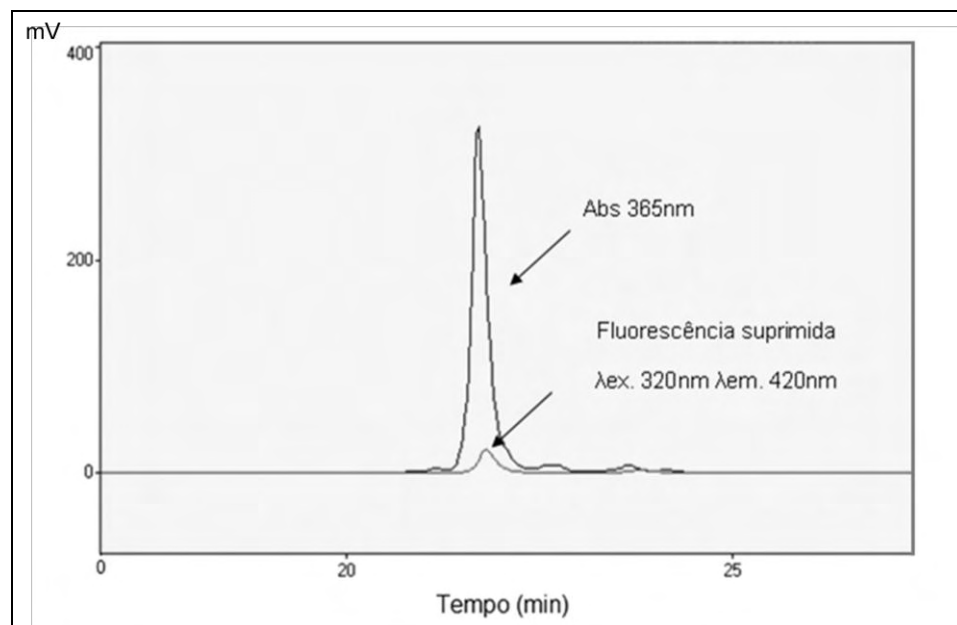


Figura 2. Perfil de HPLC do substrato fluorogênico Abz-FRK(Dnp)P-OH. Coluna Ultrasphere C-18 25cm, gradiente 0 a 90% solvente B em 30 min; solvente A: TFA 0,1% em água, solvente B: Metanol/água 9:1, TFA 0,1%; fluxo 1,0ml/min.

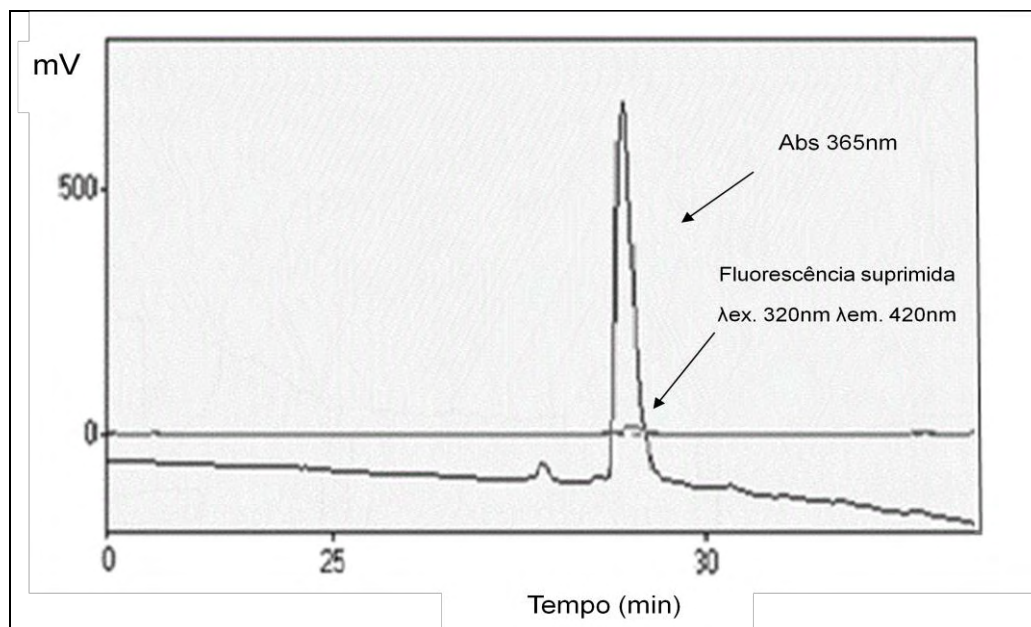


Figura 3. Perfil de HPLC do substrato fluorogênico Abz-GFDPFRQ-EDDnp. Coluna Ultrasphere C-18 25 cm, gradiente 0 a 90% solvente B em 30 min; solvente A: TFA 0,1% em água, solvente B: Metanol/água 9:1, TFA 0,1%; fluxo 1,0ml/min.

4.2 Hidrólise dos substratos por extratos de tecidos do SNC.

Combinando substratos e inibidores específicos avaliamos as atividades das enzimas ECA e EP24.15 no extrato total do hipotálamo de ratos controle como representado na figura 4.

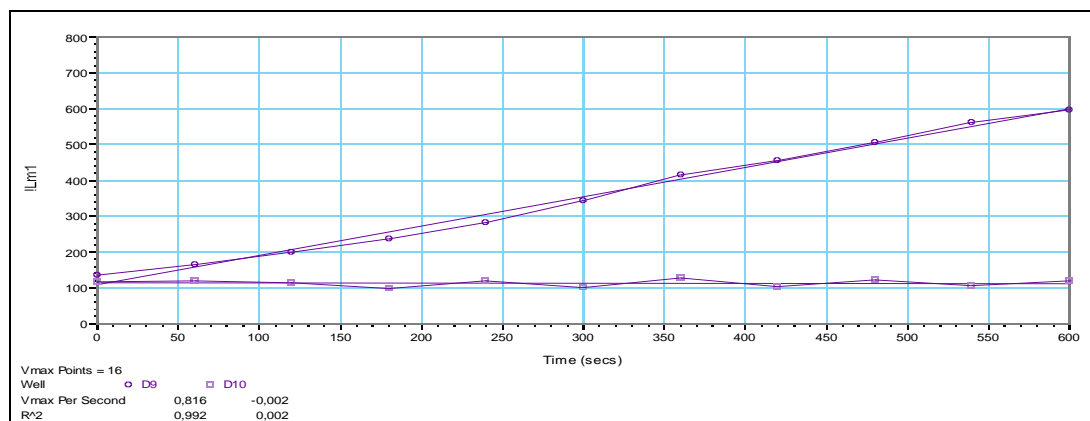


Figura 4. Leitura no fluorímetro após a incubação do substrato Abz-FRK(Dnp)P-OH com extrato total do hipotálamo de rato controle. Incubação de substrato 10 μ M com 20 μ l de extrato total do hipotálamo de rato controle, volume 200 μ l, 37°C, em tampão Tris-HCl 100 mM em pH 7.0, NaCl 100 mM e ZnCl₂ 10 μ M. Controle negativo nas mesmas condições contendo 0,5 μ M de lisinopril.

A figura 5 exemplifica o perfil em HPLC da incubação do substrato Abz-FRK(Dnp)P-OH com extrato obtido de hipotálamo de rato controle, após 2h de incubação a 37°C no tampão Tris 100 mM pH 7.0 contendo NaCl 100 mM e ZnCl₂ 10 μ M, utilizando 20 μ l do extrato feito com 3ml de tampão/g de tecido em 200 μ l finais de incubação.

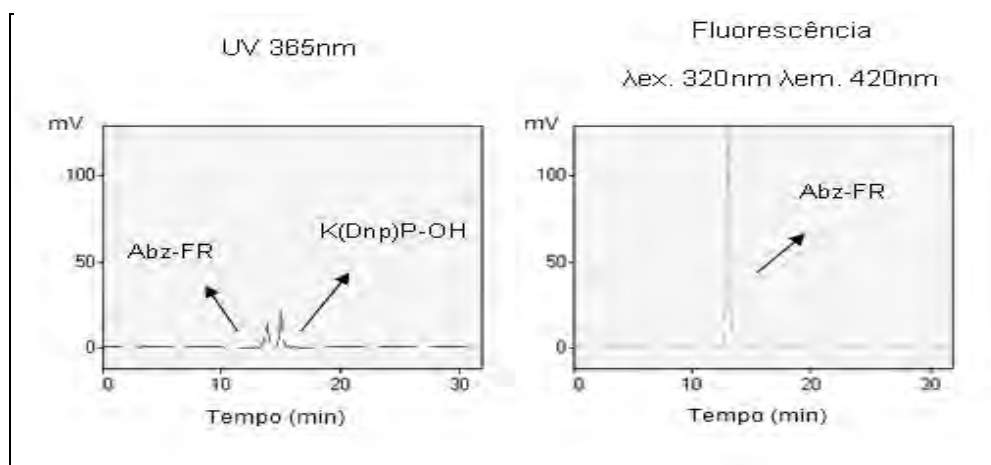


Figura 5. Produtos de hidrólise do substrato Abz-FRK(Dnp)P-OH após incubação

com extrato de hipotálamo.

A figura 6 representa a atividade da EP24.15 no extrato total do hipotálamo de ratos controles

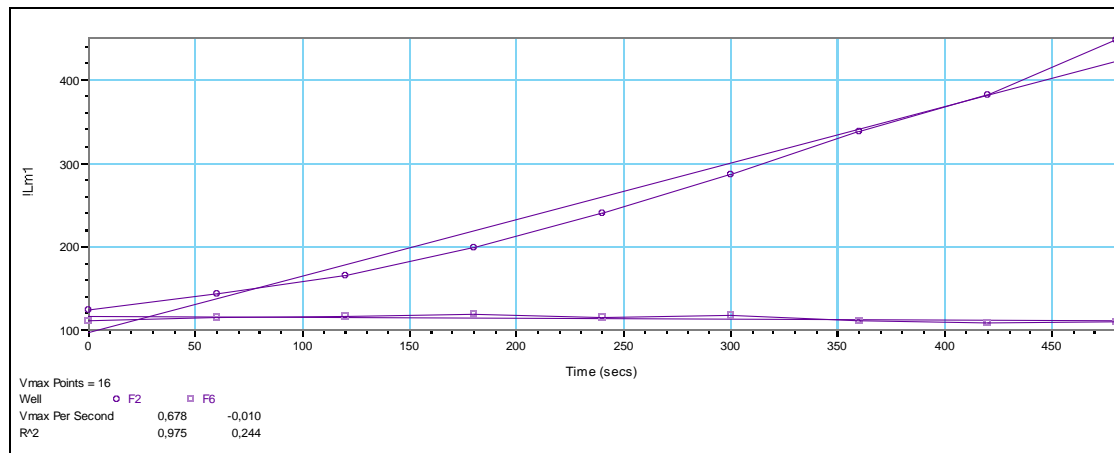


Figura 6. Leitura no fluorímetro após a incubação do substrato Abz-GFDPFRQ-EDDnp com extrato total do hipotálamo de rato controle. Incubação de substrato 10 μ M com 20 μ l de extrato total do hipotálamo de rato controle, volume 200 μ l, 37°C, em tampão Tris-HCl 50 mM em pH7.4 contendo NaCl 100 mM. Controle negativo nas mesmas condições contendo 2 μ M de JÁ-2.

A adição do inibidor específico JA-2 como controle negativo apresentou valores de taxa de hidrólise próximos de zero, o mesmo que no controle de estabilidade (tampão + substrato). Quando a extração de proteínas é realizada utilizando um tampão de extração na proporção 1g de tecido para 3 ml de tampão, entre 2 e 20 μ l de extrato em 200 μ l de volume final de incubação em leitor de placas, são o suficiente para obter 10% de hidrólise em 10 a 20 minutos para todas amostras.

Nas figuras 7 e 8 estão representadas a atividade específica da ECA e EP24.15 para extratos totais de diferentes regiões do SNC de animais controle.

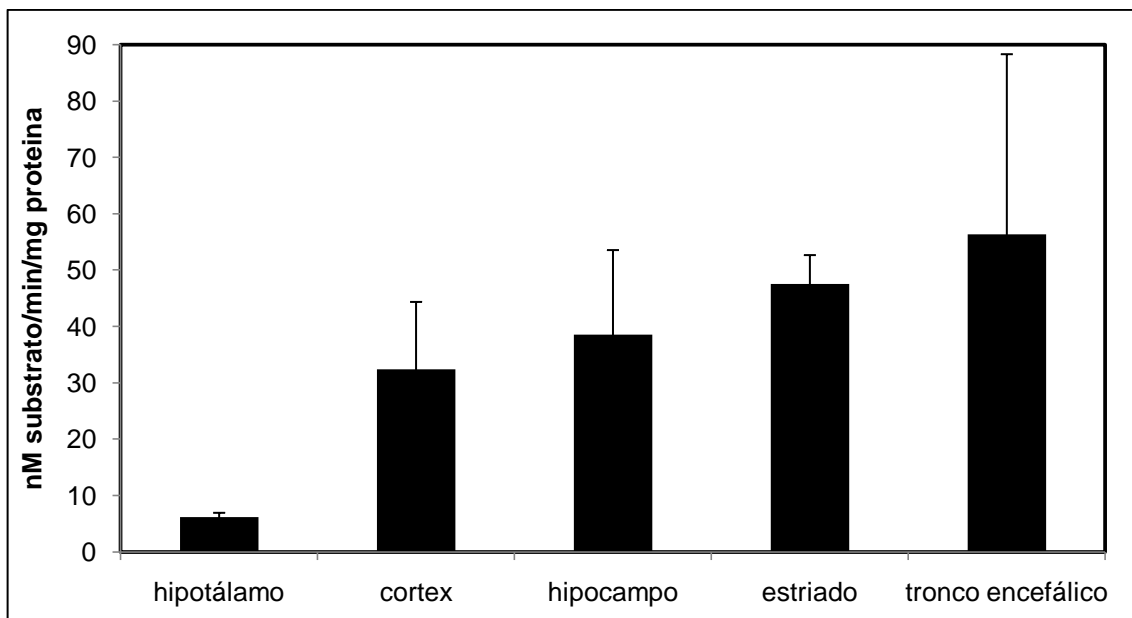


Figura 7. Atividade específica da ECA no extrato total do diferentes regiões do SNC. As barras representam à média e o desvio padrão.

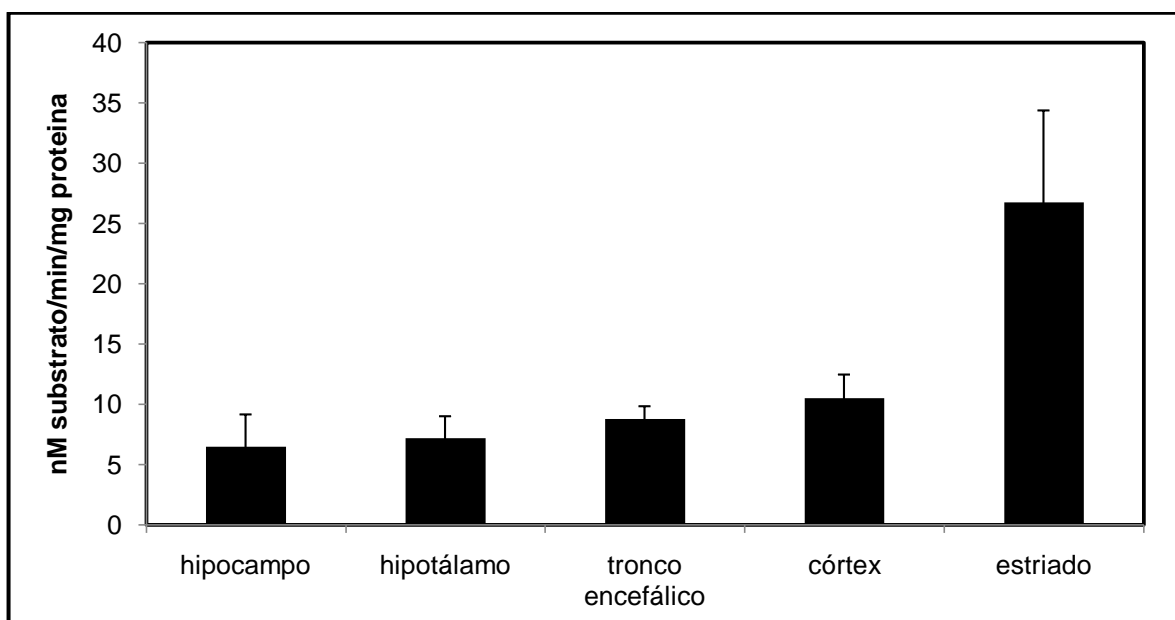


Figura 8. Atividade específica da EP24.15 no extrato total do diferentes regiões do SNC. As barras representam à média e o desvio padrão.

4.3 Atividade e expressão gênica da ECA nos tecidos do SNC

A figura 9 apresenta as medianas e intervalos interquartílicos dos valores de expressão gênica e atividade específica da ECA no extrato de hipotálamo.

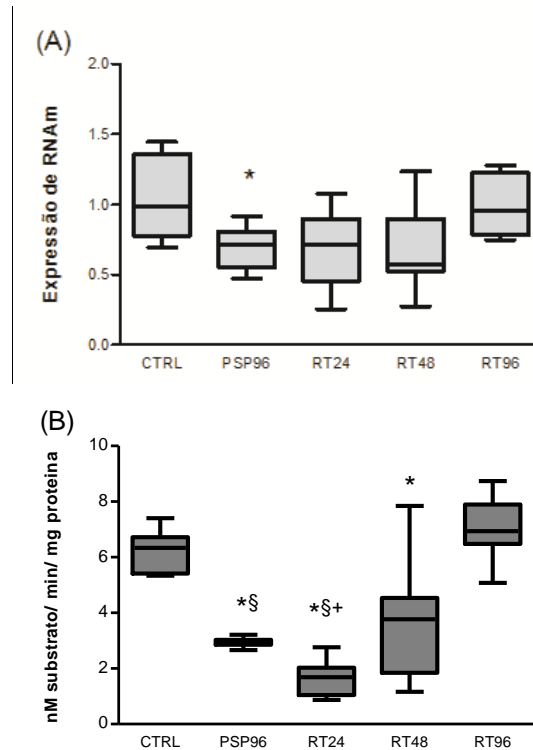


Figura 9. Representação *Box plot* dos níveis de RNAm e atividade da ECA no extrato total do hipotálamo. (A) níveis de RNAm (B) atividade enzimática. Grupo controle (CTRL), privação de sono paradoxal por 96h (PSP96), grupos período rebote 24 horas (RT24), período rebote 48 horas (RT48) e período rebote por 96 horas (RT96). A mediana está representada pela barra horizontal. (A) * diferente do RT96 ($P < 0,005$). (B) * diferente do CTRL ($P < 0,005$), § diferente do RT96 ($P < 0,001$) e + diferente do RT24 ($P < 0,01$).

Os valores para o hipotálamo estão apresentados nas figuras 9A e 9B e ambos os parâmetros mostram perfis semelhantes. Uma redução estatisticamente significativa é atingida em PSP96 ($P < 0,005$) quando comparada com RT96 nos níveis de RNAm (figura 9A). Encontrou-se uma redução da atividade em PSP96 e RT24 ($P < 0,005$) em

relação aos valores do controle (figura 9B), essas mudanças só foram completamente revertidas após 96h de sono voluntário.

A figura 10 apresenta as medianas e intervalos interquartílicos dos valores de expressão gênica (figura 10A) e atividade da ECA (figura 10B) no extrato total do córtex nos grupos controle, PSP96 e nos rebotes 24h, 48h e 96h. Esses dados não mostraram diferenças estatísticas comparada ao controle.

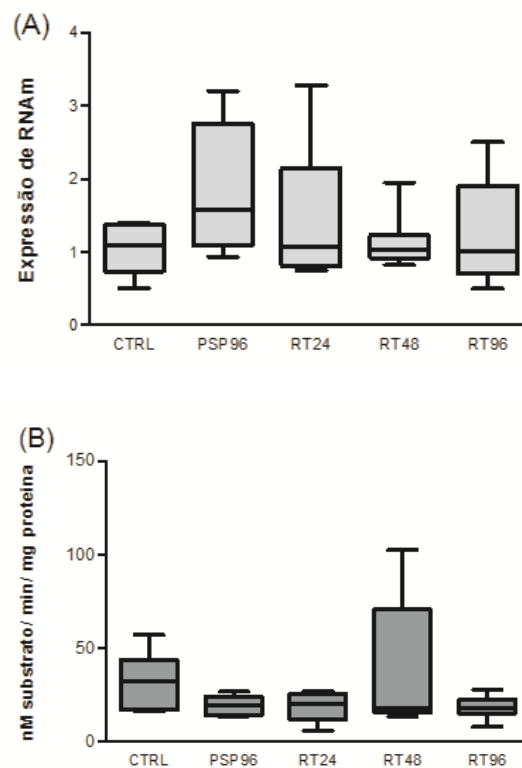


Figura 10. Representação *Box plot* dos níveis de *RNAm* e atividade da *ECA* no extrato total do córtex. (A) níveis de *RNAm* (B) atividade enzimática. Grupo controle (CTRL), Privação de sono paradoxal por 96h (PSP96), grupos período rebote 24 horas (RT24), período rebote 48 horas (RT48) e período rebote por 96 horas (RT96). A mediana está representada pela barra horizontal. Os níveis de *RNAm* ($P=0,06$) e atividade da *ECA* ($p=0,07$) no córtex não encontramos diferenças estatísticas comparada ao controle.

A figura 11 apresenta as medianas e intervalos interquartílicos dos valores de atividade da ECA no extrato total do hipocampo nos grupos controle, privação de sono e rebotes 24h, 48h e 96h.

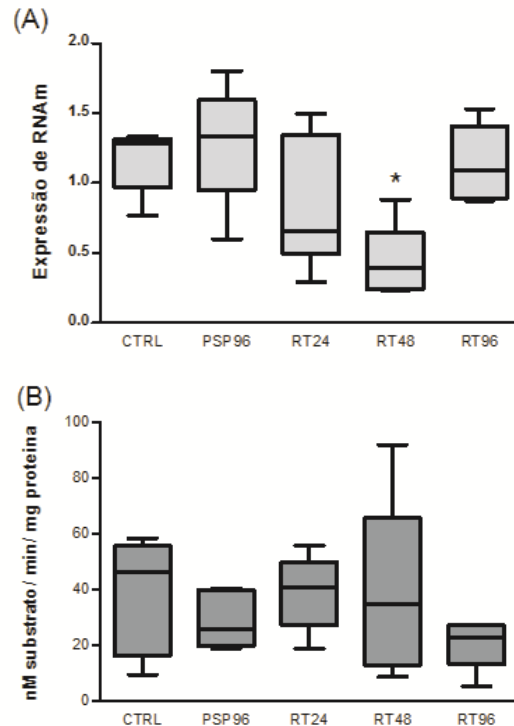


Figura 11. Representação *Box plot* dos níveis de RNAm e atividade da ECA no extrato total do hipocampo. (A) níveis de RNAm (B) atividade enzimática. Grupo controle (CTRL), privação de sono paradoxal por 96h (PSP96), grupos período rebote 24 horas (RT24), período rebote 48 horas (RT48) e período rebote por 96 horas (RT96). A mediana está representada pela barra horizontal. (A) * diferente do RT96 ($P < 0,01$).

Os valores para o hipocampo são apresentados nas figuras 11A e 11B, uma redução estatisticamente significativa é atingida em RT48 ($P < 0,01$) quando comparada com RT96 nos níveis de RNAm (figura 11A), essa variação foi revertidas após 96h de sono voluntário.

A figura 12 apresenta as medianas e intervalos interquartílicos dos valores de

atividade da ECA no extrato total do tronco encefálico nos grupos controle, privação de sono e rebotes 24h, 48h e 96h.

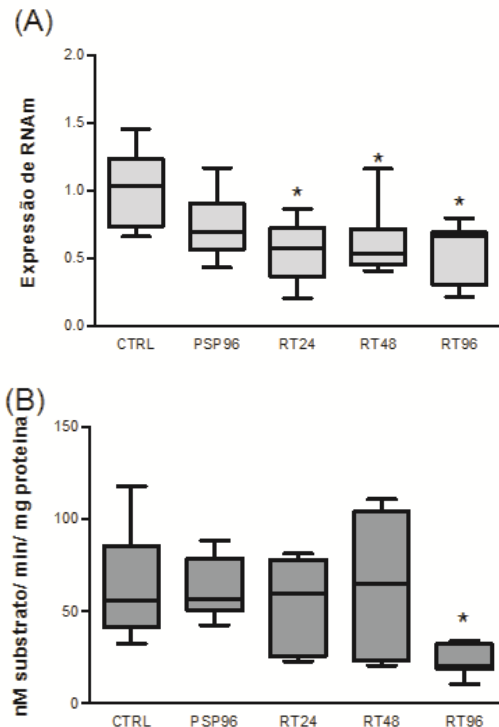


Figura 12. Representação *Box plot* dos níveis de RNAm e atividade da ECA no extrato total do tronco encefálico. (A) níveis de RNAm (B) atividade enzimática. Grupo controle (CTRL), privação de sono paradoxal por 96h (PSP96), grupos período rebote 24 horas (RT24), período rebote 48 horas (RT48) e período rebote por 96 horas (RT96). A mediana está representada pela barra horizontal. (A) * diferente do CTRL ($P < 0,01$). (B) * diferente do CTRL, PSP96, RT24h e RT48 ($P < 0,01$).

Os valores para o tronco encefálico estão apresentados nas figuras 12A e 12B, ambos os parâmetros mostram perfis semelhantes. Uma redução estatisticamente significativa é atingida em RT24, RT48 e RT96 ($P < 0,01$) quando comparada com CTRL nos níveis de RNAm (figura 12A). Encontrou-se uma redução da atividade da ECA em RT96 ($P < 0,01$) em relação aos valores do controle, PSP96, RT24 e RT48 (figura 12B).

A figura 13 apresenta as medianas e intervalos interquartílicos dos valores de atividade da ECA no extrato total do estriado dos grupos controle, privação de sono e rebotes 24h, 48h e 96h.

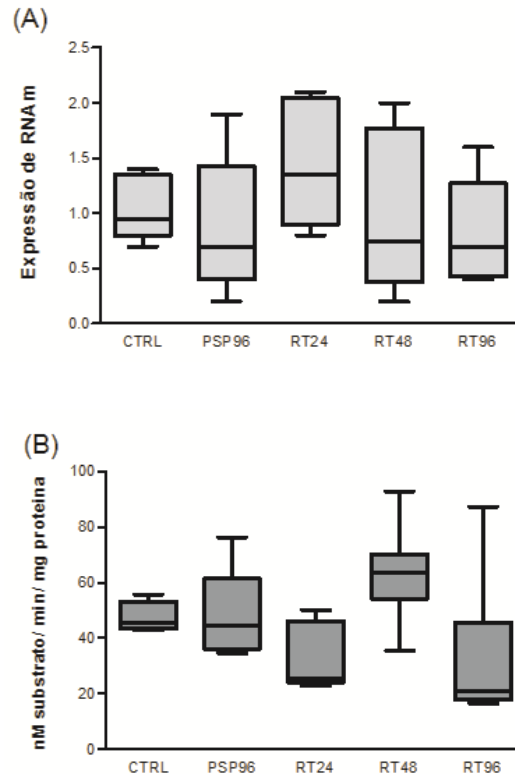


Figura 13. Representação *Box plot* dos níveis de *RNA*m e atividade da ECA no extrato total do estriado. (A) níveis de *RNA*m (B) atividade enzimática. Grupo controle (CTRL), Privação de sono paradoxal por 96h (PSP96), grupos período rebote 24 horas (RT24), período rebote 48 horas (RT48) e período rebote por 96 horas (RT96). A mediana está representada pela barra horizontal. Os níveis de *RNA*m ($P=0,31$) e atividade da ECA ($P=0,06$) no estriado não encontramos diferenças estatísticas comparada ao controle.

A figura 13 apresenta as medianas e intervalos interquartílicos dos valores de expressão gênica (figura 13A) e atividade da ECA (figura 13B) no extrato total do estriado nos grupos controle, PSP96 e nos rebotes 24h, 48h e 96h. Esses dados não

mostraram diferenças estatísticas comparada ao controle.

4.4 Atividades e expressão gênica da EP24.15 nos tecidos do SNC

A figura 14 apresenta as medianas e intervalos interquartílicos dos níveis de RNAm, expressão e atividade da EP24.15 no extrato total do hipotálamo.

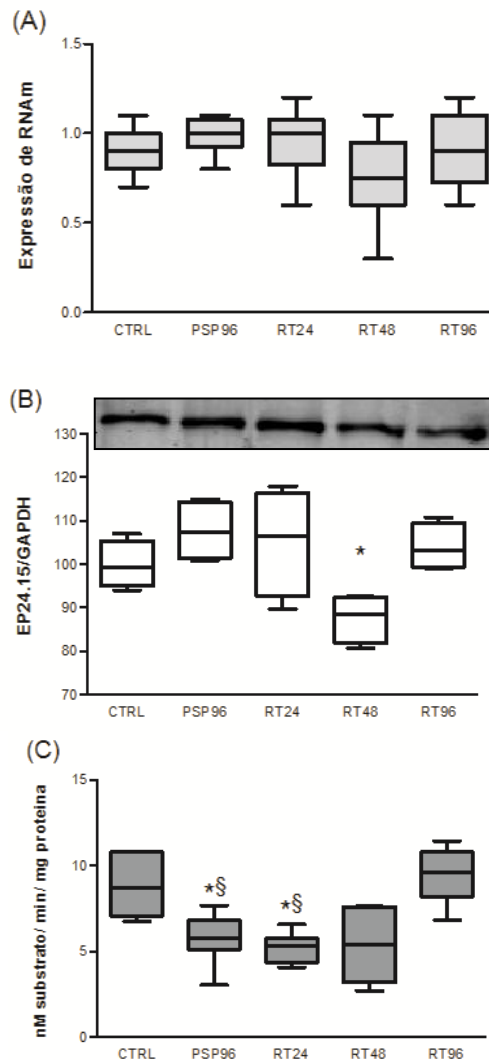


Figura 14. Representação *Box plot* dos níveis de *RNAm*, expressão e atividade da EP24.15 extrato total do hipotálamo. (A) níveis de *RNAm* (B) níveis de proteínas (C) atividade enzimática. Grupo controle (CTRL), grupos privação de sono paradoxal por 96h (PSP96), grupos período rebote 24 horas

(RT24), período rebote 48 horas (RT48) e período rebote por 96 horas (RT96). A mediana está representada pela barra horizontal. (A) não encontramos diferenças significativas ($P=0,06$). (B) * diferente do RT96 ($P<0,001$). (C) * diferente do CTRL ($P<0,001$) e § diferente do RT96 ($P<0,005$).

Nos níveis de RNAm do hipotálamo não foram encontradas diferenças significativas $P=0,06$ (figura 14A). Uma redução estatisticamente significativa foi atingida em RT48 ($P<0,001$) quando comparada com RT96 nos níveis de proteínas (figura 14B). Encontrou-se uma redução da atividade em PSP96 e RT24 ($P<0,001$) em relação aos valores do controle e rebote 96 horas (figura 14C).

A figura 15 apresenta as medianas e intervalos interquartílicos dos níveis de RNAm (figura 15A), expressão (figura 15B) e atividade (figura 15B) no córtex nos grupos controle, PSP96 e nos rebotes 24h, 48h e 96h.

Nos níveis de RNAm do córtex não foram encontradas diferenças significativas $P=0,24$ (figura 15A). Uma redução estatisticamente significativa é atingida em PSP96 ($P<0,01$) quando comparada com RT96 nos níveis de proteínas (figura 15B). Encontrou-se redução da atividade em PSP96 e RT24 ($P<0,005$) em relação aos valores do controle e rebote 96 horas (figura 15C).

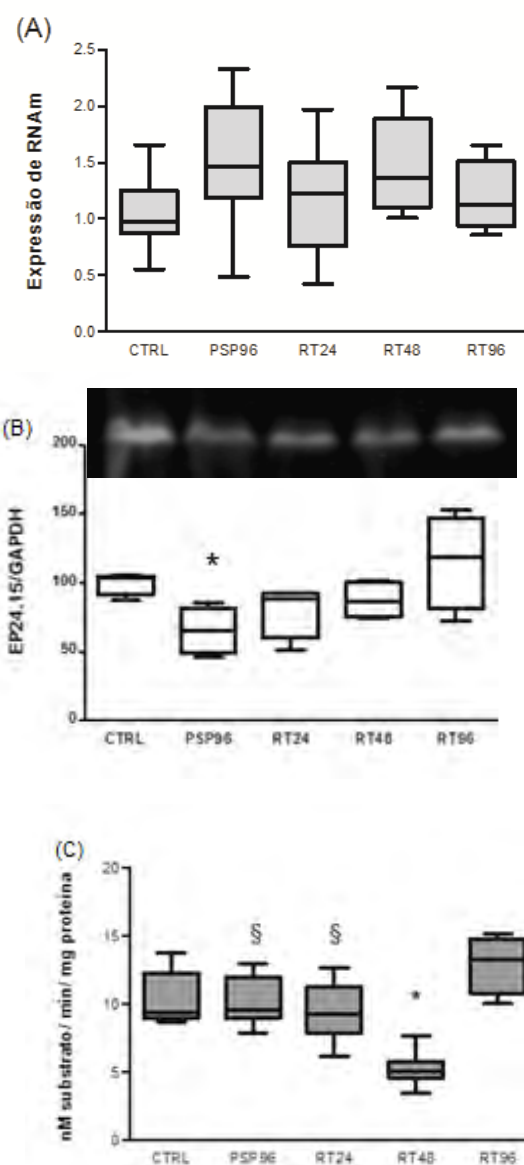


Figura 15. Representação *Box plot* dos níveis de *RNAm*, expressão e atividade da EP24.15 no extrato total do córtex. (A) níveis de RNAm (B) níveis de proteínas e (C) atividade enzimática. Grupo controle (CTRL), grupos privação de sono paradoxal por 96h (PSP96), grupos período rebote 24 horas (RT24), período rebote 48 horas (RT48) e período rebote por 96 horas (RT96). A mediana está representada pela barra horizontal. (A) não encontramos diferenças significativas ($P=0,24$). (B) * diferente do CTRL ($P<0,01$). (C) * diferente do CTRL, PSP96, RT24 e RT96 ($p<0,005$) e § diferente RT96 ($p<0,01$).

A figura 16 apresenta as medianas e intervalos interquartílicos dos valores de expressão gênica (figura 16A), níveis de proteína (figura 16B) e atividade da EP24.15 (figura 16C) no hipocampo dos grupos controle, PSP96 e nos rebotes 24h, 48h e 96h.

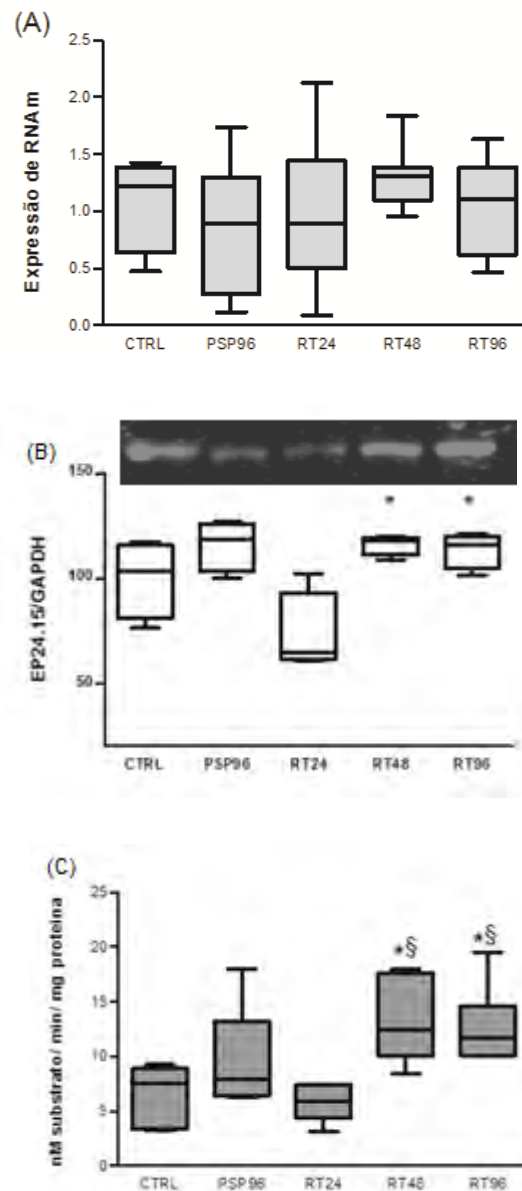


Figura 16. Representação *Box plot* dos níveis de *RNAm*, expressão e atividade da EP24.15 no extrato total do hipocampo. (A) níveis de *RNAm*, (B) níveis

de proteínas e (C) atividade enzimática. Grupo controle (CTRL), grupos privação de sono paradoxal por 96h (PSP96), grupos período rebote 24 horas (RT24), período rebote 48 horas (RT48) e período rebote por 96 horas (RT96). A mediana está representada pela barra horizontal. (A) não encontramos diferenças significativas ($P=0,51$). (B) * diferente do CTRL ($P<0,01$). (C) * diferente do CTRL $P<0,005$ e § diferente do RT24 $P<0,005$).

Os valores para o hipocampo estão apresentados nas figuras 16A, 16B e 16C. Os parâmetros dos níveis de proteína e atividade da EP24.15 mostram perfis semelhantes. Um aumento estatisticamente significativo é atingido em RT48 e RT96 ($P<0,01$) quando comparada com CTRL nos níveis de proteína (figura 16B). Encontrou-se um aumento da atividade em RT48 e RT96 ($P <0,005$) em relação aos valores do controle e RT24 (figura 16C).

A figura 17 apresenta as medianas e intervalos interquartílicos dos valores de expressão gênica (figura 17A), níveis de proteína (figura 17B) e atividade enzimática (figura 17C) da EP24.15 no tronco encefálico nos grupos controle, PSP96 e nos rebotes 24h, 48h e 96h.

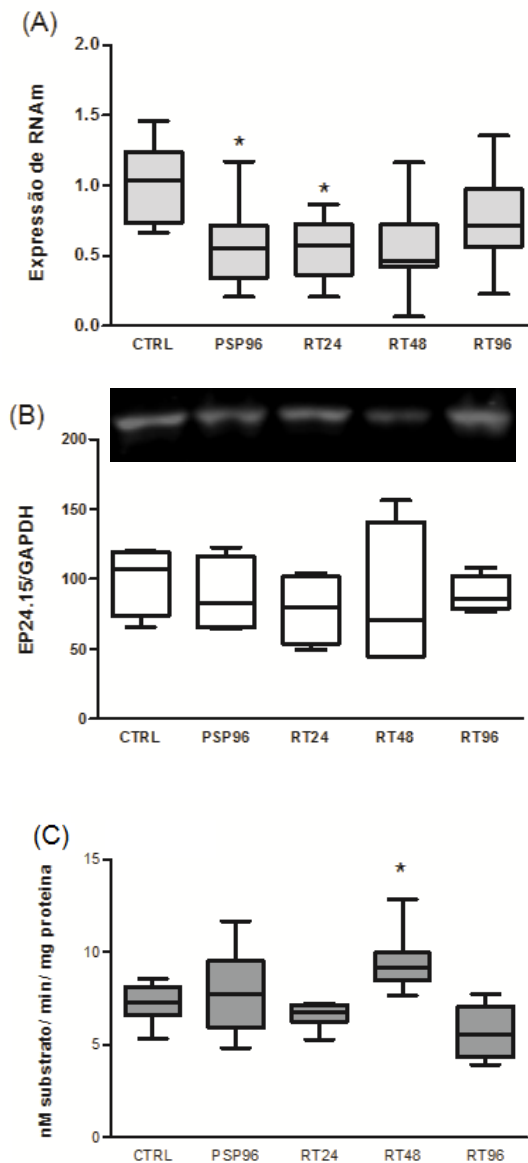


Figura 17. Representação *Box plot* dos níveis de *RNAm*, expressão e atividade da EP24.15 no extrato total do tronco encefálico. (A) níveis de *RNAm*, (B) níveis de proteínas e (C) atividade enzimática. Grupo controle (CTRL), Privação de sono paradoxal por 96h (PSP96), grupos período rebote 24 horas (RT24), período rebote 48 horas (RT48) e período rebote por 96 horas (RT96). A mediana está representada pela barra horizontal. (A) * diferente do CTRL ($P < 0,001$). (B) não encontramos diferenças significativas $P = 0,91$. (C) * diferente do CTRL RT24, RT96 $P < 0,001$).

A figura 18 apresenta as medianas e intervalos interquartílicos dos valores de expressão gênica (figura 18A), níveis de proteína (figura 18B) e atividade enzimática (figura 18C) da EP24.15 no extrato total do estriado nos grupos controle, PSP96 e nos rebotes 24h, 48h e 96h.

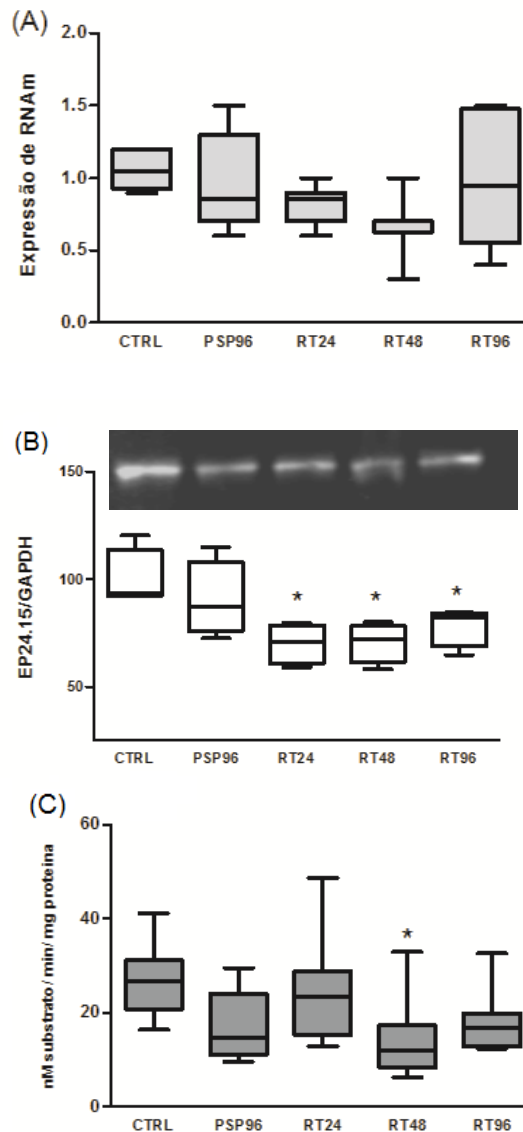


Figura 18. Representação *Box plot* dos níveis de *RNAm*, expressão e atividade da EP24.15 no extrato total do estriado. (A) níveis de *RNAm*, (B) níveis de proteínas e (C) atividade enzimática. Grupo controle (CTRL), Privação de sono paradoxal por 96h (PSP96), grupos período rebote 24 horas (RT24),

período rebote 48 horas (RT48) e período rebote por 96 horas (RT96). A mediana está representada pela barra horizontal. (A) não encontramos diferenças significativas ($P=0,11$). (B) * diferente do CTRL ($P<0,001$). (C) * diferente do CTRL ($P<0,01$).

Os valores do estriado estão apresentados nas figuras 18A, 18B e 18C. Os parâmetros dos níveis de proteína e atividade da EP24.15 mostram perfis semelhantes. Uma diminuição estatisticamente significativa é atingido em RT24, RT48 e RT96 ($P<0,001$) quando comparad com CTRL nos níveis de proteína (figura 18B). Encontrou-se uma diminuição da atividade em RT48 ($P <0,01$) em relação aos valores do controle (figura 18C).

5. DISCUSSÃO

Nossos resultados em animais controle mostram que é possível determinar a atividade de enzimas processadoras de neuropeptídeos em extratos totais de tecido originados de hipotálamo, hipocampo, tronco encefálico e córtex de ratos, utilizando-se substratos e inibidores seletivos, RT-PCR e *Western Blot*, procuramos determinar se uma menor expressão gênica ou modificações pós-traducionais poderiam justificar as mudanças de atividade enzimática observadas.

A proposta da dissertação foi encontrarmos evidências de alteração em atividades proteolíticas importantes no processamento de neuropeptídeos. Consideramos que esse objetivo inicial foi alcançado. As alterações na expressão e atividade da ECA e da EP24.15, nos modelos de privação de sono paradoxal, são uma contribuição original na área. Mostramos uma redução na atividade enzimática e expressão gênica da ECA no hipotálamo dos animais submetidos à privação de sono paradoxal, quando comparados com os animais do grupo controle. Os resultados mostraram uma lenta recuperação da atividade da ECA nos grupos rebotes de 24 e 48 horas. No grupo rebote 96h verificamos o retorno da atividade e da expressão da ECA aos mesmos níveis do grupo controle (figura 9). No momento, em continuação a esses achados, nossa hipótese de trabalho é que a redução na expressão gênica e atividade da ECA levariam a uma menor formação de Ang II e de seus fragmentos. No hipotálamo, especificamente, estas alterações podem estar na origem de vários efeitos cardiovasculares e prejuízo de cognição e memória observadas na privação de sono

paradoxal.

Tem sido demonstrado que a privação do sono é um fator de estresse, provocando modificações no eixo HPA que podem permanecer além do período de privação (MEERLO *et al.* 2002;SUCHECKI *et al.* 2002;SGOIFO *et al.* 2006;MEERLO *et al.* 2008;GALVAO *et al.* 2009). Como Ang II é um efector essencial nesta resposta ao estresse, é bastante razoável supor que a redução da atividade da ECA na PSP e durante o período de recuperação poderia estar envolvida na resposta alterado ao estresse incluindo alterações cardiovasculares como na freqüência cardíaca e força cardíaca (MEERLO *et al.* 2008;VAARA *et al.* 2009).

Em ratos machos, foi demonstrado que PSP por 96 horas induz uma redução significativa nos níveis plasmáticos de testosterona e estrona (ANDERSEN *et al.* 2005). Parece haver uma correlação temporal entre retorno aos níveis basais destes hormônios e o retorno observado para a atividade da ECA no hipotálamo como foi mostrado no presente trabalho. Além disso, os níveis de prolactina também foram elevados em PSP (ANDERSEN *et al.* 2005). Em ratos machos, submetidos a um modelo de estresse de imobilização, a administração ICV de antagonista do receptor de angiotensina, induziu um aumento de quatro vezes nos níveis séricos de prolactina, quando comparados aos controles (MYERS and STEELE 1991). Estes resultados sugerem que o estresse está associado à PSP e que a redução da atividade da ECA no hipotálamo pode ser responsável pelo aumento dos níveis de prolactina como foi observado por Andersen e colaboradores.

Estudos mostram que a Ang II é responsável por suprimir a ingestão de

alimentos, provavelmente pelos receptores AT₂ (PORTER and POTRATZ 2004;OHINATA *et al.* 2008). Administração de inibidor da ECA promove aumento do consumo calórico e redução de massa corpórea (SANTOS *et al.* 2008b). Nesse sentido, a hiperfagia e redução de peso corporal observada durante a PSP (HIPOLIDE *et al.* 2006;KOBAN *et al.* 2006;KOBAN *et al.* 2008) também é um efeito que pode estar relacionado à redução na disponibilidade de Ang II.

Administração de Ang II na área mediana pré-óptica de ratas ovariectomizadas induz a um forte aumento na liberação de hormônio luteinizante (LH), provavelmente através da secreção de GnRH (FRANCI *et al.* 1990). Os efeitos são revertidos pelo antagonista do receptor AT₁ o losartan. Outras evidências indicam que a Ang II é um fator importante na regulação central de hormônios sexuais (GANONG 1995). Alterações nos hormônios sexuais durante a PSP (ANDERSEN *et al.* 2005) podem estar relacionadas a mudança da atividade da ECA como foi observado em nosso trabalho. Redução na formação de Ang II irá provavelmente resultar em redução da liberação de GnRH, menos LH e FSH e, finalmente, menos testosterona e estrona.

Ang IV tem demonstrado ser importante na memória e processos de aprendizagem (BRASZKO 2006;WRIGHT *et al.* 2008) e ambas as funções estão afetadas na PSP em ratos (SILVA *et al.* 2004;ALVARENGA *et al.* 2008). É possível que a diminuição da atividade da ECA leve a menos formação de Ang II e conseqüentemente Ang IV, o que poderia explicar a memória prejudicada nos ratos privados de sono.

A bradicinina é um substrato clássico inativado pela ECA, com um papel central

nos processos inflamatórios, a percepção da dor, função imune e vascularização. Peptídeos opióides, como as endorfinas e encefalinas, são substratos da ECA cuja dinâmica é provavelmente alterada por mudanças na atividade da enzima, com conseqüências na percepção da dor (AKAHORI *et al.* 2008).

A ECA por atuar como uma molécula sinalizadora na membrana celular (FLEMING *et al.* 2006;FLEMING 2006) permite concluir que a ausência da proteína, devido a uma expressão reduzida, deverá ter conseqüências muito além do seu efeito catalisador na formação de Ang II. Essas conseqüências, ainda a serem abordadas, devem ser completamente diferentes de sua simples inibição por inibidores da ECA.

Encontramos também uma diminuição da atividade da EP24.15 no hipotálamo (figura 14) e no córtex (Figura 15) dos animais submetidos à privação de sono paradoxal. No grupo RT96 ocorre o retorno da atividade da enzima aos mesmos níveis do grupo controle. Entretanto, ao contrário da ECA, a expressão gênica da enzima EP24.15 no hipotálamo e córtex, determinada por RT-PCR, não apresentou diferenças significativas entre os grupos experimentais e o controle.

No caso da EP24.15 várias evidências indicam que, no hipotálamo, sua principal função fisiológica é a inativação do nonapeptídeo GnRH e a geração do GnRH1-5, como foi mostrado em estudos *in vivo* e *in vitro* (MOLINEAUX *et al.* 1988b;WU *et al.* 1997;WU *et al.* 2005;ROBERTS *et al.* 2007;WU *et al.* 2009) O fragmento 1-5 do GnRH, gerado pela EP24.15, é muito importante no estímulo da síntese do próprio GnRH, após a remoção do C-terminal de Gly-NH₂ por uma prolil- peptidase (EC.3.4.21.26) (LEW *et al.* 1994). A EP24.15 pode ser fosforilada pela ação da proteína kinase A (PKA)

podendo levar a diminuição da atividade, sugerindo que a fosforilação é um regulador fisiológico da EP24.15 (TULLAI *et al.* 2000). Shaila K. Mani, em um artigo de revisão descreveu que a progesterona pode aumentar a atividade da PKA em ratos machos (MANI 2006). Andersen e colaboradores mostraram que a PSP96 promove aumento nos níveis de progesterona em ratos. A nossa hipótese atual é que o aumento de progesterona, na PSP, aumentaria a fosforilação e reduziria a atividade da EP24.15 no hipotálamo e conseqüentemente aumento na disponibilidade do peptídeo GnRH1-9. O GnRH1-9 pode regular negativamente a sua própria expressão através de um loop *ultrashoort feedback* (PIVA *et al.* 2004;WU *et al.* 2009). A privação de sono paradoxal reduziria os níveis de GnRH através do mecanismo de auto-inibição, de forma indireta, levaria a diminuição nos hormônio LH e FSH e a redução dos níveis de testosterona como demonstrado por Andersen e colaboradores em 2004 e 2005 (Figura 19) (ANDERSEN *et al.* 2004a;ANDERSEN *et al.* 2005).

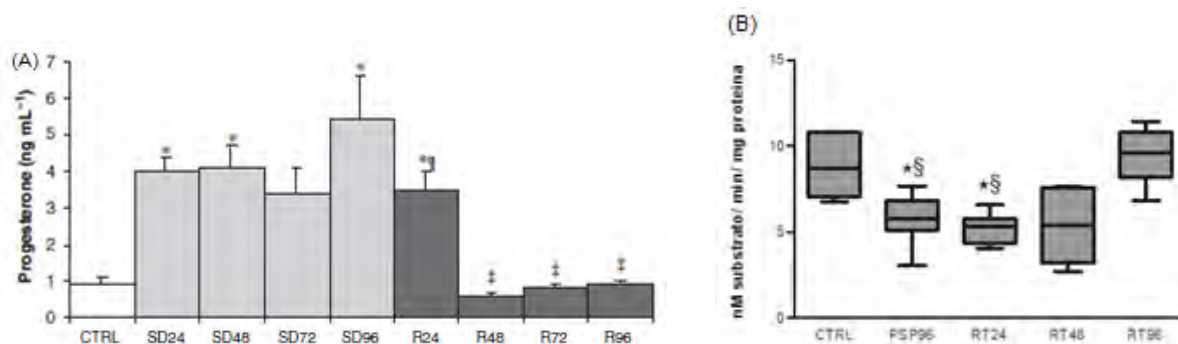


Figura 19. Comparação dos níveis sérico de progesterona e os dados atividade da EP24.15 no extrato de hipotálamo total. (A) Modificada (ANDERSEN *et al.* 2005). Grupos controle (CTRL), privação de sono paradoxal por 24h (SD24), privação de sono paradoxal por 48h (SD48), privação de sono paradoxal por 72h (SD72) e privação de sono paradoxal por 96h (SD96). Grupos período rebote 24 horas (R24), período rebote 48 horas (R48), período rebote 72 horas (R72) e período rebote por 96 horas (R96). Estão

representadas as médias e \pm SEM. * diferente do CTRL, diferente do SD96 e diferente do R48 e R96. (B) atividade da EP 24.15 no extrato total de hipotálamo * diferente do PSP96 e RT24 ($P < 0,005$) e [§] diferente do RT96 ($P < 0,005$).

Portanto estamos supondo que na ausência da atividade enzimática esse o fragmento GnRH 1-5 que estimula a síntese de GnRH não se forma e adicionalmente aumento dos níveis de GnRH inibem a sua própria síntese. Em tese, esse fenômeno poderia explicar as variações de níveis de hormônios sexuais. Por essa razão serão realizados experimentos para quantificação da EP24.15 fosforilada e não fosforilada por *Western Blotting* bem como a padronização dos métodos de imuno-histoquímica para localizar a enzima no hipotálamo.

EP24.15 participa do metabolismo de peptídeos opióides endógenos (dinorfina _{A1-8}; β -neoendorfina, Met-encefalina-Arg-Gly-Leu) (ACKER *et al.* 1987), nociceptina/orfanina (MONTIEL *et al.* 1997) e neurotensina (SKIDGEL and ERDOS 2004) afetando nocicepção (SHRIMPTON and SMITH 2000). Privação de sono paradoxal por 96h diminuiu os limiares nociceptivos, sugerindo que a PSP promove uma ação de hiperalgesia (LAUTENBACHER *et al.* 2006). Esse efeito é revertido quando administrado inibidor de encefalinase, promovendo efeito anti-nociceptivo (UKPONMWAN *et al.* 1984; LAUTENBACHER *et al.* 2006). Foi demonstrado que o aumento da nocicepção observado na PSP não se deve a variações na densidade de receptores μ -opióide (NASCIMENTO *et al.* 2007). Conforme mostrado por Onen e colaboradores após períodos de 72h e 96h de PSP ocorre aumento da nocicepção que leva mais de 24 horas para voltar aos valores de controle. Em contraste até mesmo um efeito analgésico pode ser detectado após 48h de recuperação do sono (ONEN *et al.*

2000;ONEN *et al.* 2001). Conforme observado na figura 14 verificamos uma redução na atividade da EP24.15, significativo entre RT24 e RT48 no córtex e um aumento significativo também foi observado em RT48 e RT96 no hipocampo (figura 15). Estes resultados são bastante paralelos às mudanças de nocicepção observadas em ratos e em seres humanos (ONEN *et al.* 2000;ONEN *et al.* 2001). A diminuição da EP24.15 seria responsável por uma menor produção de encefalinas e aumento da nocicepção. Esses resultados poderiam explicar por que a inibição da encefalinase não reverte o aumento de nocicepção induzido pela PSP (UKPONMWAN *et al.* 1984). Na ausência ou na diminuição de EP24.15 não haveria ou estaria diminuída formação de Met-encefalina a partir da dinorfina A 1-8. Além disso, nociceptina/orfanina seria menos hidrolisada e contribuiria para aumento de nocicepção (LAMBERT 2008). O oposto pode ser esperado na RT96, onde foi observado um aumento da atividade EP24.15 no córtex e hipocampo. Onen e colaboradores, de fato, observaram efeito de anti-nocicepção em ratos e seres humanos após 48 horas de rebote, embora este efeito tenha sido relacionado à supressão do sono de ondas lentas e não ao sono paradoxal, sabe-se que cerca de 35% do sono de ondas lentas é diminuído no MPMM e poderia ser responsável por este efeito.

Os peptídeos opióides são essenciais no controle do tronco encefálico durante a respiração (LALLEY 2008). Pode-se especular que a privação de sono, a longo prazo, leve a variações do RNAm da EP24.15 e, finalmente, mudanças na expressão. O desequilíbrio resultante do metabolismo opióide no tronco encefálico pode estar relacionado com alterações das vias aéreas da SAOS. No estriado observou-se uma

correlação mais direta entre os níveis de RNAm, expressão e atividade enzimática (figura 18). Há uma tendência geral para redução dos três parâmetros até RT48. Novamente, as conseqüências teóricas desta mudança seriam um aumento nos níveis de dinorfina e diminuição de encefalinas no estriado. A complexa interação entre dopamina, receptores de dopamina e opióides no estriado (STEINER and GERFEN 1998;LENA *et al.* 2008;VOLKOW *et al.* 2009) exigiria uma análise mais detalhada dessas mudanças, principalmente um estudo imuno-histoquímico. A partir dos resultados atuais, não podemos dizer se as diferentes áreas do estriado são diferentemente afetadas. No entanto, é perfeitamente concebível que um aumento nas dinorfinas e uma diminuição na disponibilidade das encefalinas faça parte dos mecanismos compensatórios para a mudança dos receptores dopaminérgicos, principalmente receptor D2 em nível estriatal observada em PSP (TUFIK *et al.* 1978;NUNES and TUFIK 1994;TUFIK *et al.* 2009).

A privação do sono é conhecida por induzir profundas modificações fisiológicas em seres humanos e animais. Utilizamos um modelo animal de PSP para avaliar possíveis mudanças na expressão e atividade da ECA e EP24.15, enzimas proteolíticas conhecidas por estarem envolvidas no processamento de neuropeptídeos. Nossos resultados indicam que as mudanças da ECA e EP24.15 devem ser avaliadas pela determinação da atividade, expressão e RNAm e essas variações podem ser devidas a modificações pós-transacionais como fosforilação, glutationilação e estado redox da célula ou do meio extracelular (HOOK 2006;HOOK *et al.* 2008). Em tecidos diferentes do cérebro foram observadas mudanças na atividade da ECA e EP24.15, depois da

PSP e durante o período de recuperação do sono. Estas modificações podem estar relacionadas às alterações endócrinas, como processamento de GnRH no hipotálamo e sensibilidade à dor, devido ao processamento de peptídeos opióides. Essas observações certamente merecem experimentos mais detalhados para detectar os níveis de neuropeptídeos e as conseqüências da ausência da ECA e EP 24.15, em modelos *knockout*. A PSP indica claramente que essas peptidases podem ser agentes importantes na compreensão dos efeitos do sono.

6. CONCLUSÕES

1. Substratos com supressão intramolecular são ferramentas muito sensíveis para determinar atividade específica em regiões do SNC.
2. A PSP provoca modificações significativas nos níveis de RNA, expressão proteica e atividade proteolítica das enzimas ECA e EP24.15.
3. Estas modificações em tese levam a mudanças importantes no metabolismo de neuropeptídeos no sistema nervoso central.
4. Os efeitos da privação de sono paradoxal no sistema endócrino-reprodutor, metabolismo energético, memória e aprendizado, nociceptivo e resposta ao estresse e suas consequências cardiovasculares poderiam ser em parte explicados por esse desequilíbrio na geração e inativação de neuropeptídeos.

7. REFERÊNCIAS

ACHARYA KR, STURROCK ED, RIORDAN JF, EHLERS MR. Ace revisited: a new target for structure-based drug design. **Nat. Rev. Drug Discov.** v.2, n.11,p. 891-902, 2003.

ACKER GR, MOLINEAUX C, ORLOWSKI M. Synaptosomal Membrane-Bound Form of Endopeptidase-24.15 Generates Leu-Enkephalin from Dynorphin1-8, Alpha-Neuendorphin-Beta-Neoendorphin, and Met-Enkephalin from Met-Enkephalin-Arg6-Gly7-Leu8. **Journal of Neurochemistry** v.48, n.1,p. 284-292, 1987.

ADRIEN J. Neurobiological bases for the relation between sleep and depression. **Sleep Medicine Reviews** v.6, n.5,p. 341-351, 2002.

AKAHORI K, KOSAKA K, JIN XL, ARAI Y, YOSHIKAWA M, KOBAYASHI H, OKA T. Great increase in antinociceptive potency of [Leu(5)]enkephalin after peptidase inhibition. **Journal of Pharmacological Sciences** v.106, n.2,p. 295-300, 2008.

ALBRECHT D. Physiological and pathophysiological functions of different angiotensins in the brain. **British Journal of Pharmacology** v.159, n.7,p. 1392-1401, 2010.

ALVARENGA TA, PATTI CL, ANDERSEN ML, FRUSSA R, TUFIK S. Influence of Paradoxical Sleep Deprivation on Memory Consolidation Using Ethical Discriminative Avoidance Task in Young Adult Rats. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science** v.48, n.5,p. 630, 2009.

ALVARENGA TA, PATTI CL, ANDERSEN ML, SILVA RH, CALZAVARA MB, LOPEZ GB, FRUSSA-FILHO R, TUFIK S. Paradoxical sleep deprivation impairs acquisition, consolidation, and retrieval of a discriminative avoidance task in rats. **Neurobiol. Learn. Mem.** v.90, n.4,p. 624-632, 2008.

ALVES MF, ARAUJO MC, JULIANO MA, OLIVEIRA EM, KRIEGER JE, CASARINI DE, JULIANO L, CARMONA AK. A continuous fluorescent assay for the determination of plasma and tissue angiotensin I-converting enzyme activity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v.38, n.6,p. 861-868, 2005.

ANDERSEN ML, D'ALMEIDA V, KO GM, KAWAKAMI R, MARTINS PJF, MAGALHÃES LE, TUFIK S Ethical and practical principles of the use of laboratory animals. Experimental procedure. Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil, p. 45-69,2004

ANDERSEN ML, ALVARENGA TA, GUINDALINI C, PERRY JC, SILVA A, ZAGER A, TUFIK S. Paradoxical sleep deprivation influences sexual behavior in female rats. **J. Sex Med.** v.6, n.8,p. 2162-2172, 2009.

ANDERSEN ML, BIGNOTTO M, MACHADO RB, TUFIK S. Different stress modalities result in distinct steroid hormone responses by male rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v.37, n.6,p. 791-797, 2004a.

ANDERSEN ML, BIGNOTTO M, TUFIK S. Hormone treatment facilitates penile erection in castrated rats after sleep deprivation and cocaine. **J. Neuroendocrinol.** v.16, n.2,p. 154-159, 2004b.

ANDERSEN ML, MARTINS PJF, D'ALMEIDA V, BIGNOTTO M, TUFIK S. Endocrinological and catecholaminergic alterations during sleep deprivation and recovery in male rats. **Journal of Sleep Research** v.14, n.1,p. 83-90, 2005.

ANDERSEN ML, NASCIMENTO DC, MACHADO RB, ROIZENBLATT S, MOLDOFSKY H, TUFIK S. Sleep disturbance induced by substance P in mice. **Behavioural Brain Research** v.167, n.2,p. 212-218, 2006.

ANDERSEN ML, PALMA BD, RUEDA AD, TUFIK S. The effects of acute cocaine administration in paradoxical sleep-deprived rats. **Addiction Biology** v.5, n.4,p. 417-420, 2000.

ANTONIJEVIC IA, MURCK H, BOHLHALTER S, FRIEBOES RM, HOLSBOER F, STEIGER A. Neuropeptide Y promotes sleep and inhibits ACTH and cortisol release in young men. **Neuropharmacology** v.39, n.8,p. 1474-1481, 2000.

ARAUJO MC, MELO RL, CESARI MH, JULIANO MA, JULIANO L, CARMONA AK. Peptidase specificity characterization of C- and N-terminal catalytic sites of angiotensin I-converting enzyme. **Biochemistry** v.39, n.29,p. 8519-8525, 2000.

BACSA B, DESAI B, DIBO G, KAPPE CO. Rapid solid-phase peptide synthesis using thermal and controlled microwave irradiation. **Journal of Peptide Science** v.12, n.10,p. 633-638, 2006.

BADER M. Tissue Renin-Angiotensin-Aldosterone Systems: Targets for Pharmacological Therapy. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology** v.50,p. 439-465, 2010.

BHoola KD, FIGUEROA CD, WORTHY K. Bioregulation of Kinins - Kallikreins, Kininogens, and Kininases. **Pharmacological Reviews** v.44, n.1,p. 1-80, 1992.

BOHLEN UND HO, ALBRECHT D. The CNS renin-angiotensin system. **Cell Tissue Res.** v.326, n.2,p. 599-616, 2006.

BRADFORD MM. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry** v.72, n.1-2,p. 248-254, 1976.

BRASZKO JJ. D2 dopamine receptor blockade prevents cognitive effects of Ang IV and des-Phe6 Ang IV. **Physiol Behav.** v.88, n.1-2,p. 152-159, 2006.

CALEGARE BF, FERNANDES L, TUFIK S, D'ALMEIDA V. Biochemical, biometrical and behavioral changes in male offspring of sleep-deprived mice. **Psychoneuroendocrinology** v.35, n.5,p. 775-784, 2010.

CAMARGO ACM. Distinction Between Endo-Oligopeptidase-A (Ec 3.4.22.19) and Soluble Metalloendopeptidase (Ec 3.4.24.15). **Biochemical Journal** v.277,p. 294-295, 1991.

CAMARGO ACM, GRAEFF FG. Subcellular Distribution and Properties of Bradykinin Inactivation System in Rabbit Brain Homogenates. **Biochemical Pharmacology** v.18, n.2,p. 548-&, 1969.

CAPE EG, MANNS ID, ALONSO A, BEAUDET A, JONES BE. Neurotensin-induced bursting of cholinergic basal forebrain neurons promotes gamma and theta cortical activity together with waking and paradoxical sleep. **Journal of Neuroscience** v.20, n.22,p. 8452-8461, 2000.

CARMONA AK, JULIANO MA, JULIANO L. The use of Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) peptides for measurement of clinically important proteolytic enzymes. **Anais Da Academia Brasileira De Ciencias** v.81, n.3,p. 381-392, 2009.

CARMONA AK, SCHWAGER SL, JULIANO MA, JULIANO L, STURROCK ED. A continuous fluorescence resonance energy transfer angiotensin I-converting enzyme assay. **Nature Protocols** v.1, n.4,p. 1971-1976, 2006.

CARRENO FR, GONI CN, CASTRO LM, FERRO ES. 14-3-3 epsilon modulates the stimulated secretion of endopeptidase 24.15. **Journal of Neurochemistry** v.93, n.1,p. 10-25, 2005.

CHAGAS JR, JULIANO L, PRADO ES. Intramolecularly Quenched Fluorogenic Tetrapeptide Substrates for Tissue and Plasma Kallikreins. **Analytical Biochemistry** v.192, n.2,p. 419-425, 1991.

CHECLER F, VINCENT JP, KITABGI P. Degradation of Neurotensin by Rat-Brain Synaptic-Membranes - Involvement of A Thermolysin-Like Metalloendopeptidase (Enkephalinase), Angiotensin-Converting Enzyme, and Other Unidentified Peptidases. **Journal of Neurochemistry** v.41, n.2,p. 375-384, 1983.

CHEMELLI RM, WILLIE JT, SINTON CM, ELMQUIST JK, SCAMMELL T, LEE C, RICHARDSON JA, WILLIAMS SC, XIONG YM, KISANUKI Y, FITCH TE, NAKAZATO M, HAMMER RE, SAPER CB, YANAGISAWA M. Narcolepsy in orexin knockout mice: Molecular genetics of sleep regulation. **Cell** v.98, n.4,p. 437-451, 1999.

COHEN HB, DEMENT WC. Sleep: changes in threshold to electroconvulsive shock in rats after deprivation of "paradoxical" phase. **Science** v.150, n.701,p. 1318-1319, 1965.

D'ALMEIDA V, HIPOLIDE DC, AZZALIS LA, LOBO LL, JUNQUEIRA VB, TUFIK S. Absence of oxidative stress following paradoxical sleep deprivation in rats. **Neurosci. Lett.** v.235, n.1-2,p. 25-28, 1997.

D'ALMEIDA V, LOBO LL, HIPOLIDE DC, DE OLIVEIRA AC, NOBREGA JN, TUFIK S. Sleep deprivation induces brain region-specific decreases in glutathione levels. **Neuroreport** v.9, n.12,p. 2853-2856, 1998.

DE OLIVEIRA AC, D'ALMEIDA V, HIPOLIDE DC, NOBREGA JN, TUFIK S. Sleep deprivation reduces total plasma homocysteine levels in rats. **Can. J. Physiol Pharmacol.** v.80, n.3,p. 193-197, 2002.

DENDORFER A, VORDERMARK D, DOMINIAK P. Degradation of bradykinin by bovine tracheal epithelium and isolated epithelial cells. **British Journal of Pharmacology** v.120, n.1,p. 121-129, 1997.

DRAY A, PERKINS M. Bradykinin and Inflammatory Pain. **Trends in Neurosciences** v.16, n.3,p. 99-104, 1993.

EHLERS MR, FOX EA, STRYDOM DJ, RIORDAN JF. Molecular cloning of human testicular angiotensin-converting enzyme: the testis isozyme is identical to the C-terminal half of endothelial angiotensin-converting enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A** v.86, n.20,p. 7741-7745, 1989.

FISCHER-FERRARO C, NAHMOD VE, GOLDSTEIN DJ, FINKIELMAN S. Angiotensin and renin in rat and dog brain. **J. Exp. Med.** v.133, n.2,p. 353-361, 1971.

FLEMING I. Signaling by the angiotensin-converting enzyme. **Circulation Research** v.98, n.7,p. 887-896, 2006.

FLEMING I, KOHLSTEDT K, BUSSE R. The tissue renin-angiotensin system and intracellular signalling. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension** v.15, n.1,p. 8-13, 2006.

FONTENELE-NETO JD, MASSARELLI EE, GARRIDO PAG, BEAUDET A, FERRO ES. Comparative fine structural distribution of endopeptidase 24.15 (EC3.4.24.15) and 24.16 (EC3.4.24.16) in rat brain. **Journal of Comparative Neurology** v.438, n.4,p. 399-410, 2001.

FRANCI CR, ANSELMOFRANCI JA, MCCANN SM. Angiotensin-li Antiserum Decreases Luteinizing-Hormone-Releasing Hormone in the Median-Eminence and Preoptic Area of the Rat. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v.23, n.9,p. 899-901, 1990.

FRIEDLAND J, SILVERSTEIN E. Sensitive Fluorimetric Assay for Serum Angiotensin-Converting Enzyme. **American Journal of Clinical Pathology** v.66, n.2,p. 416-424, 1976.

FUNKELSTEIN L, TONEFF T, HWANG SR, BEUSCHLEIN F, LICHTENAUER UD, REINHECKEL T, PETERS C, HOOK V. Cathepsin I Protease Participates in the Production of Pomc-Derived Neuropeptides Acth, Beta-Endorphin and Alpha-Msh. **Neuropeptides** v.43, n.5,p. 432, 2009.

GALVAO MDL, SINIGAGLIA-COIMBRA R, KAWAKAMI SE, TUFIK S, SUCHECKI D. Paradoxical sleep deprivation activates hypothalamic nuclei that regulate food intake and stress response. **Psychoneuroendocrinology** v.34, n.8,p. 1176-1183, 2009.

GANONG WF. Reproduction and the Renin-Angiotensin System. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** v.19, n.2,p. 241-250, 1995.

HATTORI MA, DEL BEN GL, CARMONA AK, CASARINI DE. Angiotensin I-converting enzyme isoforms (high and low molecular weight) in urine of premature and full-term infants. **Hypertension** v.35, n.6,p. 1284-1290, 2000.

HAZNEDAROGLU IC, OZTURK MA. Towards the understanding of the local hematopoietic bone marrow renin-angiotensin system. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** v.35, n.6,p. 867-880, 2003.

HIPOLIDE DC Medicina e Biologia do Sono Bases neurais do ciclo de vigília e sono. In: Tufik S (ed) São Paulo, p. 34-46,2008

HIPOLIDE DC, SUCHECKI D, PINTO APD, FARIA EC, TUFIK S, FARIA EC. Paradoxical sleep deprivation and sleep recovery: Effects on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity, energy balance and body composition of rats. **Journal of Neuroendocrinology** v.18, n.4,p. 231-238, 2006.

HIRATA IY, CESARI MHS, KAIE CR, SHCOV P, O AS, JULIANO MA, JULIANO L. Internally quenched fluorogenic protease substrates: Solid phase synthesis and fluorescent spectroscopy of peptides containing ortho-aminobenzoyl-dinitrophenyl groups as donor-acceptor pairs. **Letters in Peptide Science** v., n.1,p. 299-301, 1994.

HOFFMANN M, BYBEE K, ACCURSO V, SOMERS VK. Sleep apnea and hypertension. **Minerva Med.** v.95, n.4,p. 281-290, 2004.

HOOK V, FUNKELSTEIN L, LU D, BARK S, WEGRZYN J, HWANG SR. Proteases for processing proneuropeptides into peptide neurotransmitters and hormones. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology** v.48,p. 393-423, 2008.

HOOK VYH. Protease pathways in peptide neurotransmission and neurodegenerative diseases. **Cellular and Molecular Neurobiology** v.26, n.4-6,p. 449-469, 2006.

HOOK VYH, AZARYAN AV, HWANG SR, TEZAPSIDIS N. Proteases and the Emerging Role of Protease Inhibitors in Prohormone Processing. **Faseb Journal** v.8, n.15,p. 1269-1278, 1994.

Institute of Laboratory Animal Resources . <[13] Book Title>. National Academy Press, Washington (DC),1996

JOUVET D, VIMONT P, DELORME F. Study of selective deprivation of the paradoxal phase of sleep in the cat. **J. Physiol (Paris)** v.56,p. 381, 1964.

JUNOT C, GONZALES MF, EZAN E, COTTON J, VAZEUX G, MICHAUD A, AZIZI M, VASSILIOU S, YIOTAKIS A, CORVOL P, DIVE V. RXP 407, a selective inhibitor of the N-domain of angiotensin I-converting enzyme, blocks in vivo the degradation of hemoregulatory peptide acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro with no effect on angiotensin I hydrolysis. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** v.297, n.2,p. 606-611, 2001.

KOBAN M, LE WW, HOFFMAN GE. Changes in hypothalamic corticotropin-releasing hormone, neuropeptide Y, and proopiomelanocortin gene expression during chronic rapid eye movement sleep deprivation of rats. **Endocrinology** v.147, n.1,p. 421-431, 2006.

KOBAN M, SITA LV, LE WW, HOFFMAN GE. Sleep deprivation of rats: The hyperphagic response is real. **Sleep** v.31, n.7,p. 927-933, 2008.

KOIKE H, SEKI H, KOUCHI Z, ITO M, KINOUCI T, TOMIOKA S, SORIMACHI H, SAIDO TC, MARUYAMA K, SUZUKI K, ISHIURA S. Thimet oligopeptidase cleaves the full-length Alzheimer amyloid precursor protein at a beta-secretase cleavage site in COS cells. **J. Biochem.** v.126, n.1,p. 235-242, 1999.

Kryger MH, Roth T, Dement WC . <[13] Book Title>. Elsevier, Philadelphia:2005

LALLEY PM. Opioidergic and dopaminergic modulation of respiration 382. **Respiratory Physiology & Neurobiology** v.164, n.1-2,p. 160-167, 2008.

LAMBERT DG. The nociceptin/orphanin FQ receptor: a target with broad therapeutic potential. **Nature Reviews Drug Discovery** v.7, n.8,p. 694-U11, 2008.

LAUTENBACHER S, KUNDERMANN B, KRIEG JC. Sleep deprivation and pain perception. **Sleep Medicine Reviews** v.10, n.5,p. 357-369, 2006.

LEE KS, ALVARENGA TA, GUINDALINI C, ANDERSEN ML, CASTRO RM, TUFIK S. Validation of commonly used reference genes for sleep-related gene expression studies. **BMC. Mol. Biol.** v.10,p. 45, 2009.

LENA I, BRADSHAW S, PINTAR J, KITCHEN I. Adaptive changes in the expression of central opioid receptors in mice lacking the dopamine D2 receptor gene. **Neuroscience** v.153, n.3,p. 773-788, 2008.

LEW RA, TETAZ TJ, GLUCKSMAN MJ, ROBERTS JL, SMITH AI. Evidence for A 2-Step Mechanism of Gonadotropin-Releasing-Hormone Metabolism by Prolyl Endopeptidase and Metalloendopeptidase Ec-3.4.24.15 in Ovine Hypothalamic Extracts. **Journal of Biological Chemistry** v.269, n.17,p. 12626-12632, 1994.

LOPEZ-OTIN C, BOND JS. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. **J. Biol. Chem.** v.283, n.45,p. 30433-30437, 2008.

MACHADO RB, HIPOLIDE DC, BENEDITO-SILVA AA, TUFIK S. Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique: quantification of sleep loss and recovery. **Brain Research** v.1004, n.1-2,p. 45-51, 2004.

MACHADO RB, SUCHECKI D, TUFIK S. Sleep homeostasis in rats assessed by a long-term intermittent paradoxical sleep deprivation protocol. **Behav. Brain Res.** v.160, n.2,p. 356-364, 2005.

MACHADO RB, TUFIK S, SUCHECKI D. Chronic stress during paradoxical sleep deprivation increases paradoxical sleep rebound: Association with prolactin plasma levels and brain serotonin content. **Psychoneuroendocrinology** v.33, n.9,p. 1211-1224, 2008.

MANI SK. Signaling mechanisms in progesterone-neurotransmitter interactions. **Neuroscience** v.138, n.3,p. 773-781, 2006.

MCKINLEY MJ, ALBISTON AL, ALLEN AM, MATHAI ML, MAY CN, MCALLEN RM, OLDFIELD BJ, MENDELSON FAO, CHAI SY. The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology** v.35, n.6,p. 901-918, 2003.

MCKINLEY MJ, CAIRNS MJ, DENTON DA, EGAN G, MATHAI ML, USCHAKOV A, WADE JD, WEISINGER RS, OLDFIELD BJ. Physiological and pathophysiological influences on thirst. **Physiology & Behavior** v.81, n.5,p. 795-803, 2004.

MEERLO P, KOEHL M, VAN DER BORGHT K, TUREK FW. Sleep restriction alters the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress. **Journal of Neuroendocrinology** v.14, n.5,p. 397-402, 2002.

MEERLO P, SGOIFO A, SUCHECKI D. Restricted and disrupted sleep: Effects on autonomic function, neuroendocrine stress systems and stress responsivity. **Sleep Medicine Reviews** v.12, n.3,p. 197-210, 2008.

MINERS JS, ASHBY E, VAN HELMOND Z, CHALMERS KA, PALMER LE, LOVE S, KEHOE PG. Angiotensin-converting enzyme (ACE) levels and activity in Alzheimer's disease, and relationship of perivascular ACE-1 to cerebral amyloid angiopathy. **Neuropathology and Applied Neurobiology** v.34, n.2,p. 181-+, 2008.

MOLINA HM, CARMONA AK, KOUYOUMDJIAN M, BORGES DR. Thimet oligopeptidase EC 3.4.24.15 is a major liver kininase. **Life Sciences** v.67, n.5,p. 509-520, 2000.

MOLINA HM, CARMONA AK, KOUYOUMDJIAN M, BORGES DR, JULIANO L. Liver bradykinin-inactivating-endopeptidase is similar to the metalloendopeptidase (EC 3.4.24.15). **Immunopharmacology** v.32, n.1-3,p. 176-179, 1996.

MOLINEAUX CJ, LASDUN A, MICHAUD C, ORLOWSKI M. Endopeptidase-24.15 Is the Primary Enzyme That Degrades Luteinizing-Hormone Releasing Hormone Both Invitro and Invivo. **Journal of Neurochemistry** v.51, n.2,p. 624-633, 1988b.

MOLINEAUX CJ, LASDUN A, MICHAUD C, ORLOWSKI M. Endopeptidase-24.15 Is the Primary Enzyme That Degrades Luteinizing-Hormone Releasing Hormone Both Invitro and Invivo. **Journal of Neurochemistry** v.51, n.2,p. 624-633, 1988a.

MONTIEL JL, CORNILLE F, ROQUES BP, NOBLE F. Nociceptin/orphanin FQ metabolism: Role of aminopeptidase and endopeptidase 24.15
337. **Journal of Neurochemistry** v.68, n.1,p. 354-361, 1997.

MOORE RY. Suprachiasmatic nucleus in sleep-wake regulation. **Sleep Med.** v.8 Suppl 3,p. 27-33, 2007.

MYERS LS, STEELE MK. The Brain Renin-Angiotensin System and Prolactin Secretion in the Male-Rat. **Endocrinology** v.129, n.4,p. 1744-1748, 1991.

NASCIMENTO DC, ANDERSEN ML, HIPOLIDE DC, NOBREGA JN, TUFIK S. Pain hypersensitivity induced by paradoxical sleep deprivation is not due to altered binding to brain mu-opioid receptors
358. **Behavioural Brain Research** v.178, n.2,p. 216-220, 2007.

NOBLE F, ROQUES BP. Association of aminopeptidase N and endopeptidase 24.15 inhibitors potentiate behavioral effects mediated by nociceptin/orphanin FQ in mice. **Febs Letters** v.401, n.2-3,p. 227-229, 1997.

NUNES GP, TUFIK S. Validation of the modified multiple platform method (MMP) of paradoxical sleep deprivation in rats. **Sleep Research** v., n.23,p. 413, 1994.

OHINATA K, FUJIWARA Y, FUKUMOTO S, IWAI M, HORIUCHI M, YOSHIKAWA M. Angiotensin II and III suppress food intake via angiotensin AT(2) receptor and prostaglandin EP4 receptor in mice. **Febs Letters** v.582, n.5,p. 773-777, 2008.

OLIVEIRA V, CAMPOS M, MELO RL, FERRO ES, CAMARGO ACM, JULIANO MA, JULIANO L. Substrate specificity characterization of recombinant metallo oligopeptidases thimet oligopeptidase and neurolysin. **Biochemistry** v.40, n.14,p. 4417-4425, 2001.

ONEN SH, ALLOUI A, ESCHALIER A, DUBRAY C. Vocalization thresholds related to noxious paw pressure are decreased by paradoxical sleep deprivation and increased after sleep recovery in rat
353. **Neuroscience Letters** v.291, n.1,p. 25-28, 2000.

ONEN SH, ALLOUI A, GROSS A, ESCHALLER A, DUBRAY C. The effects of total sleep deprivation, selective sleep interruption and sleep recovery on pain tolerance thresholds in healthy subjects. **Journal of Sleep Research** v.10, n.1,p. 35-42, 2001.

ORLOWSKI M, MICHAUD C, CHU TG. A Soluble Metalloendopeptidase from Rat-Brain - Purification of the Enzyme and Determination of Specificity with Synthetic and Natural Peptides. **European Journal of Biochemistry** v.135, n.1,p. 81-88, 1983.

PAUL M, POYAN MA, KREUTZ R. Physiology of local renin-angiotensin systems. **Physiol Rev.** v.86, n.3,p. 747-803, 2006.

PEDRAZZOLI M, D'ALMEIDA V, MARTINS PJF, MACHADO RB, LING L, NISHINO S, TUFIK S, MIGNOT E. Increased hypocretin-1 levels in cerebrospinal fluid after REM sleep deprivation. **Brain Research** v.995, n.1,p. 1-6, 2004.

PIVA F, ZANISI M, MOTTA M, MARTINI L. "Ultrashort" control of hypothalamic hormones secretion: a brief history. **J. Endocrinol. Invest** v.27, n.6 Suppl,p. 68-72, 2004.

PORKKAHEISKANEN T, SMITH SE, TAIRA T, URBAN JH, LEVINE JE, TUREK FW, STENBERG D. Noradrenergic Activity in Rat-Brain During Rapid Eye-Movement Sleep-Deprivation and Rebound Sleep. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology** v.268, n.6,p. R1456-R1463, 1995.

PORTARO FC, GOMES MD, CABRERA A, FERNANDES BL, SILVA CL, FERRO ES, JULIANO L, DE CAMARGO AC. Thimet oligopeptidase and the stability of MHC class I epitopes in macrophage cytosol. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.255, n.3,p. 596-601, 1999.

PORTER JP, POTRATZ KR. Effect of intracerebroventricular angiotensin II on body weight and food intake in adult rats. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology** v.287, n.2,p. R422-R428, 2004.

PROSPERO-GARCIA O, MENDEZ-DIAZ M. The role of neuropeptides in sleep modulation. **Drug News & Perspectives** v.17, n.8,p. 518-522, 2004.

RECHTSCHAFFEN A, GILLILAND MA, BERGMANN BM, WINTER JB. Physiological Correlates of Prolonged Sleep-Deprivation in Rats. **Science** v.221, n.4606,p. 182-184, 1983.

RIEGER KJ, SAEZSERVENT N, PAPET MP, WDZIECZAKBAKALA J, MORGAT JL, THIERRY J, VOELTER W, LENFANT M. Involvement of Human Plasma Angiotensin I-Converting Enzyme in the Degradation of the Haemoregulatory Peptide N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline. **Biochemical Journal** v.296,p. 373-378, 1993.

RIOLI V, GOZZO FC, HEIMANN AS, LINARDI A, KRIEGER JE, SHIDA CS, ALMEIDA PC, HYSLOP S, EBERLIN MN, FERRO ES. Novel natural peptide substrates for endopeptidase 24.15, neurolysin, and angiotensin-converting enzyme. **Journal of Biological Chemistry** v.278, n.10,p. 8547-8555, 2003.

ROBERTS JL, MANI SK, WOLLER MJ, GLUCKSMAN MJ, WU TJ. LHRH-(1-5): a bioactive peptide regulating reproduction. **Trends Endocrinol. Metab** v.18, n.10,p. 386-392, 2007.

ROCK KL, YORK IA, GOLDBERG AL. Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation. **Nat. Immunol.** v.5, n.7,p. 670-677, 2004.

ROSSMANITH WG. The impact of sleep on gonadotropin secretion. **Gynecological Endocrinology** v.12, n.6,p. 381-389, 1998.

RUSSO LC, GONI CN, CASTRO LM, ASEGA AF, CAMARGO ACM, TRUJILLO CA, ULRICH H, GLUCKSMAN MJ, SCAVONE C, FERRO ES. Interaction with calmodulin is important for the secretion of thimet oligopeptidase following stimulation. **Febs Journal** v.276, n.16,p. 4358-4371, 2009.

SABATINI RA, GUIMARAES PB, FERNANDES L, REIS FCG, BERSANETTI PA, MORI MA, NAVARRO A, HILZENDEGER AM, SANTOS EL, ANDRADE MCC, CHAGAS JR, PESQUERO JL, CASARINI DE, BADER M, CARMONA AK, PESQUERO JB. ACE activity is modulated by kinin B-2 receptor. **Hypertension** v.51, n.3,p. 689-695, 2008.

SANDEN C, ENQUIST J, BENGTSON SH, HERWALD H, LEEB-LUNDBERG LMF. Kinin B-2 receptor-mediated bradykinin internalization and metalloendopeptidase EP24.15-dependent intracellular bradykinin degradation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** v.326, n.1,p. 24-32, 2008.

SANTOS CA, ANDERSEN ML, LIMA MM, TUFIK S. Gentle handling temporarily increases c-Fos in the substantia nigra pars compacta. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.41, n.10,p. 920-925, 2008a.

SANTOS EL, SOUZA KDP, GUIMARAES PB, REIS FCG, SILVA SMA, COSTA-NETO CM, LUZ J, PESQUERO JB. Effect of angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril on body weight and composition in young rats. **International Immunopharmacology** v.8, n.2,p. 247-253, 2008b.

SARIC T, BENINGA J, GRAEF CI, AKOPIAN TN, ROCK KL, GOLDBERG AL. Major histocompatibility complex class I-presented antigenic peptides are degraded in cytosolic extracts primarily by thimet oligopeptidase. **Journal of Biological Chemistry** v.276, n.39,p. 36474-36481, 2001.

SCHOLKENS BA. Kinins in the cardiovascular system. **Immunopharmacology** v.33, n.1-3,p. 209-216, 1996.

SCHOLZEN TE, KONIG S, FASTERICH M, BOHM M, LUGER TA. Terminating the stress: Peripheral peptidolysis of proopiomelanocortin-derived regulatory hormones by the dermal microvascular endothelial cell extracellular peptidases neprilysin and angiotensin-converting enzyme. **Endocrinology** v.148, n.6,p. 2793-2805, 2007.

Seidah NG, Prat A . <[13] Book Title>. PORTLAND PRESS LTD, LONDON, pp. 79-94,2002

SGOIFO A, BUWALDA B, ROOS M, COSTOLI T, MERATI G, MEERLO P. Effects of sleep deprivation on cardiac autonomic and pituitary-adrenocortical stress reactivity in rats. **Psychoneuroendocrinology** v.31, n.2,p. 197-208, 2006.

SHRIMPTON CN, SMITH AI. Soluble neutral metallopeptidases: Physiological regulators of peptide action. **Journal of Peptide Science** v.6, n.6,p. 251-263, 2000.

SHRIMPTON CN, SMITH AI, LEW RA. Soluble metalloendopeptidases and neuroendocrine signaling. **Endocr. Rev.** v.23, n.5,p. 647-664, 2002.

SIEGEL J. Brain mechanisms that control sleep and waking. **Naturwissenschaften** v.91, n.8,p. 355-365, 2004.

SIEGEL JM. The neurobiology of sleep. **Semin. Neurol.** v.29, n.4,p. 277-296, 2009.

SILVA CL, PORTARO FCV, BONATO VLD, DE CAMARGO ACM, FERRO ES. Thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15), a novel protein on the route of MHC class I antigen presentation. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v.255, n.3,p. 591-595, 1999.

SILVA RH, CHEHIN AB, KAMEDA SR, TAKATSU-COLEMAN AL, ABILIO VC, TUFIK S, FRUSSA R. Effects of pre- or post-training paradoxical sleep deprivation on two animal models of learning and memory in mice. **Neurobiology of Learning and Memory** v.82, n.2,p. 90-98, 2004.

SKIDGEL RA, ERDOS EG. Angiotensin converting enzyme (ACE) and neprilysin hydrolyze neuropeptides: a brief history, the beginning and follow-ups to early studies. **Peptides** v.25, n.3,p. 521-525, 2004.

SMITH AI, LEW RA, SHRIMPTON CN, EVANS RG, ABBENANTE G. A novel stable inhibitor of endopeptidases EC 3.4.24.15 and 3.4.24.16 potentiates bradykinin-induced hypotension. **Hypertension** v.35, n.2,p. 626-630, 2000.

SPIEGEL K, KNUTSON K, LEPROULT R, TASALI E, VAN CAUTER E. Sleep loss: a novel risk factor for insulin resistance and Type 2 diabetes. **Journal of Applied Physiology** v.99, n.5,p. 2008-2019, 2005.

STAUNTON H. Mammalian sleep. **Naturwissenschaften** v.92, n.5,p. 203-220, 2005.

STEIGER A, HOLSBOER F. Neuropeptides and human sleep. **Sleep** v.20, n.11,p. 1038-1052, 1997.

STEINER H, GERFEN CR. Role of dynorphin and enkephalin in the regulation of striatal output pathways and behavior. **Experimental Brain Research** v.123, n.1-2,p. 60-76, 1998.

SUCHECKI D, D'ALMEIDA V Medicina e Biologia do Sono. Privação de sono. In: Tufik S (ed) São Paulo, p. 71-86,2008

SUCHECKI D, TIBA PA, TUFIK S. Paradoxical sleep deprivation facilitates subsequent corticosterone response to a mild stressor in rats. **Neuroscience Letters** v.320, n.1-2,p. 45-48, 2002.

SUCHECKI D, TUFIK S. Social stability attenuates the stress in the modified multiple platform method for paradoxical sleep deprivation in the rat. **Physiology & Behavior** v.68, n.3,p. 309-316, 2000.

TAHERI S, HAFIZI S. The orexins/hypocretins: hypothalamic peptides linked to sleep and appetite. **Psychol. Med.** v.32, n.6,p. 955-958, 2002.

TIMO-IARIA C, NEGRAO N, SCHMIDEK WR, HOSHINO K, LOBATO DE MENEZES CE, LEME DR. Phases and states of sleep in the rat. **Physiol Behav.** v.5, n.9,p. 1057-1062, 1970.

TISLJAR U. Thimet oligopeptidase--a review of a thiol dependent metallo-endopeptidase also known as Pz-peptidase endopeptidase 24.15 and endo-oligopeptidase. **Biol. Chem. Hoppe Seyler** v.374, n.2,p. 91-100, 1993.

Tufik S. Medicina e Biologia do Sono In: Manole (ed), v.1, 1ed,2008

TUFIK S, ANDERSEN ML, BITTENCOURT LRA, DE MELLO MT. Paradoxical Sleep Deprivation: neurochemical, hormonal and behavioral alterations. Evidence from 30 years of research. **Anais Da Academia Brasileira De Ciencias** v.81, n.3,p. 521-538, 2009.

TUFIK S, LINDSEY CJ, CARLINI EA. Does Rem-Sleep Deprivation Induce A Supersensitivity of Dopaminergic Receptors in Rat-Brain. **Pharmacology** v.16, n.2,p. 98-105, 1978.

TUFIK S, SANTOS-SILVA R, TADDEI JA, BITTENCOURT LR. Obstructive sleep apnea syndrome in the Sao Paulo Epidemiologic Sleep Study. **Sleep Med.** v.11, n.5,p. 441-446, 2010.

TULLAI JW, CUMMINS PM, PABON A, ROBERTS JL, LOPINGEO MC, SHRIMPTON CN, SMITH AI, MARTIGNETTI JA, FERRO ES, GLUCKSMAN MJ. The neuropeptide processing enzyme EC 3.4.24.15 is modulated by protein kinase A phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry** v.275, n.47,p. 36514-36522, 2000.

UKPONMWAN OE, RUPREHT J, DZOLJIC MR. Rem-Sleep Deprivation Decreases the Antinociceptive Property of Enkephalinase-Inhibition, Morphine and Cold-Water-Swim. **General Pharmacology** v.15, n.3,p. 255-258, 1984.

VAARA J, KYROLAINEN H, KOIVU M, TULPPO M, FINNI T. The effect of 60-h sleep deprivation on cardiovascular regulation and body temperature. **Eur. J. Appl. Physiol** v.105, n.3,p. 439-444, 2009.

VAN CAUTER E, SPLEGEL K, TASALI E, LEPROULT R. Metabolic consequences of sleep and sleep loss. **Sleep Medicine** v.9,p. S23-S28, 2008.

VAN HULZEN ZJ, COENEN AM. Paradoxical sleep deprivation and locomotor activity in rats. **Physiol Behav.** v.27, n.4,p. 741-744, 1981.

VINCENT B, JIRACEK J, NOBLE F, LOOG M, ROQUES B, DIVE V, VINCENT JP, CHECLER F. Contribution of endopeptidase 3.4.24.15 to central neurotensin inactivation. **European Journal of Pharmacology** v.334, n.1,p. 49-53, 1997.

VOLKOW ND, TOMASI D, WANG GJ, TELANG F, FOWLER JS, WANG RL, LOGAN J, WONG C, JAYNE M, SWANSON JM. Hyperstimulation of striatal D2 receptors with sleep deprivation: Implications for cognitive impairment. **Neuroimage** v.45, n.4,p. 1232-1240, 2009.

WEI L, ALHENC-GELAS F, SOUBRIER F, MICHAUD A, CORVOL P, CLAUSER E. Expression and characterization of recombinant human angiotensin I-converting enzyme. Evidence for a C-terminal transmembrane anchor and for a proteolytic processing of the secreted recombinant and plasma enzymes. **J. Biol. Chem.** v.266, n.9,p. 5540-5546, 1991.

WRIGHT JW, YAMAMOTO BJ, HARDING JW. Angiotensin receptor subtype mediated physiologies and behaviors: New discoveries and clinical targets. **Progress in Neurobiology** v.84, n.2,p. 157-181, 2008.

WU TJ, MANI SK, GLUCKSMAN MJ, ROBERTS JL. Stimulation of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) gene expression in GT(1-7) cells by its metabolite, LHRH-(1-5). **Endocrinology** v.146, n.1,p. 280-286, 2005.

WU TJ, PAGANO E, MANI SK. A Biological Role for the Gonadotrophin-Releasing Hormone (GnRH) Metabolite, GnRH-(1-5). **Journal of Neuroendocrinology** v.21, n.4,p. 293-298, 2009.

WU TJ, PIEROTTI AR, JAKUBOWSKI M, SHEWARD WJ, GLUCKSMAN MJ, SMITH AI, KING JC, FINK G, ROBERTS JL. Endopeptidase EC 3.4.24.15 presence in the rat median eminence and hypophysial portal blood and its modulation of the luteinizing hormone surge. **Journal of Neuroendocrinology** v.9, n.11,p. 813-822, 1997.

YAMIN R, MALGERI EG, SLOANE JA, MCGRAW WT, ABRAHAM CR. Metalloendopeptidase EC 3.4.24.15 is necessary for Alzheimer's amyloid-beta peptide degradation
103. **Journal of Biological Chemistry** v.274, n.26,p. 18777-18784, 1999.

ZHOU A, WEBB G, ZHU XR, STEINER DF. Proteolytic processing in the secretory pathway. **Journal of Biological Chemistry** v.274, n.30,p. 20745-20748, 1999.

Manuscrito 1

Sleep and Proteases: Paradoxical Sleep Deprivation Changes the Expression and Proteolytic Activity of the Neuropeptide Processing Enzyme EC 3.4.24.15 in Rat Central Nervous System.

Authors: Bruna Visniauskas*, Vitor Oliveira⁺, Sergio Tufik*, Jair Ribeiro Chagas^{*,§}

* Department of Psychobiology, Universidade Federal de São Paulo, SP, Brazil

⁺ Department of Biophysics, Universidade Federal de São Paulo, SP, Brazil

[§] Department of Health Sciences, Universidade Federal de São Paulo, SP, Brazil

Address correspondence and reprint requests to Dr. Jair Ribeiro Chagas, Departamento de Psicobiologia, Universidade Federal de São Paulo. Address Rua Napoleão de Barros, 925, 3° andar, CEP: 04024-002, São Paulo, SP, Brazil. E-mail: jchagas1@gmail.com

Sleep deprivation and E.C. 3.4.24.15 activity

Abstract

The effect of sleep deprivation on proteolytic activities in the central nervous system has not been frequently addressed in the literature. We have started to study the changes on peptidase activities in animal models of paradoxical sleep deprivation (PSD), mainly focusing on metallopeptidases like Thimet oligopeptidase - (TOP, EC 3.4.24.15 or EP24.15) known to process neuropeptides. In the present study we demonstrated that PSD in rats induces changes both in expression and activity of EP24.15 in the male rat hypothalamus, cortex, brainstem, hippocampus and striatum. GnRH, dynorphins, enkephalins, orphanin/nociceptin are among the many neuropeptides whose balance can be modified by the modifications on EP24.15 activity and can be, at least partially, related to many of the physiological changes observed in PSD and during the recovery periods.

Keywords: Thimet oligopeptidase EC 3.4.24.15, Paradoxical sleep deprivation, neuropeptidases, opioid peptides, GnRH, Central nervous system

Introduction

Sleep deprivation (SD) in humans and in animal models has been shown to induce profound general physiologic changes (Wolk et al. 2005;Simpson and Dinges 2007;Wolk and Somers 2007;Kaneita et al. 2008;Van Cauter et al. 2008;Tufik et al. 2009). These include modifications on sexual behavior, cardiovascular parameters, oxidative stress, anxiety and depression, learning and memory, energy balance, insulin resistance, obesity, apnoea, among many others. Most of these effects are in some way, directly or indirectly, related to changes on the central nervous system (CNS). Dopaminergic, serotonergic, histaminergic, adrenergic and cholinergic systems have all been shown to be involved, either alone or jointly, in the effects of SD.

Neuropeptides, either as neurotransmitters or endocrine effectors, have also been shown to be involved: GnRH (Rossmann 1998), somatostatin (Obal and Krueger 2004), vasopressin (Born et al. 1992), neurotensin (Cape et al. 2000), substance P (Andersen et al. 2006), neuropeptide Y (Martins et al. 2010), GH, ACTH, CRH (Steiger 2007), orexin/hypocretin (Pedrazzoli et al. 2004;D'Almeida et al. 2005), ghrelin are some of these peptides whose dynamics are important for sleep and many were shown to be altered under conditions of SD (Steiger 2007).

Proteolytic enzymes have an essential role on the control of peptide levels all over living organisms. In the CNS, liberation of active peptides from non-active precursors, generation of new ligands from already active precursors or inactivation of endogenous or exogenously generated peptides, are under direct control of proteolytic enzymes (Shrimpton et al. 2002;Gulpinar and Yegen 2004;Hook et al. 2008;Rholam and

Fahy 2009). Beyond this classical view of, mostly, extracellular proteolytic activities, a new level of complexity has become recently evident from the demonstration of a large intracellular peptidergic system, whose complexity has barely been touched (Fricker et al. 2006;Fricker 2007;Cunha et al. 2008).

Among the proteolytic enzymes families shown to be relevant in the generation and inactivation of neuropeptides, many metallopeptidases containing Zn^{2+} in their active site have been described. Angiotensin I-converting enzyme (EC 3.4.15.1, ACE), neprilysin (EC 3.4.24.11, NEP), angiotensin converting enzyme 2 (EC 3.4.17, ACE2), endothelin Converting Enzyme (EC 3.4.24.71, ECE), neurolysin (EC 3.4.24.16) and thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15, EP24.15) are some examples. In particular, EP24.15 is able to hydrolyze efficiently peptides like somastotatin, neurotensin, bradykinin, angiotensin I, β -amyloid peptide, GnRH, nociceptin/orphanin (Noble and Roques 1997) and opioid ligands like dynorphin A₁₋₈ (Shrimpton et al. 2002) *in vitro*. Many compelling evidences, obtained with inhibitors and specific substrates, indicate that at least GnRH, bradykinin and nociceptin/orphanin are physiological substrates (Wu et al. 1997;Noble and Roques 1997;Smith et al. 2000).

EP24.15 is a zinc dependent metalloproteinase, largely distributed in many tissues all over the organism in rats and humans. In the brain EP24.15 was shown to be widespread expressed, both in neurons and glial cells. It seems to be involved in the generation of enkephalins and is able to degrade peptides with no less than 6 residues and no more than 17, like bradykinin, neurotensin, angiotensin I and GnRH (Healy and Orłowski 1992) including intracellular peptides involved in the MHC class I presentation

route (Silva et al. 1999;Portaro et al. 2001). EP24.15 activity and localization (nuclear, cytoplasmic, extracellular) are regulated by post-translational modifications like phosphorylation and glutathionylation (Tullai et al. 2000;Portaro et al. 2001;Carreno et al. 2005;Demasi et al. 2008). The crystal structure of EP24.15 at 2.0-Angstrom resolution has been determined and can explain many of its kinetic and specificity properties (Ray et al. 2004).

In SD models there is a general lack of information on the possible changes that could be induced by sleep loss on the expression, activity, time span or fate of active proteolytic enzymes, especially in the CNS. We have than started a systematic evaluation of these activities in CNS tissues of rats submitted to paradoxical sleep deprivation (PSD) beginning with EP24.15 expression and activities.

Materials and Methods

Animals

Male *Wistar* rats (3 months of age) were obtained from CEDEME - Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). The animals were housed in a colony maintained at 22°C in 12:12 h light–dark cycle (lights on at 07:00 a.m. and off at 19:00 h) inside standard polypropylene cages. All procedures used in the present study complied with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (Institute of Laboratory Animal Resources 1996;Andersen ML et al. 2004) and the experimental protocol was approved by the Ethical Committee of UNIFESP (approval n° 0144/09).

Paradoxical sleep deprivation (PSD)

Animals were divided into 5 groups, with 8 animals each: PSD96 group was submitted to PSD over a 96h period using the modified multiple platform method (Machado et al. 2004). The sleep recovery (SR) groups were submitted to PSD96 and were studied after 24, 48 and 96 h of SR, generating respectively the SR24, SR48 and SR96. A home-cage control (CTRL) group was kept all the experimental time in the same room sleeping *ad libitum*. During the 96 h PSD period rats were placed inside a water tank (123x44x44 cm), filled up to 1 cm of the upper border and containing 14 circular platforms, 6.5 cm in diameter. Animals could thus move around inside the tank by jumping from one platform to another. When PSD was reached, muscle atonia set in, animals fell into the water and woke up. During SR periods animals were left to sleep freely. Throughout the study room temperature was kept constant ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$) and at light–dark cycle (lights on at 07:00 h and off at 19:00 h). Food and water were provided *ad libitum*. Water in the tank was changed daily throughout the study period.

Tissue samples

All rats were euthanized by decapitation in the same day between 8:00 at 10:00 a.m. The hypothalamus, hippocampus, striatum, total cortex and brainstem were removed, either for protein or RNAm extraction (TRIZOL, Invitrogen protocol). For protein extraction tissues were homogenized in Tris-HCl 50mM buffer, pH 7.4, containing NaCl 100mM and 0,1% Triton. Homogenates were centrifuged at 1000g for 15 min at 4°C and the supernatant was frozen at -20°C until EP24.15 activity

measurements. The protein content was measured by the method of Bradford (Bradford 1976) using bovine serum albumin as standard.

Enzymatic Activity

EP24.15 activity on tissue extracts was determined using a fluorogenic substrate for EP24.15, Abz-GFDPFRQ-EDDnp (10 μ M) (Oliveira et al. 2001) and the specific inhibitor JA-2 (*N*-[1-(*R*, *S*)-carboxy-3-phenylpropyl]-Ala-Aib-Tyr-*p*-aminobenzoate) at 2 μ M final concentration (Shrimpton et al. 2000). The substrate was synthesized by a modified standard Fmoc solid phase peptide synthesis protocol, using microwave irradiation protocols (Discover, CEM Co.) during coupling and deprotection steps (Bacsa et al. 2006). JA-2 was prepared by solution methods, using Boc chemistry, and microwaves for aminoisobutyric acid (Aib) coupling. Both, substrate and inhibitor were purified by HPLC (Shimadzu, LC-20A Prominence) and characterized by electron-spray mass spectrometry (Varian, 1200L Quadrupole) and amino acid analysis (Shimadzu, LC-10A/C-R7A). Assays were performed in a Tris-HCl 50mM pH7.4, NaCl 100mM, buffer at 37 °C. EP24.15 was activated by DTT (0.5 mM final concentration) during 5 min, at assay temperature, before adding the substrate. The reactions were continuously followed in a fluorimeter (Gemini XS, Molecular Devices Company), measuring the fluorescence at λ_{ex} =320nm and λ_{em} =420nm. Measurements were performed in duplicate. EP24.15 activity values were reported as nanomolar of substrate hydrolyzed per minute per milligram of protein (nmol \cdot min⁻¹ \cdot mg⁻¹).

Real time PCR

EP24.15 and β -actin mRNA expression in tissue were assessed by SYBR Green real-time PCR using 10 ng of total cDNA, SYBR Green Universal Master Mix (Applied Biosystems), and the following set of primers independently: EP24.15 (5'-TGATGTGGAGATGAGCATGAGGCA-3'; 5'-AGGCTTCAGTGAGTCTTTCGGGA T-3'; GenBank accession N° NM_172075.2) and β -actin (5'- AGGCCAACCG TGAAAAGATG -3' and 5'-CCAGAGGCATACAGGGACAAC - 3' GenBank accession N° NM_031144.2).

Immunoblotting

Aliquots containing 50 μ g of proteins extracted from tissues in Tris-HCl 100mM, NaCl 50mM and 0.1% Triton X-100, were applied to 10% polyacrylamide gels; purified EP24.15 protein was applied in parallel as standard marker. These were subjected to sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to nitrocellulose membrane and blocked with 1% BSA in phosphate-buffered saline containing 0.1% Tween-20 (PBS-T) for overnight at 4°C. It was then reacted about 4 hours at 4°C with rabbit anti-rat EP24.15 antibody (1:1000) (Proteimax, Cotia, SP, Brazil) in PBS-T followed by three 10 min washes with PBS-T. The secondary antibody, anti-rabbit IgG antibody (1:10.000) linked to Alexa fluor 680 (Invitrogen) in PBS-T, was applied for 2 h at 25°C and the membrane again washed 3X. The membranes were scanned (Odyssey, Li-Cor Biosciences) by using appropriate filter sets, and band intensities were quantified by using Odyssey 3 software and Glyceraldehyde Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) as internal reference.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the STATISTIC 6.0 software. Kruskal-Wallis test was applied for the general comparison of median values and $P < 0.05$ was considered statistically significant. Differences between each two groups were evaluated by the Mann–Whitney *U*-test and $P < 0.01$ was considered statistically significant.

Results

Specificity of enzyme activity detection

Specific enzymatic activities for EP24.15 in different CNS tissues in control animals are presented in Figure 1 as mean and SD. In all tissues, after JA-2 addition, hydrolysis rate values were close to zero, the same as the background rate of peptide alone and are not represented. When protein extraction is performed using an extraction buffer/tissue ratio of 3ml/g, between 2 and 20 μ l of extract to 200 μ l final incubation volume on plate reader is enough to get reliable lectures in 10 to 20 min spam time for all samples.

EP24.15 activity and gene expression in brain tissues

Figures 2, 3 and 4 summarize the results for EC24.15 RT-PCR (empty box plot) and specific enzymatic activities for the hydrolysis of 10 μ M Abz-GFDPFRQ-EDDnp (shadowed box plot) for each CNS tissue in the CTRL, PSD96, SR24, SR48 and SR96

groups. Additionally, in Figure 4, is presented the EP24.15 protein quantification estimated from immunoblotting.

In the cortex a statistically significant EP24.15 specific activity reduction (Fig 2b) was observed at SR48, when compared to CTRL, PSD96 and SR24 ($P < 0.005$). Also a significant increase of this activity could be observed at SR96 when compared to PSD96, SR24 and SR48 ($P < 0.01$). In the hippocampus a significant activity increase could only be shown at SR48 and SR96 (Fig 2d) when both are compared to CTRL and SR24 ($P < 0.005$). As in many other tissues, no statistically significant differences were demonstrated from RT-PCR results, in any experimental condition, in the cortex and hippocampus (Figures 2a and 2c), respectively.

Figure 3b shows results for EP24.15 specific activity in brainstem, where SR48 is different from CTRL, SR24 and SR96. These results do not parallel mRNA data (Fig 3a) as a reduction is observed for PSD96 and SR24, when compared to CTRL ($P < 0.001$). In the contrary, in striatum, mRNA and specific activities seem to be quite parallel (Fig 3c and 3d) albeit only for SR48 enzyme activity a significant reduction ($P < 0.01$) was obtained when compared to CTRL.

In the hypothalamus, where more compelling evidences point to a neuroendocrine role for EP24.15 in GnRH processing, besides specific enzymatic activity and RT-PCR, immunoblotting was performed in an attempt to quantify the protein and correlate this measure to activity. Figure 4a and 4b showed similar profiles for both mRNA relative amount and protein content. Albeit non significant ($P = 0.03$) the reduction in mRNA parallels the protein content ($P = 0.02$) when PSD96 and SR48 are

compared. Moreover, in both parameters, the observed increase at SR96 is significant in relation to SR48 ($P < 0.01$). Nonetheless, enzyme activity already shows a reduction at PSD96 that is kept until SR24, when both are compared to CTRL ($P < 0.005$) well before mRNA or protein reduction. All three measures (mRNA, protein content and enzymatic activity) only return to CTRL values at SR96.

Discussion

The demonstration of a specific activity for a given enzyme, especially protease in biological samples, is not a simple task and, whenever possible, a combination of specific substrates and inhibitors is ideally used to strengthen the evidences. EP24.15 activity is frequently difficult to distinguish from the EP24.16 (Neurolysin) activity, as both enzymes are able to hydrolyze mostly the same neuropeptides (Rioli et al. 1998). We have used a combination of an accepted specific inhibitor for EP24.15, JA-2, that is about 20 fold more specific for EP24.15 (Shrimpton et al. 2000) when compared to Neurolysin and a sensible and also 20 fold more specific substrate, Abz-GDSPFRQ-EDDnp (Oliveira et al. 2001), to follow EP24.15 activity in brain tissues extracts. This substrate, beyond an increased specificity for EP24.15 has also a 10^3 higher K_m ($\sim 17\mu M$) when compared to JA-2 K_i value (22nM) and consequently a competition between the substrate and the inhibitor is practically eliminated. In all studied tissues the enzyme activity on 10 μM initial concentrations of this substrate could be reduced to practically zero by using 2 μM JA-2. Additionally we have used 0.5mM Pro-Ile, a specific

Neurolysin inhibitor (Dauch et al. 1991), and no changes on the activity over the fluorogenic substrate were observed (results not shown), assuring that under these conditions we were only measuring EP24.15 activity.

By using a combination of a specific substrate and specific inhibitor we were able to demonstrate could show the presence of EP24.15 activity in the whole cortex, brain stem, hippocampus, striatum and hypothalamus. The expression of the enzyme was also verified by real-time PCR analysis. As shown in Figure 1, in all studied tissues, EP24.15 in control animals showed activities that are in a range of 7 fold when comparing the minimum and maximal activities. Beyond the obvious speculation of a different biosynthesis rate of the protein, this fact can also indicate that post-translational modifications, like glutathionylation (Shrimpton et al. 2003; Demasi et al. 2008), dimerization or phosphorylation, known to affect enzyme activity (Tullai et al. 2000; Portaro et al. 2001; Carreno et al. 2005; Machado et al. 2006), are done in different rates in the different tissues.

The most striking changes on EP24.15 activities were obtained in the hypothalamus. A significant reduction on this parameter was evident after the SD period and the return to initial values is attained only after 96h of normal sleep recovery, as shown in Figure 4.

It is noteworthy that a quite similar profile, as observed for EP24.15 activity, is observed for estrone and, to a less extent, for testosterone serum concentrations, in male rats submitted to the same PSD protocol (Andersen et al. 2005). Interestingly serum progesterone levels show the inverse profile in the same model, with a five-fold

rising at PSD96 that reverts to control levels after 48h of sleep recovery.

It is tempting to relate changes on EP24.15 activity to estrone and testosterone serum levels modifications through progesterone raise and GnRH pulse control. As stated in a recent review (Wu et al. 2009) LHRH (or GnRH) is a physiological substrate for EP24.15, generating LHRH-(1-5) probably after the C-terminal remotion of Gly-NH₂ by a prolyl-peptidase (Lew et al. 1994). In an ultrashort negative feedback mechanism, LHRH inhibits its own synthesis while its hydrolysis product by EP24.15, LHRH-(1-5), is able to stimulate LHRH synthesis. A reduction in EP24.15 activity, as observed after 96h of PSD, would increase the extracellular concentration of LHRH and, at the same time, reduce the amount of LHRH-(1-5). The expected consequence is an hypothalamic reduction on LHRH availability and consequently a reduction on LH, FSH, testosterone and its metabolic products. Paradoxically the reduction in EP24.15 activity at PSD96 was not accompanied by a significant reduction of mRNA or the protein amount, as estimated by Western-blotting. Both, protein and mRNA amounts only fall after 24 to 48 hours following PSD96, in the recovery period, and come back to control values at SR96. As stated in the same review (Wu et al. 2009), as non-published results, progesterone increases EP24.15 expression. Nonetheless several post-translational modifications, like phosphorylation, glutathionylation (Portaro et al. 2001; Demasi et al. 2008; Russo et al. 2009) and cell redox status are able to change EP24.15 activity. Progesterone increases the activity in phosphorylation pathways, including calmodulin dependent protein kinase II in female rats; estrogens and progesterone also affect the activity and expression of phosphatases and kinases (Mani 2006). Phosphorylation

seems to be necessary for EP24.15 secretion to extracellular medium but, at the same time, reduces its affinity for GnRH. Moreover, opioid peptides are also involved in the progesterone control of GnRH (Pierotti et al. 1991;Mani 2006).

Orphanin FQ/nociceptin, an opioid peptide and EP24.15 substrate (Acker et al. 1987;Montiel et al. 1997;Noble and Roques 1997), was recently shown to participate in a feedback loop that suppresses GnRH dependent LH release in sheeps (Foradori et al. 2007), to reduce GnRH secretion in rat hypothalamic slices (Dhandapani and Brann 2002) and, *in vivo*, from the preoptic area of conscious male rats (An et al. 2008). An increased level of Orphanin FQ/nociceptin, due to EP24.15 activity reduction, would also account to GnRH release reduction. Taken together these data strongly indicate a role for EP24.15 activity reduction on the changes observed in serum sexual steroid hormones concentration after PSD.

As stated above, EP24.15 participates in the metabolism of endogenous opioid peptides (Dynorphin A₁₋₈; β -neoendorphin, Met-enkephalin-Arg-Gly-Leu, nociceptin/orphanin) and neurotensin (Acker et al. 1987;Montiel et al. 1997;Shrimpton et al. 2002) affecting nociception. The opioid peptides and their receptors (μ , δ , κ and orphan - ORL-1) are present in various regions of the CNS, involved in pain, analgesia, stress, learning, memory, addiction, development and endocrinology (Bodnar RJ et al., 2007).

Paradoxical sleep deprivation for 96 h decreased nociceptive thresholds, suggesting that PSD promotes an action of hyperalgesia (Lautenbacher et al. 2006) and reverts the antinociceptive effect of enkephalinase inhibition (Ukponmwan et al.

1984;Lautenbacher et al. 2006). This increase in nociception does not seem to be caused by a variation in μ -opioid receptor binding (Nascimento et al. 2007). After periods of 72h or 96h of PSD the increase in nociception takes more than 24h to return to control values and even an antinociceptive effect can be detected after 48h of sleep recovery (Onen et al. 2000;Onen et al. 2001)

As observed in Figure 2b a continuous reduction in EP24.15 activity becomes significant between SR24 and SR48 in the cortex and overpass CTRL values at SR96. A significant increase was also observed at SR48 and SR96 in the hippocampus (Fig 2d). Although displaced by 24h, these results are quite parallel to the nociception changes observed by Onen group (Onen et al. 2000;Onen et al. 2001). A decrease in EP24.15 would account for less enkephalins production and an increase in nociception. These results could explain why there was no effect of enkephalinase inhibition to revert PSD induced nociception as there are no enkephalins to be saved. Moreover orphanin/nociceptin will not be hydrolyzed and may contribute no increased nociception at this supra-spinal level (Lambert 2008). The opposed can be expected at SR96 where an increase of EP24.15 activity, in both cortex and hippocampus, was observed. Although the antinociceptive effect observed by Onen et al, in rats and humans beings, was more related to the slow wave sleep (SWS) period, it is well known that around 35% of SWS is suppressed in the modified multiple platform method of PSD and could account for this effect. Curiously, neurotensin, a known *in vitro* substrate for EP24.15, which would be unaffected under PSD conditions, does not seem to participate in counteracting the nociceptive effect of PSD.

In contrast to the cortex, in the brainstem the consistent reduction of mRNA at PSD96 and SR24 slowly returns to CTRL values during the next periods but is not paralleled by EP24.15 activity. It is interesting to note that opioids are essential in the brainstem control of respiration (Lalley 2008) and, in general, depressants to the respiratory network. It is thus tempting to speculate that long term chronic exposition to SD could account for changes in EP24.15 mRNA and finally to changes in activity. The possible resulting unbalance of opioid metabolism in brainstem could be related to airways changes in sleep apnoea.

Data on striatum have shown a more straight correlation between mRNA levels and enzyme activity. Except for the enzyme activity at SR24, the general trend is to a reduction in both mRNA levels and EP24.15 activity from PSD96 on, reaching significance at SR48 for the protease. Again, the theoretical consequences of this change would be a rise in dynorphin levels and decrease of enkephalins in the striatum. The complex interplay between dopamine, dopamine receptors and opioids in the striatum (Steiner and Gerfen 1998;Lena et al. 2008;Volkow et al. 2009) would require a more detailed analysis of these changes, mainly at the anatomical level, to drive functional conclusions, as from the present results we cannot say whether different areas of the striatum are differently affected. Nonetheless it is quite conceivable that a rise in dynorphins and a decrease on enkephalins availability is part of the compensatory mechanisms to the dopaminergic over activity, mainly at striatal D2 receptor level (Tufik et al. 1978;Nunes et al. 1994;Tufik et al. 2009)observed at PSD. Nonetheless it cannot be ruled out that these changes in EP24.15 activity and

consequent modifications of opioid peptides balance in fact precedes and are, at least partially, responsible for the well known changes in striatal dopaminergic activity at PSD.

Sleep deprivation is known to induce profound physiological modifications in human beings and animals. We have used an animal model of PSD to evaluate potential changes on the expression and activity of the endopeptidase EC 24.15 (EP24.15), a proteolytic enzyme known to be involved in the processing of neuropeptides. Our results indicate that changes in EP24.15 should be followed by the determination of activity as both, mRNA and protein level detection can miss changes in activity triggered by post-translational modifications like phosphorylation, glutathionylation and redox status of the cell or extracellular medium. In different brain tissues we observed changes on EC24.15 activity, after PSD and during the sleep recovery period, that can be related to endocrine changes like GnRH processing at the hypothalamus, pain sensitivity due to opioid peptides processing, sleep apnoea and dopaminergic striatal over activity. Those observations surely deserve more detailed experiments in order to detect the levels of neuropeptides and the consequences of EC 24.15 inhibition, overexpression or knock-out in PSD models but they clearly indicate that peptidases can be important players in understanding the effects of sleep related conditions.

Figures Legend

Figure 1. EP24.15 specific activities measured in different CNS tissues using the fluorogenic substrate Abz-GFDPFRQ-EDDnp (10 μ M) (Oliveira et al. 2001). Incubations were carried out in triplicate in 50mM Tris-HCl pH7.4, NaCl 100mM, Triton X-100 0.1% buffer at 37 °C. JA-2 (Shrimpton et al. 2000) 2 μ M was used for EC24.15 specific inhibition.

Figure 2. Box Plot representation for EP24.15 mRNA relative amount determined by RT-PCR in the cortex (a) and hippocampus (c), specific proteolytic activity in the cortex (b) and hippocampus (d), in control animals (CTRL), animals submitted to 96h paradoxical sleep deprivation (PSD96) and sleep recovery for 24 h (SR24), 48 h (SR48) and 96 h (SR96) after PSD. b) *different from CTRL, PSD96, SR24h and SR96 ($p < 0.005$) and \S different from SR96 ($p < 0.01$) in the cortex. d) *different from CTRL $p < 0.005$ and \S different from SR24 h in the hippocampus ($p < 0.005$).

Figure 3. Box Plot representation for EP24.15 mRNA relative amount determined by RT-PCR in the brainstem (a) and striatum(c), specific proteolytic activity in the brainstem(b) and striatum (d), in control animals (CTRL), animals submitted to 96h paradoxical sleep deprivation (PSD96) and sleep recovery for 24 h (SR24), 48 h (SR48) and 96 h (SR96) after PSD. (a) * different from CTRL ($p < 0.001$). (b) *different from CTRL, SR24 and SR96 ($p < 0.01$). (d) * different from CTRL ($p < 0.01$).

Figure 4. Box Plot representation for EP24.15 mRNA relative amount determined by RT-PCR (a), protein expression by Immunoblotting (b) and specific proteolytic activity (c) in the hypothalamus of control animals (CTRL), animals submitted to 96h paradoxical sleep deprivation (PSD96) and sleep recovery for 24 h (SR24), 48 h (SR48) and 96 h (SR96) after PSD. (b) *different from SR96 ($p < 0.001$). (c) *different from CTRL ($p < 0.001$) and \S different from SR96 ($p < 0.005$).

Figure 1

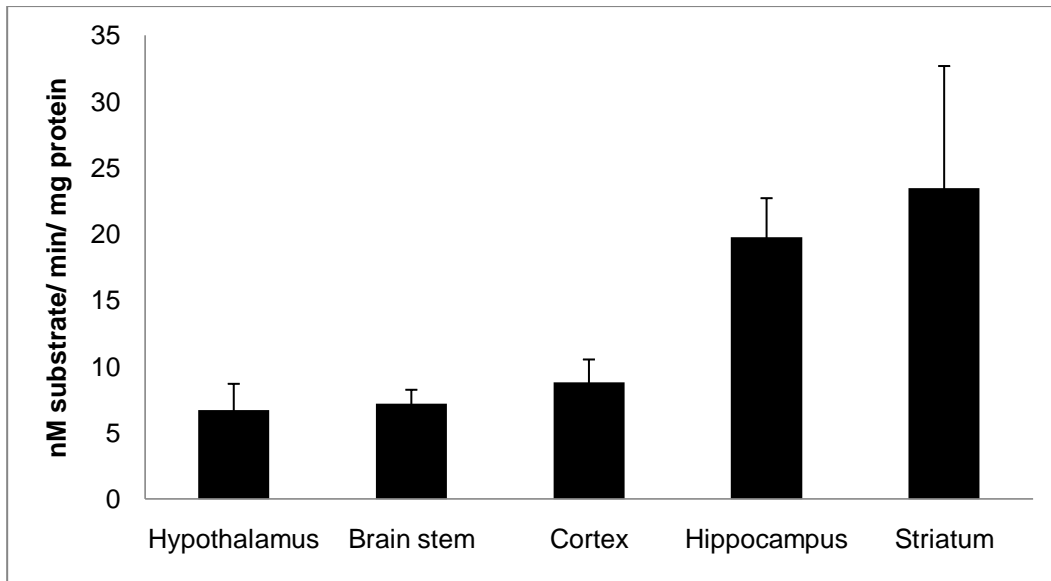


Figure 2

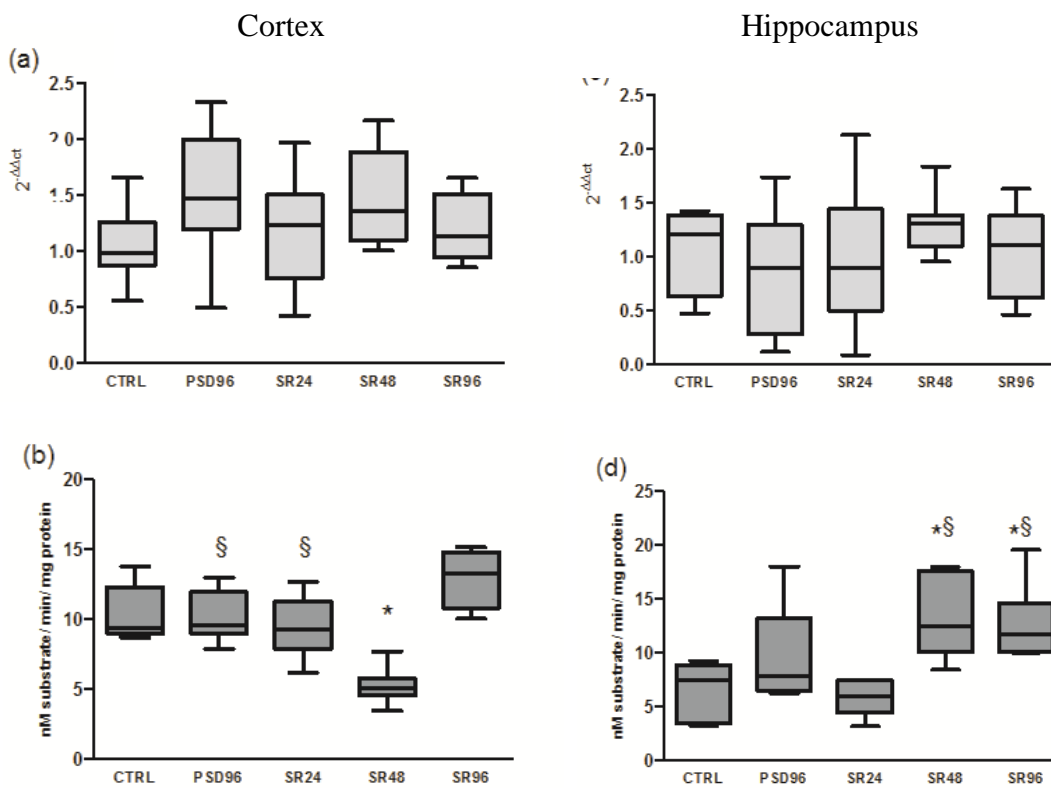


Figure 3

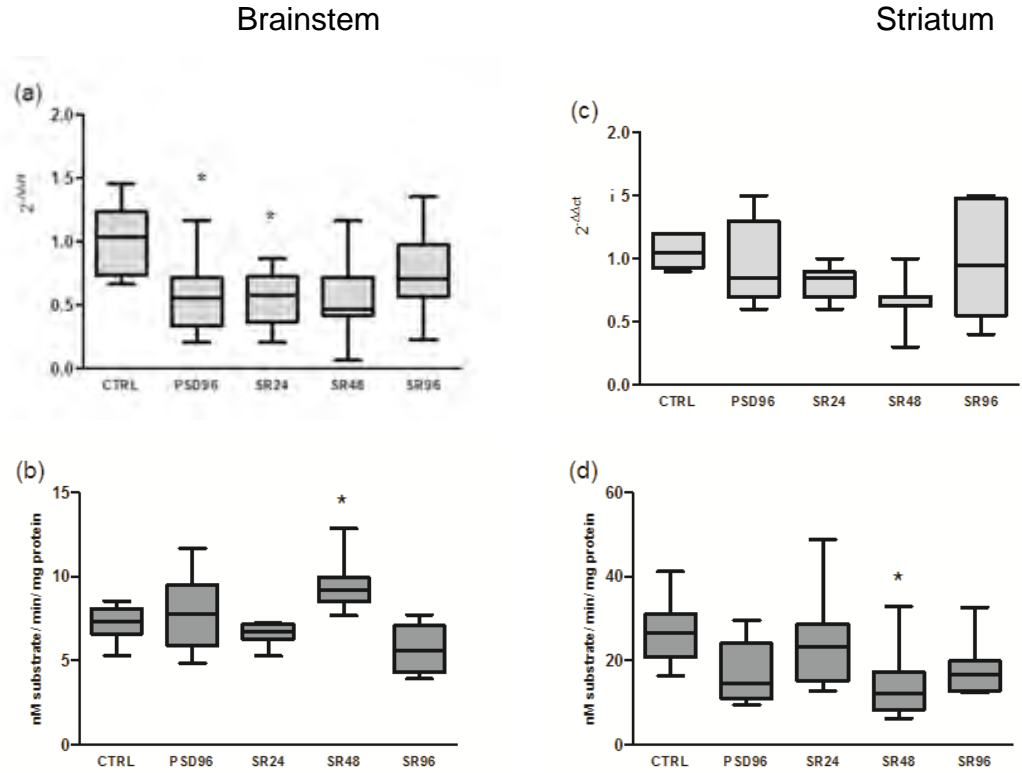
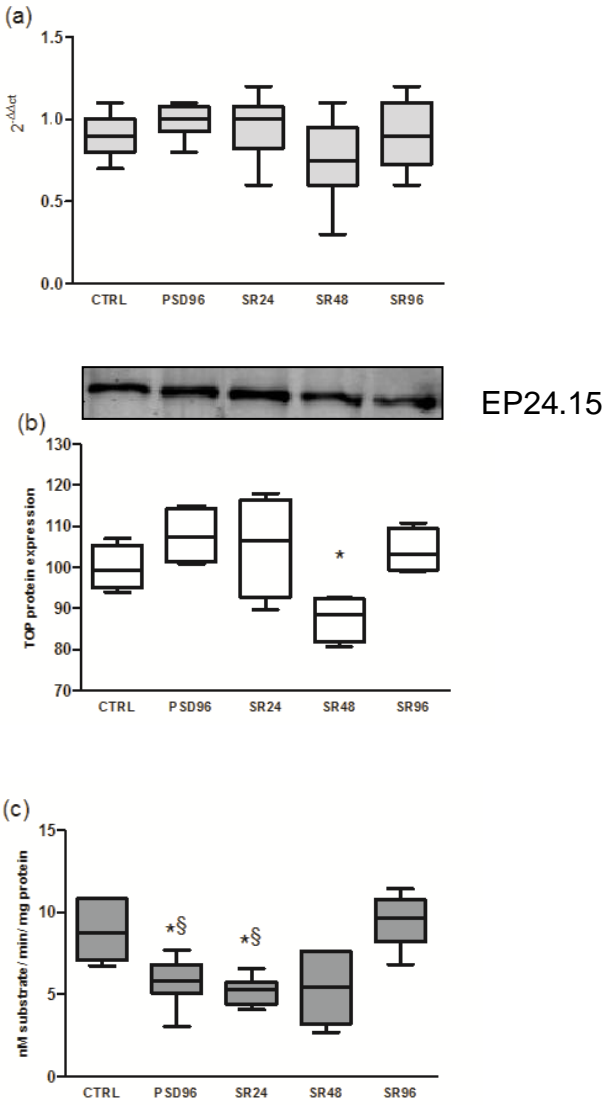


Figure 4 Hypothalamus



Acknowledgements: This work was supported by grants from FAPESP (CEPID 98/01228-4), CNPq and AFIP.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interests.

Reference List

Acker G. R., Molineaux C., and Orlowski M. (1987) Synaptosomal Membrane-Bound Form of Endopeptidase-24.15 Generates Leu-Enkephalin from Dynorphin1-8, Alpha-Neuendorphin-Beta-Neoendorphin, and Met-Enkephalin from Met-Enkephalin-Arg6-Gly7-Leu8. *Journal of Neurochemistry* **48**, 284-292.

An X. F., Niu Y. F., Ten S. C., Liu J. S., Feng H., He M., and Shen X. J. (2008) Orphanin FQ and glutamate connection in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion in the preoptic area of conscious male rats. *Neuroscience Letters* **440**, 109-112.

Andersen ML, D'Almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF, Magalhães LE, and Tufik S (2004) Experimental procedure, in *Ethical and practical principles of the use of laboratory animals*. pp. 45-69. Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil.

Andersen M. L., Martins P. J. F., D'Almeida V., Bignotto M., and Tufik S. (2005) Endocrinological and catecholaminergic alterations during sleep deprivation and recovery in male rats. *Journal of Sleep Research* **14**, 83-90.

Andersen M. L., Nascimento D. C., Machado R. B., Roizenblatt S., Moldofsky H., and Tufik S. (2006) Sleep disturbance induced by substance P in mice. *Behavioural Brain Research* **167**, 212-218.

Bacsa B., Desai B., Dibo G., and Kappe C. O. (2006) Rapid solid-phase peptide synthesis using thermal and controlled microwave irradiation. *Journal of Peptide Science* **12**, 633-638.

Born J., Kellner C., Uthgenannt D., Kern W., and Fehm H. L. (1992) Vasopressin Regulates Human Sleep by Reducing Rapid-Eye-Movement Sleep. *American Journal of Physiology* **262**, E295-E300.

Bradford M. M. (1976) Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.

Cape E. G., Manns I. D., Alonso A., Beaudet A., and Jones B. E. (2000) Neurotensin-induced bursting of cholinergic basal forebrain neurons promotes gamma and theta cortical activity together with waking and paradoxical sleep. *Journal of Neuroscience* **20**, 8452-8461.

Carreno F. R., Goni C. N., Castro L. M., and Ferro E. S. (2005) 14-3-3 epsilon modulates the stimulated secretion of endopeptidase 24.15. *Journal of Neurochemistry* **93**, 10-25.

Cunha F. M., Berti D. A., Ferreira Z. S., Klitzke C. F., Markus R. P., and Ferro E. S. (2008) Intracellular peptides as natural regulators of cell signaling. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 24448-24459.

D'Almeida V., Hipolide D. C., Raymond R., Barlow K. B. L., Parkes J. H., Pedrazzoli M., Tufik S., and Nobrega J. N. (2005) Opposite effects of sleep rebound on orexin OX1 and OX2 receptor expression in rat brain. *Molecular Brain Research* **136**, 148-157.

Dauch P., Vincent J. P., and Checler F. (1991) Specific-Inhibition of Endopeptidase-24.16 by Dipeptides. *European Journal of Biochemistry* **202**, 269-276.

Demasi M., Piassa G. M., Castro L. M., Ferreira J. C., Rioli V., and Ferro E. S. (2008) Oligomerization of the cysteinyl-rich oligopeptidase EP24.15 is triggered by S-glutathionylation. *Free Radical Biology and Medicine* **44**, 1180-1190.

Dhandapani K. M. and Brann D. W. (2002) Orphanin FQ inhibits GnRH secretion from rat hypothalamic fragments but not GTI-7 neurons. *Neuroreport* **13**, 1247-1249.

Foradori C. D., Amstalden M., Coolen L. M., Singh S. R., McManus C. J., Handa R. J., Goodman R. L., and Lehman M. N. (2007) Orphanin FQ: Evidence for a role in the control of the reproductive neuroendocrine system. *Endocrinology* **148**, 4993-5001.

Fricker L. D. (2007) Minireview: Neuropeptidomics to study peptide processing in animal models of obesity. *Endocrinology* **148**, 4185-4190.

Fricker L. D., Lim J. Y., Pan H., and Che F. Y. (2006) Peptidomics: identification and quantification of endogenous peptides in neuroendocrine tissues. *Mass Spectrometry Reviews* **25**, 327-344.

Gulpinar M. A. and Yegen B. C. (2004) The physiology of learning and memory: Role of peptides and stress. *Current Protein & Peptide Science* **5**, 457-473.

Healy D. P. and Orlowski M. (1992) Immunocytochemical Localization of Endopeptidase 24.15 in Rat-Brain. *Brain Research* **571**, 121-128.

Hook V., Funkelstein L., Lu D., Bark S., Wegrzyn J., and Hwang S. R. (2008) Proteases for processing proneuropeptides into peptide neurotransmitters and hormones. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **48**, 393-423.

Institute of Laboratory Animal Resources (1996) *Guide for the care use of laboratory animals*, National Academy Press, Washington (DC).

Kaneita Y., Uchiyama M., Yoshiike N., and Ohida T. (2008) Associations of usual sleep duration with serum lipid and lipoprotein levels. *Sleep* **31**, 645-652.

Lalley P. M. (2008) Opioidergic and dopaminergic modulation of respiration. *Respiratory Physiology & Neurobiology* **164**, 160-167.

Lambert D. G. (2008) The nociceptin/orphanin FQ receptor: a target with broad therapeutic potential. *Nature Reviews Drug Discovery* **7**, 694-U11.

Lautenbacher S., Kundermann B., and Krieg J. C. (2006) Sleep deprivation and pain perception. *Sleep Medicine Reviews* **10**, 357-369.

Lena I., Bradshaw S., Pintar J., and Kitchen I. (2008) Adaptive changes in the expression of central opioid receptors in mice lacking the dopamine D2 receptor gene 393. *Neuroscience* **153**, 773-788.

Lew R. A., Tetaz T. J., Glucksman M. J., Roberts J. L., and Smith A. I. (1994) Evidence for A 2-Step Mechanism of Gonadotropin-Releasing-Hormone Metabolism by Prolyl Endopeptidase and Metalloendopeptidase Ec-3.4.24.15 in Ovine Hypothalamic Extracts. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 12626-12632.

Machado M. F. M., Cunha F. M., Berti D. A., Heimann A. S., Klitzke C. F., Rioli V., Oliveira V., and Ferro E. S. (2006) Substrate phosphorylation affects degradation and interaction to endopeptidase 24.15, neurolysin, and angiotensin-converting enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **339**, 520-525.

Machado R. B., Hipolide D. C., Benedito-Silva A. A., and Tufik S. (2004) Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique: quantification of sleep loss and recovery. *Brain Research* **1004**, 45-51.

Mani S. K. (2006) Signaling mechanisms in progesterone-neurotransmitter interactions. *Neuroscience* **138**, 773-781.

Martins P. J., Marques M. S., Tufik S., and D'Almeida V. (2010) Orexin activation precedes increased NPY expression, hyperphagia and metabolic changes in response to sleep deprivation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*

Montiel J. L., Cornille F., Roques B. P., and Noble F. (1997) Nociceptin/orphanin FQ metabolism: Role of aminopeptidase and endopeptidase 24.15. *Journal of Neurochemistry* **68**, 354-361.

Nascimento D. C., Andersen M. L., Hipolide D. C., Nobrega J. N., and Tufik S. (2007) Pain hypersensitivity induced by paradoxical sleep deprivation is not due to altered binding to brain mu-opioid receptors. *Behavioural Brain Research* **178**, 216-220.

Noble F. and Roques B. P. (1997) Association of aminopeptidase N and endopeptidase 24.15 inhibitors potentiate behavioral effects mediated by nociceptin/orphanin FQ in mice. *Febs Letters* **401**, 227-229.

Nunes G. P., Tufik S., and Nobrega J. N. (1994) Autoradiographic Analysis of D-1 and D-2 Dopaminergic Receptors in Rat-Brain After Paradoxical Sleep-Deprivation. *Brain Research Bulletin* **34**, 453-456.

Obal F. and Krueger J. M. (2004) GHRH and sleep. *Sleep Medicine Reviews* **8**, 367-377.

Oliveira V., Campos M., Melo R. L., Ferro E. S., Camargo A. C. M., Juliano M. A., and Juliano L. (2001) Substrate specificity characterization of recombinant metallo oligopeptidases oligopeptidase and neurolysin. *Biochemistry* **40**, 4417-4425.

Onen S. H., Alloui A., Eschallier A., and Dubray C. (2000) Vocalization thresholds related to noxious paw pressure are decreased by paradoxical sleep deprivation and increased after sleep recovery in rat. *Neuroscience Letters* **291**, 25-28.

Onen S. H., Alloui A., Gross A., Eschallier A., and Dubray C. (2001) The effects of total sleep deprivation, selective sleep interruption and sleep recovery on pain tolerance thresholds in healthy subjects. *Journal of Sleep Research* **10**, 35-42.

Pedrazzoli M., D'Almeida V., Martins P. J. F., Machado R. B., Ling L., Nishino S., Tufik S., and Mignot E. (2004) Increased hypocretin-1 levels in cerebrospinal fluid after REM sleep deprivation. *Brain Research* **995**, 1-6.

Pierotti A. R., Lasdun A., Ayala J. M., Roberts J. L., and Molineaux C. J. (1991) Endopeptidase-24.15 in Rat Hypothalamic Pituitary Gonadal Axis. *Molecular and Cellular Endocrinology* **76**, 95-103.

Portaro F. C. V., Hayashi M. A. F., Silva C. L., and de Camargo A. C. M. (2001) Free ATP inhibits oligopeptidase (EC 3.4.24.15) activity, induces autophosphorylation in vitro, and controls oligopeptide degradation in macrophage. *European Journal of Biochemistry* **268**, 887-894.

Ray K., Hines C. S., Coll-Rodriguez J., and Rodgers D. W. (2004) Crystal structure of human oligopeptidase provides insight into substrate recognition, regulation, and localization. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 20480-20489.

Rholam M. and Fahy C. (2009) Processing of peptide and hormone precursors at the dibasic cleavage sites. *Cellular and Molecular Life Sciences* **66**, 2075-2091.

Rioli V., Kato A., Portaro F. C. V., Cury G. K., te Kaat K., Vincent B., Checler F., Camargo A. C. M., Glucksman M. J., Roberts J. L., Hirose S., and Ferro E. S. (1998) Neuropeptide specificity and inhibition of recombinant isoforms of the endopeptidase 3.4.24.16 family: Comparison with the related recombinant endopeptidase 3.4.24.15. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **250**, 5-11.

Rossmann W. G. (1998) The impact of sleep on gonadotropin secretion. *Gynecological Endocrinology* **12**, 381-389.

Russo L. C., Goni C. N., Castro L. M., Asega A. F., Camargo A. C. M., Trujillo C. A., Ulrich H., Glucksman M. J., Scavone C., and Ferro E. S. (2009) Interaction with calmodulin is important for the secretion of oligopeptidase following stimulation. *Febs Journal* **276**, 4358-4371.

Shrimpton C. N., Abbenante G., Lew R. A., and Smith A. I. (2000) Development and characterization of novel potent and stable inhibitors of endopeptidase EC 3.4.24.15. *Biochemical Journal* **345**, 351-356.

Shrimpton C. N., Smith A. I., and Lew R. A. (2002) Soluble metalloendopeptidases and neuroendocrine signaling. *Endocrine Reviews* **23**, 647-664.

Shrimpton C. N., Wolfson A. J., Smith A. I., and Lew R. A. (2003) Regulators of the neuropeptide-degrading enzyme, EC 3.4.24.15 (oligopeptidase), in cerebrospinal fluid. *Journal of Neuroscience Research* **74**, 474-478.

Silva C. L., Portaro F. C. V., Bonato V. L. D., de Camargo A. C. M., and Ferro E. S. (1999) oligopeptidase (EC 3.4.24.15), a novel protein on the route of MHC class I antigen presentation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **255**, 591-595.

Simpson N. and Dinges D. F. (2007) Sleep and inflammation. *Nutrition Reviews* **65**, S244-S252.

Smith A. I., Lew R. A., Shrimpton C. N., Evans R. G., and Abbenante G. (2000) A novel stable inhibitor of endopeptidases EC 3.4.24.15 and 3.4.24.16 potentiates bradykinin-induced hypotension. *Hypertension* **35**, 626-630.

Steiger A. (2007) Neurochemical regulation of sleep. *Journal of Psychiatric Research* **41**, 537-552.

Steiner H. and Gerfen C. R. (1998) Role of dynorphin and enkephalin in the regulation of striatal output pathways and behavior
390. *Experimental Brain Research* **123**, 60-76.

Tufik S., Andersen M. L., Bittencourt L. R. A., and de Mello M. T. (2009) Paradoxical Sleep Deprivation: neurochemical, hormonal and behavioral alterations. Evidence from 30 years of research. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* **81**, 521-538.

Tufik S., Lindsey C. J., and Carlini E. A. (1978) Does Rem-Sleep Deprivation Induce A Supersensitivity of Dopaminergic Receptors in Rat-Brain. *Pharmacology* **16**, 98-105.

Tullai J. W., Cummins P. M., Pabon A., Roberts J. L., Lopingeo M. C., Shrimpton C. N., Smith A. I., Martignetti J. A., Ferro E. S., and Glucksman M. J. (2000) The neuropeptide processing enzyme EC 3.4.24.15 is modulated by protein kinase A phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 36514-36522.

Ukponmwan O. E., Ruprecht J., and Dzoljic M. R. (1984) Rem-Sleep Deprivation Decreases the Antinociceptive Property of Enkephalinase-Inhibition, Morphine and Cold-Water-Swim. *General Pharmacology* **15**, 255-258.

Van Cauter E., Splegel K., Tasali E., and Leproult R. (2008) Metabolic consequences of sleep and sleep loss. *Sleep Medicine* **9**, S23-S28.

Volkow N. D., Tomasi D., Wang G. J., Telang F., Fowler J. S., Wang R. L., Logan J., Wong C., Jayne M., and Swanson J. M. (2009) Hyperstimulation of striatal D2 receptors with sleep deprivation: Implications for cognitive impairment. *Neuroimage* **45**, 1232-1240.

Wolk R., Gami A. S., Garcia-Touchard A., and Somers V. K. (2005) Sleep and cardiovascular disease. *Current Problems in Cardiology* **30**, 625-662.

Wolk R. and Somers V. K. (2007) Sleep and the metabolic syndrome. *Experimental Physiology* **92**, 67-78.

Wu T. J., Pagano E., and Mani S. K. (2009) A Biological Role for the Gonadotrophin-Releasing Hormone (GnRH) Metabolite, GnRH-(1-5)
1. *Journal of Neuroendocrinology* **21**, 293-298.

Wu T. J., Pierotti A. R., Jakubowski M., Sheward W. J., Glucksman M. J., Smith A. I., King J. C., Fink G., and Roberts J. L. (1997) Endopeptidase EC 3.4.24.15 presence in the rat median eminence and hypophysial portal blood and its modulation of the luteinizing hormone surge. *Journal of Neuroendocrinology* **9**, 813-822.

Manuscrito 2

The Effect of Paradoxical Sleep Deprivation on angiotensin I-converting enzyme (ACE) Expression and Activity in Rat Central Nervous System.

Authors: Bruna Visniauskas ^a, Vitor Oliveira ^b, Adriana K. Carmona ^b, Robson Lopes de Melo^c, Vânia D´Almeida ^{a,d}, Sérgio Tufik ^a, Jair Ribeiro Chagas ^{a,e,*}

^a Department of Psychobiology, Universidade Federal de São Paulo, SP, Brazil

^b Department of Biophysics, Universidade Federal de São Paulo, SP, Brazil

^c Center for Applied Toxinology (CAT/CEPID), Butantan Institute, SP, Brazil

^d Department of Biosciences, Universidade Federal de São Paulo, SP, Brazil

^e Department of Health Sciences, Universidade Federal de São Paulo, SP, Brazil

*Corresponding author at: Department of Psychobiology, Universidade Federal de São Paulo, Rua Napoleão de Barros, 925, 3º andar, São Paulo, SP 04024-002, Brazil. Tel.: +55 11 2149 0155x189; fax: +55 11 2149 0155.

E-mail address: jchagas1@gmail.com (Chagas, J.R.)

Running title:

ACE activity and expression changes in the CNS after paradoxical sleep deprivation

Summary

Proteolytic activities are essential either for neuropeptides liberation from active or inactive proteic precursors or for their inactivation. Neuropeptides have a fundamental role on sleep-wake cycle regulation and their actions are probably also regulated by proteolytic processing. Using fluorescence resonance energy transfer substrates, specific protease inhibitors and RT-PCR, we have demonstrated changes in angiotensin I-converting enzyme (ACE - EC 3.4.15.1) expression and proteolytic activity in the central nervous system an animal model of paradoxical sleep deprivation (PSD) during 96 h (PSD96). Male rats were distributed in 5 groups (PSD96, 24h, 48h and 96h of sleep recovery after PSD96 and control). ACE activity and mRNA levels were measured in hypothalamus, hippocampus, brainstem, cortex and striatum tissue extracts. In the hypothalamus, the significant decrease in both, activity and mRNA levels, observed at PSD96 was only totally reversed after 96h of sleep recovery. Curiously in the brainstem and hippocampus, albeit significative, changes in mRNA do not parallel changes on ACE specific activity. Changes on ACE activity could affect angiotensin II generation, angiotensin 1-7, bradykinin and opioid peptides metabolism. Additionally, as has recently been shown, ACE is also a signal transducing molecule. ACE expression and activity modifications are probably related to some of the physiological changes (cardiovascular, stress, cognition, metabolism function, water and energy balance) observed during and after paradoxical sleep deprivation.

Keywords: angiotensin I-converting enzyme, paradoxical sleep deprivation, central nervous system, proteolytic enzymes, angiotensin, hypothalamus.

1. Introduction

A complete understanding of sleep functions seems to be yet a long term task, nonetheless many of the effects of sleep deficit or sleep poor quality are known from sleep deprivation (SD) studies in humans and in animal models. SD has been shown to induce profound general physiologic changes (Wolk et al. 2005;Simpson and Dinges 2007;Wolk and Somers 2007;Kaneita et al. 2008;Tufik et al. 2009). These include modifications on sexual behavior, cardiovascular parameters, oxidative stress, anxiety and depression, learning and memory, energy balance, insulin resistance, obesity, apnea, among others. Most of these effects are in some way, directly or indirectly, related to changes on the central nervous system. Neuropeptides have also been shown to be involved in the effects of SD in the CNS (Steiger 2007). Both as neurotransmitters and endocrine effectors, neuropeptides like GnRH (Rossmanith 1998), somatostatin (Obal and Krueger 2004), vasopressin (Born et al. 1992), neurotensin (Cape et al. 2000), substance P (Andersen et al. 2006), neuropeptide Y (Martins et al. 2010), GH, ACTH, CRH (Steiger 2007), orexin/hypocretin (Pedrazzoli et al. 2004;D'Almeida et al. 2005;Galvao et al. 2009) and ghrelin are, among many others, whose dynamics are important for sleep and were shown to be altered under conditions of SD. (Steiger 2007).

As a general rule, which applies equally to the CNS, liberation of active peptides from non active precursors, generation of new ligands from already active precursors or inactivation of endogenous or exogenously generated peptides, are activities under direct control of proteolytic enzymes. (Shrimpton and Smith 2000;Gulpinar and Yegen

2004;Nyberg and Hallberg 2007;Hook et al. 2008;Rholam and Fahy 2009). Beyond this classical view of, mostly, extracellular proteolytic activities, a new level of complexity has become recently evident from the demonstration of a large intracellular peptidergic system, whose complexity has barely been touched. (Fricker et al. 2006;Fricker 2007;Cunha et al. 2008)

Among the proteolytic enzymes families shown to be relevant in the generation and inactivation of neuropeptides, several Zn²⁺ metallopeptidases have been described. Angiotensin I-converting enzyme (EC 3.4.15.1, ACE), neprilysin (EC 3.4.24.11, NEP), angiotensin converting enzyme 2 (EC 3.4.17.23, ACE2), endothelin Converting Enzyme (EC 3.4.24.71, ECE), neurolysin (EC 3.4.24.16) and Thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15, TOP EP24.15) are some examples. ACE, well known to produce angiotensin II (Ang II), is itself a signal transducing molecular (Fleming 2006) and interacts with bradykinin (Bk) B2 receptors (Sabatini et al. 2008).

ACE is an essential part of the renin-angiotensin system (RAS) and several recent reviews emphasize the importance and possible implications of the complete RAS existence in the brain (McKinley et al. 2003;Bohlen und Halbach and Albrecht 2006;Paul et al. 2006;Wright et al. 2008) where it acts to regulate a number of physiological processes.

In PSD models there is a general lack of information on the possible changes that could be induced by sleep loss on the expression, activity, time span or fate of active proteolytic enzymes in general and, in particular, in the CNS. We have than started a

systematic evaluation of these activities in CNS tissues of rats submitted to PSD, beginning with ACE expression and activities.

2. Methods

2.1 Animals

Male *Wistar* rats (3 months of age) were obtained from CEDEME - Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). The animals were housed in a room maintained at 22°C in 12:12 h light–dark cycle (lights on at 07:00 a.m. and off at 19:00 h) inside standard polypropylene cages. All procedures used in the present study complied with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (Institute of Laboratory Animal Resources 1996; Andersen ML et al. 2004); and the experimental protocol was approved by the Ethical Committee of UNIFESP (approval n° 0144/09).

2.2 Paradoxical sleep deprivation (PSD)

Animals were distributed in 5 groups with 8 animals each: PSD96 group was submitted to PSD over a 96h period using the modified multiple platform method (Machado et al. 2004). The sleep recovery (SR) groups were submitted to PSD96 and were studied after 24, 48 and 96 h of SR, generating respectively the SR24, SR48 and SR96. A home-cage control (CTRL) group was kept all the experimental time in the same room sleeping *ad libitum*. During the 96 h PSD period rats were placed inside a water tank (123x44x44cm), filled up to 1cm of the upper border and containing 14 circular platforms, 6.5cm in diameter. Animals could thus move around inside the tank by jumping from one platform to another. When PSD was reached, muscle atonia set in,

animals fell into the water and woke up. Throughout the study room temperature was kept constant ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$) and at light–dark cycle (lights on at 07:00 h and off at 19:00 h). Food and water were provided *ad libitum*. Water in the tank was changed daily throughout the study period.

2.3 Tissue samples

All rats were euthanized by decapitation, in the same day between 8:00 at 10:00 a.m. The hypothalamus, hippocampus, striatum, total cortex and brainstem were removed, either for protein or RNAm extraction (TRIZOL, Invitrogen protocol). For protein extraction tissues were homogenized in 50mM Tris-HCl buffer, pH 7.0, containing NaCl 100mM and 0,1% Triton. Homogenates were centrifuged at $1000g$ for 15 min at 4°C and the supernatant was frozen at -20°C until ACE activity measurements. The protein content was measured by the method of Bradford (Bradford 1976) using bovine serum albumin as standard.

2.4 ACE enzymatic activity

ACE activity on tissue extracts was determined using the fluorescence resonance energy transfer (FRET) peptide Abz-FRK(Dnp)P-OH ($10\ \mu\text{M}$) (Carmona et al. 2006). The substrate was synthesized by a modified standard Fmoc solid phase peptide synthesis protocol, using microwave irradiation (Bacsa et al. 2006), purified by HPLC (Shimadzu, LC-20A Prominence) and characterized by electron-spray mass spectrometry (Varian, 1200L Quadrupole) and amino acid analysis (Shimadzu, LC-10A/C-R7A). The activity assays were performed in Tris-HCl 100 mM pH7.0, NaCl 100 mM, ZnCl_2 10 μM as previously described (Carmona et al. 2006). The reactions were continuously followed in

a Gemini XS, Molecular Devices Company, fluorimeter measuring the fluorescence at $\lambda_{\text{ex}}=320\text{nm}$ and $\lambda_{\text{em}}=420\text{nm}$. Measurements were performed in duplicate, and ACE activity values were reported as nanomolar of substrate hydrolyzed per minute per milligram of protein ($\text{nM} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$).

2.5 Real time PCR

ACE and β -actin mRNA expression in tissue were assessed by SYBR Green real-time PCR using 10 ng of total cDNA, SYBR Green Universal Master Mix (Applied Biosystems), and the following set of primers independently: ACE (5'CGGTTTTTCATGAGGCTATTGG 3' and 5'TCGTAGCCCACTGCCCTCACT 3', GenBank accession number NM_012544 and β -actin (5'- AGGCCAACCG TGAAAAGATG -3' and 5'-CCAGAGGCATACAGGGACAAC - 3' GenBank accession number NM_031144.2). ACE and β -actin mRNA expression were obtained from the cycle threshold (Ct) associated with the exponential growth of the PCR products. Quantitative values for ACE mRNA expression were obtained by the parameter $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, in which ΔCt represents the subtraction of the β -actin Ct values from the ACE values.

2.6 Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the STATISTIC 6.0 software. Kruskal-Wallis test was applied for the general comparison of median values and $P<0.05$ was considered statistically significant. Differences between each two groups were evaluated by the Mann–Whitney *U*-test and $P<0.01$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1 Specificity of enzyme activity detection

The FRET substrate Abz-FRK(Dnp)P-OH was shown elsewhere to be specific for ACE in several different tissues (Carmona et al. 2006). In our experimental model we could demonstrate this same specificity. Values for specific enzymatic activities, determined in different CNS tissues, in control animals are represented Figure 1 shows as mean and standard deviation. In all tissues, in parallel assays in presence of lisinopril, 5 μ M final concentration, hydrolysis rate was almost abolished and was the same as the background rate of peptide alone (data not shown).

3.2 ACE activity and gene expression in CNS tissues.

Values for mRNA relative amount from RT-PCR and specific proteolytic activities for ACE, for the different tissues, are presented as point distribution and box plot in Figures 2 to 4. Values for the hypothalamus are presented respectively in Figures 2a and 2b and both parameters show similar profiles. A statistically significant reduction is attained at PSD96 and SR24 ($P < 0.001$) for ACE activity in relation to the control values. These changes were only fully reversed after 96 h of voluntary sleep.

In the hippocampus (Figure 3a and 3b) gene expression, but not enzymatic activity, was reduced ($P < 0.01$). The significant decrease in mRNA could be shown at SR48 (Figure 2b) when compared to CTRL and SR96 ($P < 0.01$).

ACE gene expression in brainstem, as presented in Figure 4, shows a continuous reduction from PSD96 on, attaining statistical significance in relation to CTRL values from SR24 to SR96. These results do not parallel specific activity (Figure 4b) that

reaches a significant reduction ($P < 0,001$) at SR96.

4. Discussion

In the present study we have analyzed the effect of paradoxical sleep deprivation on ACE activity and relative mRNA amount in CNS tissues: hypothalamus, hippocampus, brainstem, striatum and cortex.

Several synthetic substrates for *in vitro* ACE activity determination are described in the literature and those based on FRET are among the most sensitive (for a recent review see Carmona et al. 2009) . Abz-FRK(Dnp)P-OH is an specific FRET substrate that has been used for ACE activity determination in crude homogenates of lung, kidney, heart and liver (Alves et al. 2005). In the present work, we have extended its use for ACE activity determination in CNS crude tissue extracts. In control and experimental animals our results have shown that it is possible to determine the activity of ACE in total tissue extracts obtained from hypothalamus, hippocampus, striatum and cortex of rats. The specificity of the assay was confirmed by the complete inhibition in presence of 5 μ M lisinopril. Assays can be performed in a relatively short time (about 15 min) in 96 well microplates. Figure 1 show the specific ACE activity obtained in different tissues in control animals. As most of known angiotensins dependent actions in the CNS are located in the hypothalamus and brainstem. It is somewhat a surprise to find the lower activity levels in the hypothalamus. Nonetheless many other unknown factors like the turnover rate of ACE in the cytoplasmatic membrane, where it is anchored, and the level of other peptidases in different tissues, can also determine the physiological needs and

relevance of activity levels.

It is reasonable to assume that changes in the expression and activity of ACE results in changes in Ang II generation but also in many other actions as discussed in the end of this section.

As shown in Figures 2a and 2b, a reduction in ACE specific activity and mRNA relative levels, in animals subjected to PSD was observed in the hypothalamus, when compared to the control group. In brainstem, as observed in Figures 3a and 3b, a continuous and significant reduction in mRNA is observed from SR24 until SR96, but reduction on specific ACE activity could only be detected at SR96. No significant changes on ACE activity were observed in the hippocampus, despite a significant reduction in mRNA by RT-PCR at SR48.

Ang II is a multitask peptide in the CNS (Saavedra et al. 2006; Ferguson 2009) and has essential roles in the regulation of central autonomic functions and stress. Ang II is involved in numerous physiological processes in the hypothalamus (Benarroch 2005) and brainstem to control the secretion of oxytocin and vasopressin in the pituitary (Ferguson 2009), fluid intake in subfornical organ (SFO) (McKinley and Johnson 2004), central control of blood pressure in the circumventricular organs (CVOs) (Veerasingham and Raizada 2003) and in stress response (Saavedra et al. 2006).

It has been demonstrated that sleep deprivation is a stressor but the stress response is not equally sustained during PSD and is even attenuated during the recovery period (Meerlo et al. 2002; Sgoifo et al. 2006; Meerlo et al. 2008; Galvao et al. 2009). As Ang II is an essential effector in this stress response, it is quite reasonable to suppose that ACE

activity reduction at PSD and during the recovery period could be involved in the altered stress response. Ang II is known to suppress food intake probably via AT2 receptors (Porter and Potratz 2004;Ohinata et al. 2008). In this sense, hyperphagia observed during PSD (Hipolide et al. 2006;Martins et al. 2006;Koban et al. 2008) is also an effect that could be related to reduction on Ang II availability.

In male rats it was shown that PSD induces a significant reduction in testosterone and estrone plasmatic levels (Andersen et al. 2005) that return to basal levels in time periods quite correlated to the return observed for ACE in hypothalamus in the present work. Moreover prolactin levels were also elevated in PSD (Andersen et al. 2005). Quite interestingly in male rats, submitted to an immobilization stress model, but not in non stressed animals, the Ang II receptor antagonist saralasin, intracerebroventricular (icv) administration, induced a fourfold increase in prolactin serum levels when compared to controls (Myers and Steele 1991). These results suggest that PSD associated stress allied to ACE activity reduction in the hypothalamus could be responsible for the observed prolactin levels increase. Ang II injection in the median preoptic area of unprimed ovariectomized rats induces a sharp increase in LH release, probably via LHRH secretion (Franci et al. 1990). The effects are reversed by the angiotensin AT1 receptor antagonist, losartan. Many other evidences indicate Ang II as an important factor in central regulation of sex hormones (Ganong 1995). Alteration in sexual hormones during and after PSD (Andersen et al. 2005) could also be related to the changes in ACE proteolytic activity observed in our work. Reduction in Ang II formation will probably result in reduction of LHRH liberation and less FSH or LH release and,

finally, less testosterone and estradiol/estrone.

Although ACE is usually seen as a key link in the RAS, participating in the formation of Ang II, Ang II by itself is just part of a cascade that can generate, through other peptidases, Ang 1-7, Ang III and Ang IV which are normally present in the CNS (Grobe et al. 2008). Ang 1-7 opposes most of Ang II effects and can be formed directly from angiotensin I by other peptidases (Trask and Ferrario 2007). Ang IV has been shown to be an important factor in memory and learning processes (Braszko 2006;Wright et al. 2008) and both functions are among the most affected by PSD in rat models (Silva et al. 2004) e guan. E tufik

ACE is also able to hydrolyze bradykinin, substance P, opioid peptides, corticotrophin (Merops database 2010), hemopressin (Rioli et al. 2003), amyloid β -protein (Miners et al. 2008). Bradykinin is a classical substrate inactivated by ACE, with a central role in inflammatory processes, pain perception, immune function and vascularization. Opioid peptides, like endorphins and enkephalins, are ACE substrates whose dynamics is probably altered by changes in ACE activity with consequences in pain perception (Akahori et al. 2008).

Moreover ACE can dimerize, interact with carboxypeptidase M in cell membrane (Sun et al. 2008); affect B1 and B2 receptors activities and also acts as a signaling molecule in cell membrane, triggering effects like increase in the levels of COX-2 (Fleming 2006;Lambert et al. 2010). All these available data let to the conclusion that the lack of the protein, due to a reduced expression, should have consequences well beyond its catalytic effect on Ang II formation. These consequences, yet to be addressed, should

be completely different from its simple inhibition by ACE inhibitors. Whether or not the observed effects of PSD, on this animal model, on ACE activity and expression, are present in conditions of chronic sleep deprivation or restriction in animals or human beings is an open question. Further studies will allow us to particularize the specific areas of tissues where these changes take place and evaluate the effect, *in vivo*, of these changes on the levels and activity of possibly involved neuropeptides and receptors.

Figure 1

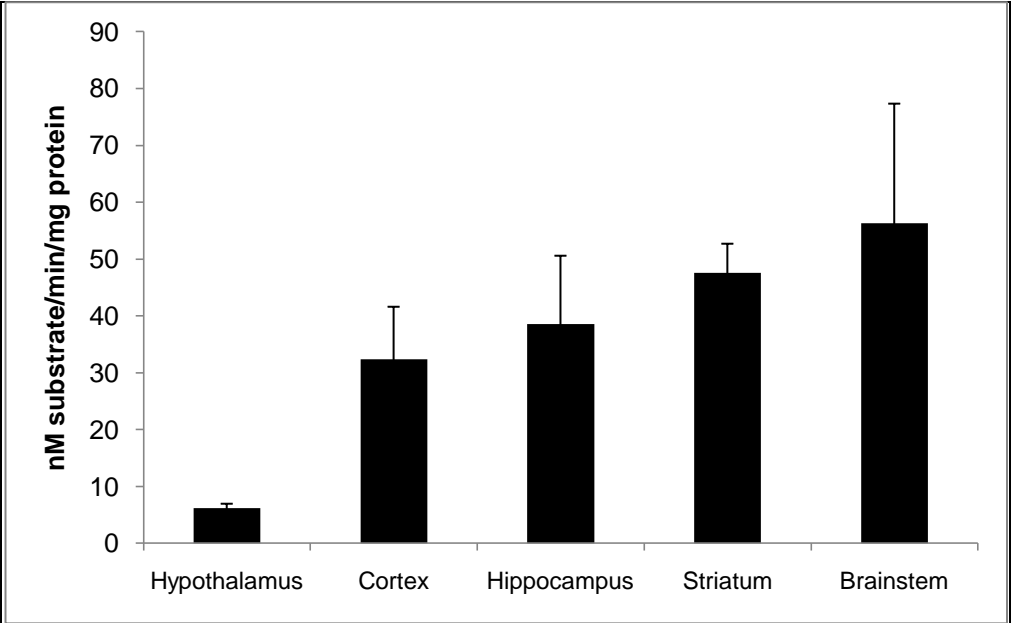


Figure 2
Hypothalamus

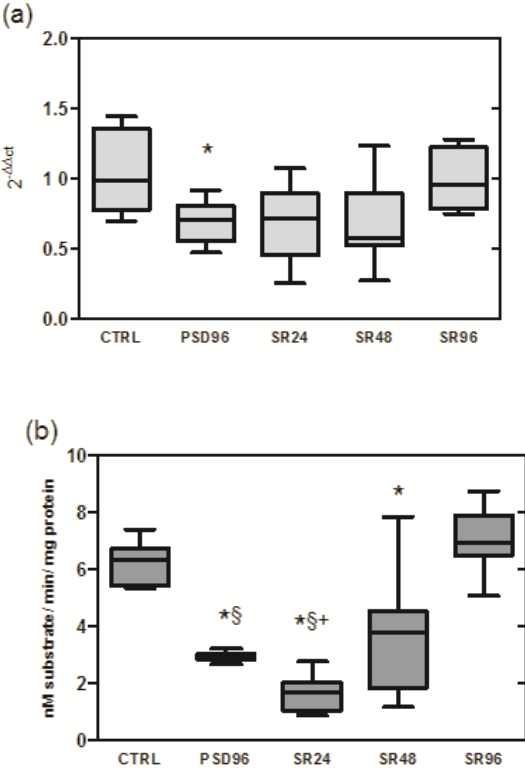


Figure 3
Hippocampus

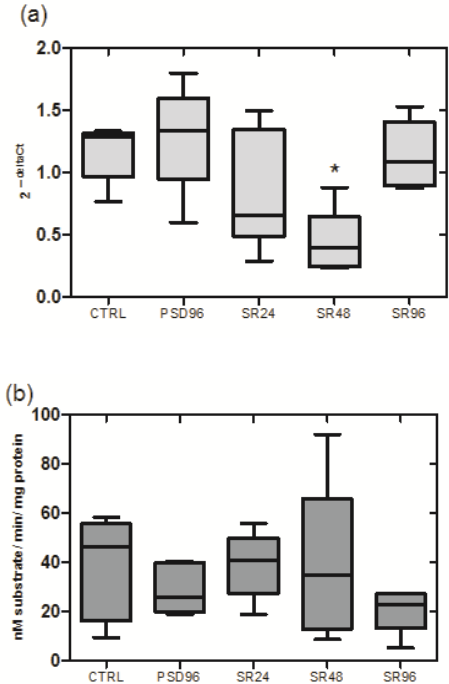


Figure 4
Brainstem

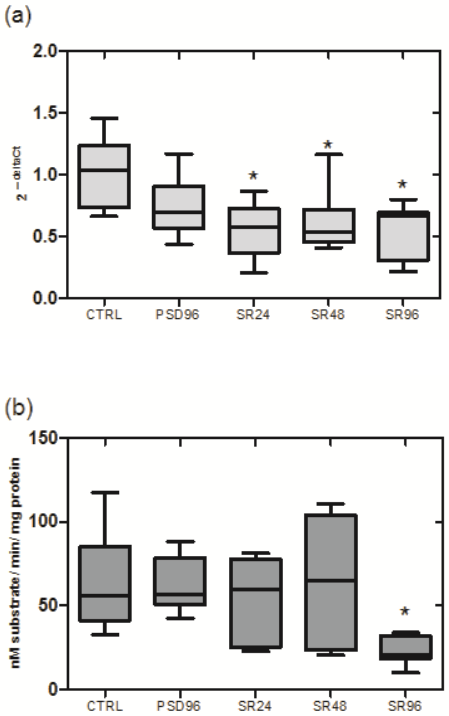


Figure legends

Figure 1. Abz-FRK(Dnp)P-OH hydrolysis rate by crude extracts from different CNS tissues. Incubations were performed in 100mM Tris-HCl pH7.0, 100mM NaCl, 10 μ M ZnCl₂ buffer at 37°C.

Figure 2. Box Plot representation for ACE mRNA relative amount determined by RT-PCR in the hypothalamus (a) and specific proteolytic activity (b), in control animals (CTRL), animals submitted to 96h paradoxical sleep deprivation (PSD96) and sleep recovery for 24h (SR24), 48h (SR48) and 96h (SR96) after PSD. a) *different from SR96 ($p < 0.005$). b) *different from CTRL ($p < 0.005$), §different from SR96 ($p < 0.001$) and +different from SR24 ($p < 0.01$)

Figure 3. Box Plot representation for ACE mRNA relative amount determined by RT-PCR in the hippocampus (a) and specific proteolytic activity (b), in control animals (CTRL), animals submitted to 96h paradoxical sleep deprivation (PSD96) and sleep recovery for 24h (SR24), 48h (SR48) and 96h (SR96) after PSD. a) *different from SR48 ($p < 0.01$).

Figure 4. Box Plot representation for ACE mRNA relative amount determined by RT-PCR in the brainstem (a) and specific proteolytic activity (b), in control animals (CTRL), animals submitted to 96h paradoxical sleep deprivation (PSD96) and sleep recovery for 24 h (SR24), 48 h (SR48) and 96 h (SR96) after PSD. a) *different from CTRL ($p < 0.01$). b) *different from CTRL, PSD96, SR24h and SR48 ($p < 0.01$).

Acknowledgements: This work was supported by grants from FAPESP (CEPID 98/01228-4), CNPq and AFIP.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interests.

Reference List

Akahori K, Kosaka K, Jin XL, Arai Y, Yoshikawa M, Kobayashi H, Oka T (2008) Great increase in antinociceptive potency of [Leu(5)]enkephalin after peptidase inhibition. *Journal of Pharmacological Sciences* 106:295-300

Alves MF, Araujo MC, Juliano MA, Oliveira EM, Krieger JE, Casarini DE, Juliano L, Carmona AK (2005) A continuous fluorescent assay for the determination of plasma and tissue angiotensin I-converting enzyme activity. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38:861-868

Andersen ML, D'Almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF, Magalhães LE, Tufik S (2004) Experimental procedure. Ethical and practical principles of the use of laboratory animals. Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil, pp. 45-69

Andersen ML, Martins PJF, D'Almeida V, Bignotto M, Tufik S (2005) Endocrinological and catecholaminergic alterations during sleep deprivation and recovery in male rats. *Journal of Sleep Research* 14:83-90

Andersen ML, Nascimento DC, Machado RB, Roizenblatt S, Moldofsky H, Tufik S (2006) Sleep disturbance induced by substance P in mice. *Behavioural Brain Research* 167:212-218

Bacsa B, Desai B, Dibo G, Kappe CO (2006) Rapid solid-phase peptide synthesis using thermal and controlled microwave irradiation. *Journal of Peptide Science* 12:633-638

Benarroch EE (2005) Paraventricular nucleus, stress response, and cardiovascular disease. *Clinical Autonomic Research* 15:254-263

Bohlen und Halbach O, Albrecht D (2006) The CNS renin-angiotensin system. *Cell and Tissue Research* 326:599-616

Born J, Kellner C, Uthgenannt D, Kern W, Fehm HL (1992) Vasopressin Regulates Human Sleep by Reducing Rapid-Eye-Movement Sleep. *American Journal of Physiology* 262:E295-E300

Bradford MM (1976) Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254

Braszko JJ (2006) D2 dopamine receptor blockade prevents cognitive effects of Ang IV and des-Phe6 Ang IV. *Physiol Behav* 88:152-159

Cape EG, Manns ID, Alonso A, Beaudet A, Jones BE (2000) Neurotensin-induced bursting of cholinergic basal forebrain neurons promotes gamma and theta cortical activity together with waking and paradoxical sleep. *Journal of Neuroscience* 20:8452-8461

Carmona AK, Juliano MA, Juliano L (2009) The use of Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) peptides for measurement of clinically important proteolytic enzymes. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 81:381-392

Carmona AK, Schwager SL, Juliano MA, Juliano L, Sturrock ED (2006) A continuous fluorescence resonance energy transfer angiotensin I-converting enzyme assay. *Nature Protocols* 1:1971-1976

Cunha FM, Berti DA, Ferreira ZS, Klitzke CF, Markus RP, Ferro ES (2008) Intracellular peptides as natural regulators of cell signaling. *Journal of Biological Chemistry* 283:24448-24459

D'Almeida V, Hipolide DC, Raymond R, Barlow KBL, Parkes JH, Pedrazzoli M, Tufik S, Nobrega JN (2005) Opposite effects of sleep rebound on orexin OX1 and OX2 receptor expression in rat brain. *Molecular Brain Research* 136:148-157

Ferguson AV (2009) Angiotensinergic regulation of autonomic and neuroendocrine outputs: critical roles for the subfornical organ and paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* 89:370-376

Fleming I (2006) Signaling by the angiotensin-converting enzyme. *Circulation Research* 98:887-896

Franci CR, Anselmofranci JA, Mccann SM (1990) Angiotensin-li Antiserum Decreases Luteinizing-Hormone-Releasing Hormone in the Median-Eminence and Preoptic Area of the Rat. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 23:899-901

Fricker LD (2007) Minireview: Neuropeptidomics to study peptide processing in animal models of obesity. *Endocrinology* 148:4185-4190

Fricker LD, Lim JY, Pan H, Che FY (2006) Peptidomics: identification and quantification of endogenous peptides in neuroendocrine tissues. *Mass Spectrometry Reviews* 25:327-344

Galvao MDL, Sinigaglia-Coimbra R, Kawakami SE, Tufik S, Suchecki D (2009) Paradoxical sleep deprivation activates hypothalamic nuclei that regulate food intake and stress response. *Psychoneuroendocrinology* 34:1176-1183

Ganong WF (1995) Reproduction and the Renin-Angiotensin System. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 19:241-250

Grobe JL, Xu D, Sigmund CD (2008) An intracellular renin-angiotensin system in neurons: Fact, hypothesis, or fantasy. *Physiology* 23:187-193

Gulpinar MA, Yegen BC (2004) The physiology of learning and memory: Role of peptides and stress. *Current Protein & Peptide Science* 5:457-473

Hipolide DC, Suchecki D, Pinto APD, Faria EC, Tufik S, Faria EC (2006) Paradoxical sleep deprivation and sleep recovery: Effects on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity, energy balance and body composition of rats. *Journal of Neuroendocrinology* 18:231-238

Hook V, Funkelstein L, Lu D, Bark S, Wegrzyn J, Hwang SR (2008) Proteases for processing proneuropeptides into peptide neurotransmitters and hormones. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 48:393-423

Institute of Laboratory Animal Resources (1996) Guide for the care use of laboratory animals. National Academy Press, Washington (DC)

Kaneita Y, Uchiyama M, Yoshiike N, Ohida T (2008) Associations of usual sleep duration with serum lipid and lipoprotein levels. *Sleep* 31:645-652

Koban M, Sita LV, Le WW, Hoffman GE (2008) Sleep deprivation of rats: The hyperphagic response is real. *Sleep* 31:927-933

Lambert DW, Clarke NE, Turner AJ (2010) Not just angiotensinases: new roles for the angiotensin-converting enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67:89-98

Machado RB, Hipolide DC, Benedito-Silva AA, Tufik S (2004) Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique: quantification of sleep loss and recovery. *Brain Research* 1004:45-51

Martins PJF, D'Almeida V, Nobrega JN, Tufik S (2006) A reassessment of the hyperphagia/weight-loss paradox during sleep deprivation. *Sleep* 29:1233-1238

Martins PJF, Marques MS, Tufik S, D'Almeida V (2010) Orexin activation precedes increased NPY expression, hyperphagia, and metabolic changes in response to sleep deprivation. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 298:E726-E734

McKinley MJ, Albiston AL, Allen AM, Mathai ML, May CN, McAllen RM, Oldfield BJ, Mendelsohn FAO, Chai SY (2003) The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35:901-918

McKinley MJ, Johnson AK (2004) The physiological regulation of thirst and fluid intake. *News in Physiological Sciences* 19:1-6

Meerlo P, Koehl M, van der Borght K, Turek FW (2002) Sleep restriction alters the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress. *Journal of Neuroendocrinology* 14:397-402

Meerlo P, Sgoifo A, Suchecki D (2008) Restricted and disrupted sleep: Effects on autonomic function, neuroendocrine stress systems and stress responsivity. *Sleep Medicine Reviews* 12:197-210

Miners JS, Ashby E, Van Helmond Z, Chalmers KA, Palmer LE, Love S, Kehoe PG (2008) Angiotensin-converting enzyme (ACE) levels and activity in Alzheimer's disease, and relationship of perivascular ACE-1 to cerebral amyloid angiopathy. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 34:181-+

Myers LS, Steele MK (1991) The Brain Renin-Angiotensin System and Prolactin Secretion in the Male-Rat. *Endocrinology* 129:1744-1748

Nyberg F, Hallberg M (2007) Peptide conversion - A potential pathway modulating G-protein signaling. *Current Drug Targets* 8:147-154

Obal F, Krueger JM (2004) GHRH and sleep. *Sleep Medicine Reviews* 8:367-377

Ohinata K, Fujiwara Y, Fukumoto S, Iwai M, Horiuchi M, Yoshikawa M (2008) Angiotensin II and III suppress food intake via angiotensin AT(2) receptor and prostaglandin EP4 receptor in mice. *Febs Letters* 582:773-777

Paul M, Poyan MA, Kreutz R (2006) Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 86:747-803

Pedrazzoli M, D'Almeida V, Martins PJF, Machado RB, Ling L, Nishino S, Tufik S, Mignot E (2004) Increased hypocretin-1 levels in cerebrospinal fluid after REM sleep deprivation. *Brain Research* 995:1-6

Porter JP, Potratz KR (2004) Effect of intracerebroventricular angiotensin II on body weight and food intake in adult rats. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 287:R422-R428

Rholam M, Fahy C (2009) Processing of peptide and hormone precursors at the dibasic cleavage sites. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66:2075-2091

Rioli V, Gozzo FC, Heimann AS, Linardi A, Krieger JE, Shida CS, Almeida PC, Hyslop S, Eberlin MN, Ferro ES (2003) Novel natural peptide substrates for endopeptidase 24.15, neurolysin, and angiotensin-converting enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 278:8547-8555

Rossmannith WG (1998) The impact of sleep on gonadotropin secretion. *Gynecological Endocrinology* 12:381-389

Saavedra JM, Benicky J, Zhou J (2006) Angiotensin II: multitasking in the brain. *J Hypertens Suppl* 24:S131-S137

Sabatini RA, Guimaraes PB, Fernandes L, Reis FCG, Bersanetti PA, Mori MA, Navarro A, Hilzendeger AM, Santos EL, Andrade MCC, Chagas JR, Pesquero JL, Casarini DE, Bader M, Carmona AK, Pesquero JB (2008) ACE activity is modulated by kinin B-2 receptor. *Hypertension* 51:689-695

Sgoifo A, Buwalda B, Roos M, Costoli T, Merati G, Meerlo P (2006) Effects of sleep deprivation on cardiac autonomic and pituitary-adrenocortical stress reactivity in rats. *Psychoneuroendocrinology* 31:197-208

Shrimpton CN, Smith AI (2000) Soluble neutral metallopeptidases: Physiological regulators of peptide action. *Journal of Peptide Science* 6:251-263

Silva RH, Chehin AB, Kameda SR, Takatsu-Coleman AL, Abilio VC, Tufik S, Frussa R (2004) Effects of pre- or post-training paradoxical sleep deprivation on two animal models of learning and memory in mice. *Neurobiology of Learning and Memory* 82:90-98

Simpson N, Dinges DF (2007) Sleep and inflammation. *Nutrition Reviews* 65:S244-S252

Steiger A (2007) Neurochemical regulation of sleep. *Journal of Psychiatric Research* 41:537-552

Sun XO, Wiesner B, Lorenz D, Papsdorf G, Pankow K, Wang P, Dietrich N, Siems WE, Maul B (2008) Interaction of angiotensin-converting enzyme (ACE) with membrane-bound carboxypeptidase M (CPM) - a new function of ACE. *Biological Chemistry* 389:1477-1485

Trask AJ, Ferrario CM (2007) Angiotensin-(1-7): Pharmacology and new perspectives in cardiovascular treatments. *Cardiovascular Drug Reviews* 25:162-174

Tufik S, Andersen ML, Bittencourt LRA, de Mello MT (2009) Paradoxical Sleep Deprivation: neurochemical, hormonal and behavioral alterations. Evidence from 30 years of research. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 81:521-538

Veerasingham SJ, Raizada MK (2003) Brain renin-angiotensin system dysfunction in hypertension: recent advances and perspectives. *British Journal of Pharmacology* 139:191-202

Wolk R, Gami AS, Garcia-Touchard A, Somers VK (2005) Sleep and cardiovascular disease. *Current Problems in Cardiology* 30:625-662

Wolk R, Somers VK (2007) Sleep and the metabolic syndrome. *Experimental Physiology* 92:67-78

Wright JW, Yamamoto BJ, Harding JW (2008) Angiotensin receptor subtype mediated physiologies and behaviors: New discoveries and clinical targets. *Progress in Neurobiology* 84:157-181