



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOMÉDICAS

"Caracterización de
un modelo de narcolepsia
en un ratón
knockout de $O/E3$ "

T E S I S

Que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias

P R E S E N T A:
Alberto Kousuke De la Herrán Arita

Director de Tesis:
Dr. René Drucker Colín

Febrero de 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

“CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO DE
NARCOLEPSIA EN UN RATÓN KNOCKOUT DE O/E3”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

ALBERTO KOUSUKE DE LA HERRÁN ARITA

DIRECTOR DE TESIS: DR. RENÉ DRUCKER COLÍN

DEDICATORIA

Sería asequible detallar cada aspecto científicamente, pero carecería de sentido; no tendría significado, sería como representar una sinfonía de Beethoven como una variación en la presión de las ondas sonoras. Sin embargo, hubiera sido más fácil describirlo de tal manera, ya que me es casi imposible plasmar en palabras los sentimientos de gratitud y cariño que tengo por todos aquellos que me acompañaron a lo largo de este recorrido.

Durante este periodo, he aprendido cuán difícil es dar un paso seguro, por más pequeño que sea, para alcanzar aquello que es realmente significativo; por ello agradezco a todos ustedes quienes nunca permitieron que blandeara y me otorgaron el goce de conocerlos, enriqueciendo así cada aspecto de mi vida.

Por consiguiente, familia, amigos y colegas, hay espacio en el corazón para todo el afecto que tengo por ustedes, así como hay espacio en el multiverso para todas las estrellas.

A mis padres, vehementes protectores y mentores. Sé que nunca existirá una forma de agradecer una vida de sacrificio y esfuerzo. Su devoción paternal y apoyo incondicional han sido el baluarte para superarme durante todos estos años. Cada quien traza su propio camino, el cual en mi caso, se ha visto nublado por mis faltas y errores como individuo; empero, por más oscuro que se haya tornado el sendero, mis padres siempre estuvieron como faro en la penumbra para mostrarme el camino.

A ellos les dedico este trabajo.

A mi hermana Beatriz, quien a pesar de ser menor que yo ha sido mi ejemplo a seguir, de noble corazón e ilustre intelecto. Mi inseparable amiga, que sin importar las vicisitudes adversas de la vida, siempre me evocará los recuerdos de aquella infancia tan maravillosa y memorable.

A mis amigos, que estimo como hermanos, Rudy, R, Jaime y kenkritos. Ellos me enseñaron que la imaginación y la creatividad son más importantes que el conocimiento, pues éste es limitado, mientras la imaginación comprende al mundo entero. Por esto y por su entrañable e invaluable amistad, les estaré por siempre agradecido.

A mis camaradas de Gotcha & Rolla, Don Fede, Maese Rojo, Joseph y Adriana; fue una gran fortuna encontrar a un grupo de amigos de excelsa calidad como personas en una ciudad desconocida para mi, rememorando el sentimiento de sentirse como en casa.

A mi perro Lobo, que en realidad no me ha enseñado mucho; sin embargo, no puedo dejar de agradecer a mi amigo fiel.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a mi mentor, el Dr. René Drucker Colín. Le correspondo mi sempiterna gratitud por enseñarme los portentos y reverses de la investigación científica, así como su diligente y constante interés por mi desarrollo como futuro investigador. Le agradezco sobre todo, por creer en mí.

A mis asesores, el Dr. Óscar Prospero García por su invaluable y perspicaz orientación a lo largo de mi carrera y el Dr. Román Vidaltamayo Ramírez por asistirme con los menesteres de iniciar un proyecto doctoral.

A mis sinodales, el Dr. Raúl Aguilar Roblero, Dr. José Ramón Eguibar Cuenca, el Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade y la Dra. María Luisa Fanjul Peña de Moles por su dedicación y atención, así como por sus comentarios realizados a esta tesis.

A las técnicas de nuestro laboratorio Diana Millán y Marcela Palomero, quienes son la amalgama que mantiene unido al laboratorio; un simple agradecimiento sería exiguo para toda la asesoría, apoyo y paciencia que me brindaron durante este tiempo. Por falta de más palabras, no me queda más que agradecerles por su gran amistad.

A mi compinche J. Rubén García, codo a codo lidiamos con las dificultades y pormenores de venir a la gran ciudad y adentrarse al recinto científico recién salidos del “rancho”; juntos libramos esta batalla, compartiendo las mismas heridas de guerra. Gracias por todo compadre.

A mis queridos amigos del laboratorio Alejandra, Clementina, Fernanda, Khalil, Lalo, Lupe, Mafi, Mónica y ^{Xi} Omar A., porque del sinfín de recuerdos que adquiriré durante el doctorado, el que más atesoro y tendré más presente en los años venideros, será el de haberlos conocido.

Muchas gracias a mí querido amigo Paco, el gurú de cómputo, por su invaluable asesoría técnica así como por su amistad.

Gracias a Tere y Mari por la atención estoicamente jovial que tuvieron conmigo, tratándome siempre con una afable sonrisa.

Mi más sincero agradecimiento a Don Lino por su dedicada asistencia con las labores del laboratorio.

Concluyo expresándoles que me siento afortunado de haber conocido a tantas personas a las cuales será realmente difícil decir adiós.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
Abstract	3
NEUROBIOLOGÍA DEL CICLO VIGILIA SUEÑO	4
Fisiología del Ciclo Vigilia Sueño	6
<i>Vigilia</i>	6
<i>Sueño nREM</i>	11
<i>Sueño REM</i>	14
Mecanismos reguladores del ciclo vigilia-sueño	16
NARCOLEPSIA	18
Fisiopatología	19
Epidemiología	22
Clínica	23
Diagnóstico	25
Tratamiento	27
MODELOS ANIMALES DE NARCOLEPSIA	29
Modelo Canino de Narcolepsia (CANARC)	29
Rata TAIEP	30
Ratón knockout de Orexina	31
Ratón knockout de receptores de Orexina	31
Ratón Orexina-Ataxina-3	32
DEGENERACION DE LA POBLACION OREXINERGICA	33
Moléculas expresadas en la población orexinérgica	33
Factor de transcripción O/E3	34
JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
HIPÓTESIS	35
OBJETIVOS	35

MATERIALES Y MÉTODOS	36
Generación del ratón KO-O/E3	36
Registro electrofisiológico del CVS	37
Administración del péptido orexina A	38
Inmunohistoquímica contra orexina A	39
Conteo celular y cuantificación de píxeles	40
Análisis estadístico	40
RESULTADOS	45
Eventos parecidos a cataplejía en el ratón KO-O/E3	41
Alteraciones en el CVS del ratón KO-O/E3	41
Disminución de la población orexinérgica en ratones KO-O/E3	43
Proyecciones orexinérgicas aberrantes en los ratones KO-O/E3	44
La administración de orexina a sintética revierte el fenotipo narcoléptico en el ratón KO-O/E3	46
Identificación de elementos responsivos a O/E3 en el gen de prepro-orexina	47
DISCUSIÓN	49
Regulación de la expresión de prepro-orexina en el HL	49
Regulación de la sobrevivencia de la población orexinérgica durante el desarrollo	50
Desarrollo y dirección de las proyecciones orexinérgicas	51
Determinación de la distribución de OXRs	52
O/E3 como molécula blanco de un proceso autoinmune	54
CONCLUSION	55
BIBLIOGRAFÍA	56

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CVS	Ciclo vigilia-sueño
CSR	Núcleo central superior del rafé
DA	Dopamina
DR	Núcleo dorsal del rafé
DREM	En inglés: Direct REM transition (transición directa a REM)
EEG	Electroencefalograma
EMG	Electromiograma
EOG	Electrooculograma
Glu	Glutamato
Hist	Histamina
HL	Hipotálamo lateral
LC	Locus coeruleus
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LDT	Núcleo laterodorsal
NA	Noradrenalina
nREM	No REM
NSQ	Núcleo supraquiasmático
OX	Orexina
OXR	Receptor de orexina
PGO	Ponto-geniculo-occipital
PPT	Núcleo tegmental pedúnculo pontino
REM	En inglés: Rapid eye movement (movimientos oculares rápidos)
RPO	Núcleo reticular oral del puente
SNC	Sistema nervioso central
SRAA	Sistema reticular activador ascendente
TC	Tiempo Circadiano
TNM	Núcleo tuberomamilar
VLPO	Núcleo ventrolateral preóptico
VTA	Área tegmental ventral

RESUMEN

Las orexinas (también llamadas hipocretinas) son neurotransmisores peptídicos producidos por una pequeña población de neuronas localizadas exclusivamente en el hipotálamo lateral (HL). Las orexinas modulan la vigilia, y como resultado, ejercen efectos cardinales en la conducta alimenticia y el ciclo vigilia-sueño. La pérdida de neuronas productoras de orexina ocasiona un fenotipo narcoléptico, el cual se caracteriza por transiciones súbitas del estado de vigilia directamente a la fase de sueño de movimientos oculares rápidos (Rapid Eye Movements, REM) (transición directa a sueño REM, DREM) observado en los registros de electroencefalograma (EEG) y electromiograma (EMG).

En este estudio demostramos que ratones con ausencia del factor de transcripción O/E3 (también conocido como ebf2) presentan una disminución en las células productoras de orexina en el HL, así como una disminución severa en la inervación orexinérgica en el puente cerebral. Estos cambios en el circuito orexinérgico del ratón knockout O/E3 (KO-O/E3) inducen un fenotipo narcoléptico, similar al que se observa en el ratón knockout de orexina y el ratón orexina-ataxina-3.

Nuestros resultados sugieren que el factor de transcripción O/E3 juega un papel central durante el desarrollo de un circuito orexinérgico funcional, ya sea controlando la expresión del neurotransmisor hipotalámico o el desarrollo correcto de las fibras nerviosas que se originan en el hipotálamo. Así mismo, este es el primer reporte del síndrome de narcolepsia-cataplejía en el ratón KO-O/E3, lo cual hace hincapié en la importancia de los factores de transcripción en la regulación de subpoblaciones neuronales que controlan el ciclo vigilia-sueño.

ABSTRACT

Orexins (hypocretins) are peptide neurotransmitters produced by a small group of neurons located exclusively in the lateral hypothalamus (LH). Orexins modulate arousal, and as a result, have profound effects on feeding behavior and the sleep-wake cycle. Loss of orexin producing neurons leads to a narcoleptic phenotype, characterized by sudden transitions from vigilance to rapid eye movement (REM) sleep (direct transition to REM, DREM) observed in electroencephalogram (EEG) and electromyogram (EMG) recordings.

In this study, we demonstrate that mice lacking the basic helix-loop-helix transcription factor O/E3 (also known as ebf2) have a decrease in orexin-producing cells in the LH, in addition to a severely impaired orexinergic innervation of the pons. These changes in the orexinergic circuit of O/E3-null animals induce a narcoleptic phenotype, similar to the one arising in orexin-deficient and orexin-ataxin-3 mice.

Taken together, our results suggest that O/E3 plays a central role during the establishment of a functional orexinergic circuit by controlling the expression of essential hypothalamic neurotransmitter and the correct development of the nerve fibers arising from the hypothalamus. This is the first report regarding the narcolepsy-cataplexy syndrome in O/E3-null mice, which adds the importance of transcription factors in the regulation of neural subpopulations that control the sleep-wake cycle.

NEUROBIOLOGÍA DEL CICLO VIGILIA SUEÑO

El sueño no sólo es un fenómeno activo, necesario y periódico; sino que también es un proceso variado y complejo. Tanto en el hombre, como en el estudio experimental del gato, rata y ratón se puede observar tres fases del ciclo vigilia-sueño (CVS): vigilia, sueño de ondas lentas (SOL; en inglés, nREM, non REM) y sueño de movimientos oculares rápidos (MOR; en inglés, REM, rapid eye movement). Estas se diferencian una de la otra electrofisiológica y conductualmente (Figura 1).

Hasta la fecha, se ha logrado caracterizar la mayor parte de las estructuras responsables de mantener cada una de estas fases del CVS, las cuales están anatómicamente vinculadas entre sí. Estas interconexiones utilizan neurotransmisores que, en un ejercicio de excitación-inhibición, permiten la alternancia de las fases del ciclo de manera secuenciada.

El núcleo supraquiasmático (NSQ), localizado en el hipotálamo, por encima del quiasma óptico, establece el ritmo que es adaptado a las 24 horas del día por reguladores externos.

EL MARCAPASOS CIRCADIANO

Desde el descubrimiento de los genes circadianos en la mosca de la fruta (Konopka & Benzer, 1971), estudios genéticos han permitido esclarecer los eventos intranucleares y citoplasmáticos que están asociados con los ritmos circadianos y el CVS. Entre los hallazgos más interesantes, se encuentra la elucidación del control genético del marcapasos circadiano de los mamíferos, el cual demuestra una ritmicidad casi exacta de 24 horas del reloj circadiano. El control genético del reloj circadiano molecular se expresa sincrónicamente colectiva e individualmente por cada una de las 20, 000 células del NSQ (Czeisler *et al.*, 1999). El NSQ contiene el “reloj maestro”, el cual sincroniza los ciclos a un ritmo de 24 horas para los demás ritmos fisiológicos del organismo (Figura 4).

Los ritmos circadianos en los mamíferos se mantienen intracelularmente mediante un “feedback” (mecanismo de retroalimentación) del control de la transcripción (y la subsecuente traducción a proteína) de tres genes “Periodo” (Per 1-3), dos genes “Criptocromo” (Cry 1 y 2) y los genes “Clock” y “Bmal1” (brain and muscle ARNT-like 1). Los productos de Clock y Bmal1 existen como un heterodímero, el cual es un componente elemental de un factor de

transcripción (Clock:Bmal1) que promueve la transcripción de Per y Cry mediante la unión a su secuencia regulatoria en el ADN. Los ARNs mensajero de Per y Cry son translocados hacia el citoplasma para ser traducidos a proteínas, posteriormente re-ingresan al núcleo para ejercer un feedback negativo sobre el factor de transcripción Clock:Bmal1 (Czeisler *et al.*, 1999).

El control molecular del reloj circadiano en el NSQ opera de la siguiente manera:

Al inicio del “Día Subjetivo”, también llamado Tiempo Circadiano (TC) 0, la transcripción y traducción de Per y Cry es acelerada por la acumulación de heterodímeros Clock:Bmal1 durante la “Noche Subjetiva” previa (TC 12-24). Los niveles de Per y Cry llegan a su nivel máximo al inicio de la noche subjetiva del organismo (TC 12). Los complejos proteínicos que contienen productos del gen Cry ejercen un feedback negativo en el promotor Clock:Bmal1, disminuyendo así, la transcripción de Per y Cry. Al mismo tiempo, un complejo proteínico que contiene Per ejerce un feedback positivo al favorecer la transcripción de Bmal1.

Bmal1 se acumula como material crudo para nuevos heterodímeros Clock:Bmal1 durante el día subjetivo, llegando a su nivel máximo durante la noche subjetiva. La retroalimentación negativa en el promotor Clock:Bmal1 ocasiona que los niveles de Per y Cry alcancen un nivel mínimo durante la noche subjetiva. Simultáneamente, la retroalimentación positiva sobre la transcripción de Bmal1 aumenta los niveles de heterodímeros de Clock:Bmal1, los cuales, al ser liberados del feedback inhibitorio, pueden reiteradamente promover la transcripción de Per y Cry durante el nuevo día subjetivo del organismo.

La acción combinada del “bucle” de feedback negativo y positivo crea una serie de señales que se repiten en un periodo de 24 horas. Estas señales moleculares son interpretadas por mecanismos citoplasmáticos en las células del NSQ y traducidas en eventos celulares recurrentes, tales como cambios en el potencial de membrana (Reppert & Weaver, 2001). Tales señales, son transmitidas a otras neuronas que controlan los procesos fisiológicos con ritmicidad circadiana.

La sincronización de las células del NSQ mediada por estímulos luminosos resulta de la estimulación glutamatérgica mediada por receptores NMDA (N-methyl-D-aspartate) a través del tracto retino-hipotalámico (Gillette & Tischkau, 1999). Las neuronas del NSQ notifican el TC a otras estructuras cerebrales principalmente mediante potenciales de acción mediados por canales de sodio (Reppert & Weaver, 2001).

FISIOLOGÍA DEL CVS

Posterior al descubrimiento del electroencefalograma (EEG) (Berger, 1929), se consideró al trazado de pequeño voltaje y alta frecuencia (EEG activado) como característico de la vigilia y al trazado de baja frecuencia y gran voltaje (ondas lentas) característicos del sueño (Loomis *et al.*, 1937). A mediados del siglo pasado, la noción de que el sueño era una etapa en la que el cerebro disminuía su actividad cambió con el descubrimiento de una nueva etapa del sueño, el sueño REM, el cual caracteriza por un EEG de baja amplitud y de frecuencia mixta similar al de la vigilia; presenta además un electrooculograma (EOG) con actividad tónica y fásica (Aserinsky & Kleitman, 1953) (Figura 3).

Posteriormente, William Dement, descubrió que aquellas personas a las que se despertaba durante el sueño REM manifestaban claros indicios de trastorno psíquico y recordaban haber soñado, estableciendo el nexo entre el sueño REM y la generación de ensoñaciones (Dement & Kleitman, 1957). En función de estos hechos, comenzaron a surgir teorías que suponían el inicio de un estudio científico del sueño.

A continuación, se describirá brevemente cada una de las etapas del CVS con el fin de exponer un mapa general acerca del entendimiento sobre el sueño y la narcolepsia.

Vigilia

Desde tiempos inmemorables, el ser humano ha deliberado sobre las funciones y mecanismos por los cuales se rige el estado de vigilia, sin embargo, hasta el siglo pasado se empezó a dilucidar las estructuras cerebrales encargadas de mantener y regular la vigilia.

Tras la epidemia mundial de encefalitis letárgica (1915-1924), el barón von Economo describió a detalle los síntomas, patología e histología que acompañaban a lo que posteriormente se llamó “la enfermedad de von Economo” (von Economo, 1918).

Se describieron tres variantes de la enfermedad:

1. Somnolienta: Lesión en hipotálamo posterior.
2. Hiperkinética: Lesión en hipotálamo anterior.
3. Amióstática-akinética: Lesión en sustancia nigra.

Tras esta descripción, se inició la búsqueda por los centros reguladores de la vigilia y el sueño en el sistema nervioso central (SNC), dando pauta a un sin fin de estudios sobre el CVS.

El barón von Economo describió que aquellos enfermos de encefalitis que presentaron una lesión en el hipotálamo posterior padecían somnolencia, señalando la importancia de esta estructura en el mantenimiento de la vigilia (von Economo, 1918).

En un estudio posterior, analizando la fisiología de las estructuras cerebrales al ser desconectadas de la médula espinal, Bremer desarrolló 2 preparaciones en gatos:

- Cerebro aislado: Sección a nivel del surco intercolicular en el mesencéfalo.
- Encéfalo aislado: Corte a nivel de la unión médula oblongada-médula espinal.

Bremer observó que en el EEG de los gatos con cerebro aislado predominaban las frecuencias lentas de alto voltaje y que sus pupilas permanecían mióticas. Interpretó estas señales como indicadores de que el animal estaba dormido. Debido a que el gato permaneció "dormido" durante todo el tiempo que duró el registro EEG, Bremer supuso que dicho estado de sueño permanente era el resultado de la extensa desaferenciación (eliminación de las aferencias sensoriales) que sufrían los gatos con cerebro aislado. Posteriormente, corroboró su hipótesis cuando observó que la desaferenciación menos extensa que se producía en los gatos con encéfalo aislado permitía que estos animales tuvieran una alternancia de estados de sueño y vigilia (Bremer, 1937).

Bremer atribuyó esta pérdida de vigilia a la supresión de los impulsos tónicos ascendentes de las vías sensitivas que penetraban en el tronco del encéfalo. Igualmente concluyó que el sueño era la consecuencia de la pérdida del estado de vigilia.

Las conclusiones de Bremer fueron que la privación de estimulación sensorial reduce la actividad de la corteza cerebral por lo que disminuye la vigilia y se instala el sueño. Estas conclusiones sugerían que la vigilia depende de un estado de activación cortical, mientras que el sueño depende de la ausencia de dicha activación.

Sin embargo, Moruzzi y Magoun infirieron que el efecto descrito era un fenómeno dependiente de un sustrato anatómico, más que de uno exclusivamente funcional. Ellos sugirieron que en el tejido neural que permanece entre los dos planos de corte de las preparaciones de Bremer había una estructura necesaria para el mantenimiento de la vigilia.

Con esta hipótesis diseñaron una serie de experimentos, demostrando que la lesión en el mesencéfalo de las vías sensitivas ascendentes no altera el estado de vigilia, mientras que la lesión de los impulsos ascendentes desde la formación reticular da lugar a un EEG sincronizado y un comportamiento de sueño. Asimismo, la estimulación de la formación reticular en el animal dormido produce vigilia. A este fenómeno lo llamaron "despertar electroencefalográfico" Basándose en estos experimentos postularon la existencia de un sistema reticular activador ascendente (SRAA) que actúa sobre el tálamo y la corteza cerebral facilitando su funcionamiento (Moruzzi & Magoun, 1949). La formación reticular activadora del EEG se prolonga hasta el hipotálamo posterior y lateral (Batini *et al.*, 1959; Reinoso-Suárez, 1960). Posteriormente se comprobó que la porción caudal del tegmento pontino era hipnogénica, pues su ablación por una sección a nivel medial del puente o por lesiones del tegmento pontino caudal producía un aumento de vigilia, demostrada por una activación del EEG (Batini *et al.*, 1959; Camacho-Evangelista & Reinoso-Suárez, 1964).

La incógnita era determinar cuáles eran las estructuras que formaban el sistema reticular ascendente de activación, responsable del despertar y la vigilia. Experimentos subsecuentes de registro unitario, estimulación eléctrica y química, así como de lesiones y transecciones del tronco encefálico demostraron que las estructuras (Figura 1) encargadas de mantener la vigilia son las siguientes:

1. Los grupos serotoninérgicos (5HT) del tronco encefálico:

Rafe: núcleos central superior (CSR) y dorsal del rafe (DR).

2. Los grupos aminérgicos del tronco del encéfalo rostral:

Locus coeruleus (LC), sustancia nigra (SN) y área tegmental ventral (VTA).

3. Los grupos colinérgicos del istmo pontomesencefálico:

Núcleos tegmento pedunculopontino (PPT) y laterodorsal (LDT).

4. Hipotálamo posterior:

Neuronas histaminérgicas (Hist) y orexinérgicas (OX).

5. Neuronas glutamatérgicas (Glu) diseminadas en el SNC:

En los tegmentos pontino y mesencefálico, así como en el hipotálamo lateral y posterior.

Para el mantenimiento de la vigilia, con todos los matices plásticos que la caracterizan, es necesaria la acción sinérgica de todos, o varios, de estos neurotransmisores en el tálamo y corteza cerebral. Todos estos neurotransmisores tienen una distribución específica en el tálamo. A través de ellos, el SRAA permite que en el despertar y la vigilia, la información que llega al tálamo por las vías sensitivas o desde otras áreas corticales sea transmitida y procesada de manera precisa a la corteza cerebral, mediante la generación de potenciales de acción.

Las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal proyectan de forma topográficamente organizada sobre la corteza cerebral. La acetilcolina (ACh) es necesaria para la activación cortical y para un correcto funcionamiento de los circuitos corticales en la vigilia (así como del sueño REM).

La DA que se libera profusamente durante la vigilia por la SN y el VTA, modula los circuitos córtico-corticales e influye en los procesos integrativos de alto nivel cortical; asimismo, es necesaria para organizar una respuesta motora adecuada, estimulando fundamentalmente la corteza motora y las áreas asociativas.

La NA sintetizada por el LC es imprescindible para una vigilia bien organizada, aumenta en el despertar y en los procesos de atención y actividad provocada. Es necesaria para la inducción de los factores de transcripción que ocurren en la vigilia. Durante la vigilia, la NA modula la transcripción neuronal para favorecer la potenciación sináptica, mientras que su inactividad durante el sueño juega un papel permisivo en el aumento de la síntesis de proteínas en el cerebro (Cirelli & Tononi, 2004). En resumen, modula la atención, la vigilia y el aprendizaje.

La 5HT, que se distribuye en las áreas y capas de la corteza cerebral de una forma complementaria con la NA, es especialmente abundante en las cortezas visuales temporales y capa IV de la corteza cerebral. Aumenta en el despertar y se mantiene durante la vigilia. En contraposición con el efecto fásico de la NA, ejerce un efecto tónico sobre las neuronas corticales. Se le atribuye la modulación de la actividad neuronal cortical en los cambios de fase.

El aumento de liberación de aminas, ACh y Glu durante la vigilia suprime la actividad lenta de las neuronas corticales que descargan tónicamente durante el sueño nREM, así la corteza cerebral puede procesar la información que desde el tálamo y otras áreas corticales recibe durante la vigilia. Durante la vigilia, una función importante de la corteza cerebral es modular, mediante sus proyecciones desde la capa VI, la transmisión de los impulsos que llegan a los

núcleos ventrales del tálamo desde vías sensitivas y otras estructuras subcorticales y a los núcleos dorsales y laterales desde las cortezas asociativas (Nicoletis & Fanselow, 2002).

En resumen, tálamo y corteza en la vigilia, modulados ambos por el SRAA, son el sustrato adecuado y necesario para la percepción, dando lugar a los complejos procesos cognitivos durante la vigilia.

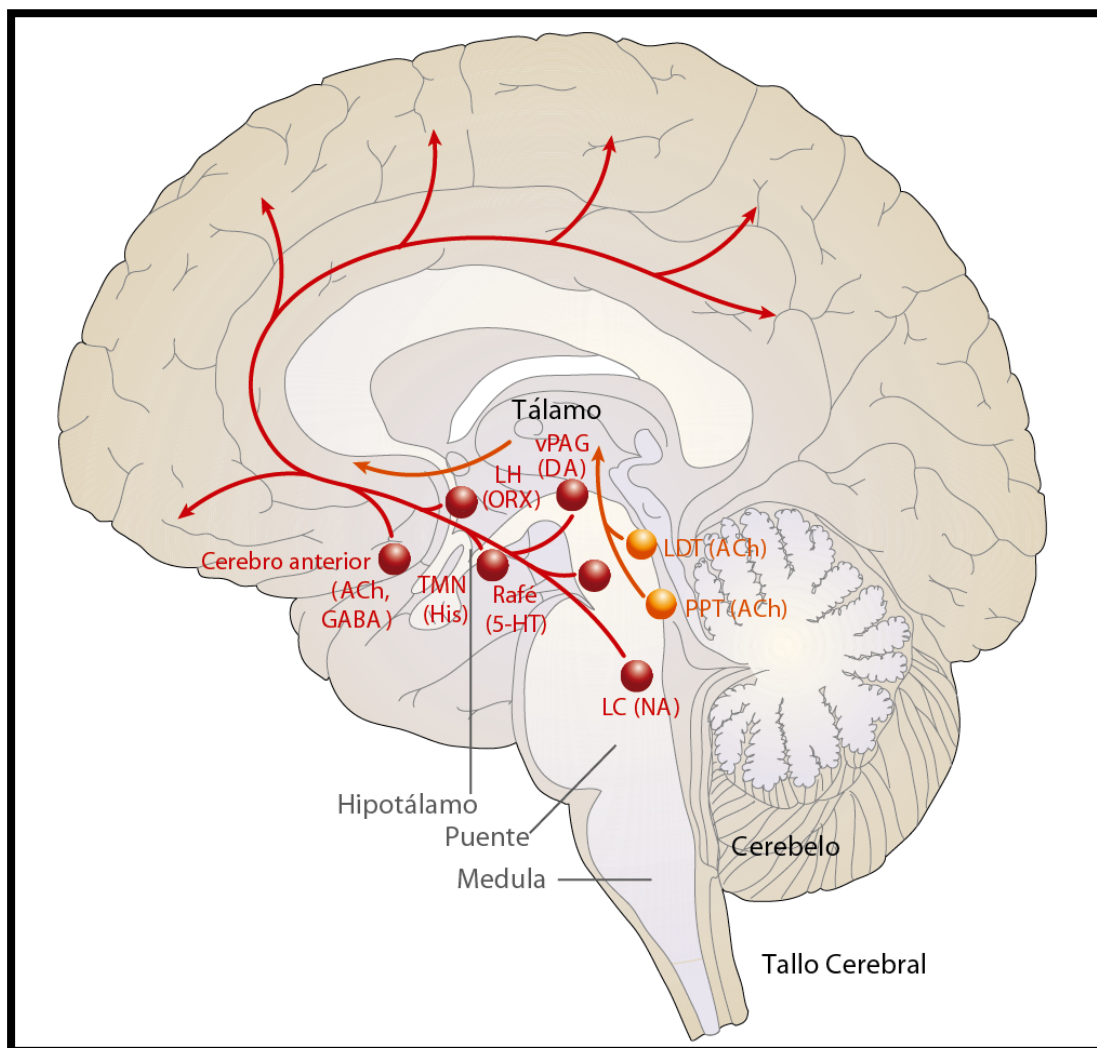


Figura 1. Representación esquemática de los núcleos promotores de la vigilia

Uno de las mayores “entradas” al núcleo reticular del tálamo (vía color amarillo) proviene de los grupos colinérgicos del puente superior, el núcleo pedunculopontino (PPT) y el núcleo tegmental laterodorsal (LDT). Estas “entradas” facilitan la transmisión talamo-cortical.

Una segunda vía (color rojo) activa la corteza cerebral, facilitando el procesamiento de las “entradas” provenientes del tálamo. Esta procede de las neuronas monoaminérgicas, las cuales incluyen el núcleo tuberomamilar (TMN), el rafe dorsal, las neuronas orexinérgicas (ORX) del LH y el locus coeruleus (LC). Esta vía también recibe información de neuronas del cerebro anterior GABAérgicas y colinérgicas.

Modificado de Saper *et al.*, 2005.

Sueño nREM

Actualmente, en el ser humano, el sueño nREM se divide en 3 estados:

Fase 1: Es la transición desde la vigilia al sueño. Se caracteriza por la aparición del patrón de actividad con ondas alfa (8-12 Hz) e instauración de un patrón de amplitud baja y frecuencia mixta, predominantemente en el intervalo theta (2-7 Hz), con movimientos oculares lentos, "en balancín" (Figura 3A).

Fase 2: Se define por la aparición de complejos K y de husos de sueño superpuestos a una actividad de base similar a la del estado 1. Los complejos K son descargas lentas, negativas (hacia arriba) y de amplitud elevada que se continúan inmediatamente después por una deflexión positiva (hacia abajo). Los husos de sueño son descargas de alta frecuencia de corta duración que presentan una amplitud característica con subidas y bajadas. No hay actividad ocular y el EMG da un resultado similar al estado 1 (Figura 3A).

Fase 3: Se caracteriza por una actividad con más del 20% de actividad delta de amplitud elevada (>75 mV) (0.5-2.0 Hz) (Figura 1A). Los husos del sueño pueden persistir, sigue sin haber actividad ocular, y la actividad del EMG permanece en un nivel reducido (Figura 3A).

Fue también von Economo el primero en correlacionar una estructura encefálica con la regulación del sueño, al demostrar que pacientes con encefalitis que presentaron una lesión en el hipotálamo anterior cursaban con una disminución del sueño (von Economo, 1918). Este hecho también demostró que el sueño era un proceso activo y no un fenómeno pasivo. Estos primeros hallazgos se vieron reforzados experimentalmente por Hess, quien demostró en gatos un aumento del sueño (conductual y bioeléctrico) tras la estimulación del hipotálamo anterior y prosencéfalo basal (Hess, 1931). Poco después, se demostró en ratas un aumento de la vigilia después de seccionar el hipotálamo anterior del posterior, atribuyendo una eliminación de la inhibición que las estructuras hipnogénicas situadas en el hipotálamo anterior y prosencéfalo basal sobre las estructuras promotoras de la vigilia del hipotálamo posterior (Nauta, 1946) (Figura 2).

La extensión y naturaleza de esta estructura hipnogénica rostral se ha precisado en años sucesivos. Primero, se demostró una disminución de sueño tras lesiones en el prosencéfalo basal (Sterman & Clemente, 1962). Posteriormente, se demostró que pequeñas lesiones en el

área del prosencéfalo basal, cuya lesión producía una disminución dramática de sueño (principalmente de sueño nREM), comprendía la porción horizontal de la banda diagonal de Broca, extendiéndose dorsalmente al núcleo accumbens y la parte ventral de la cabeza del núcleo caudado, así como el área preóptica ventrolateral (Sherin *et al.*, 1996) (Figura 2).

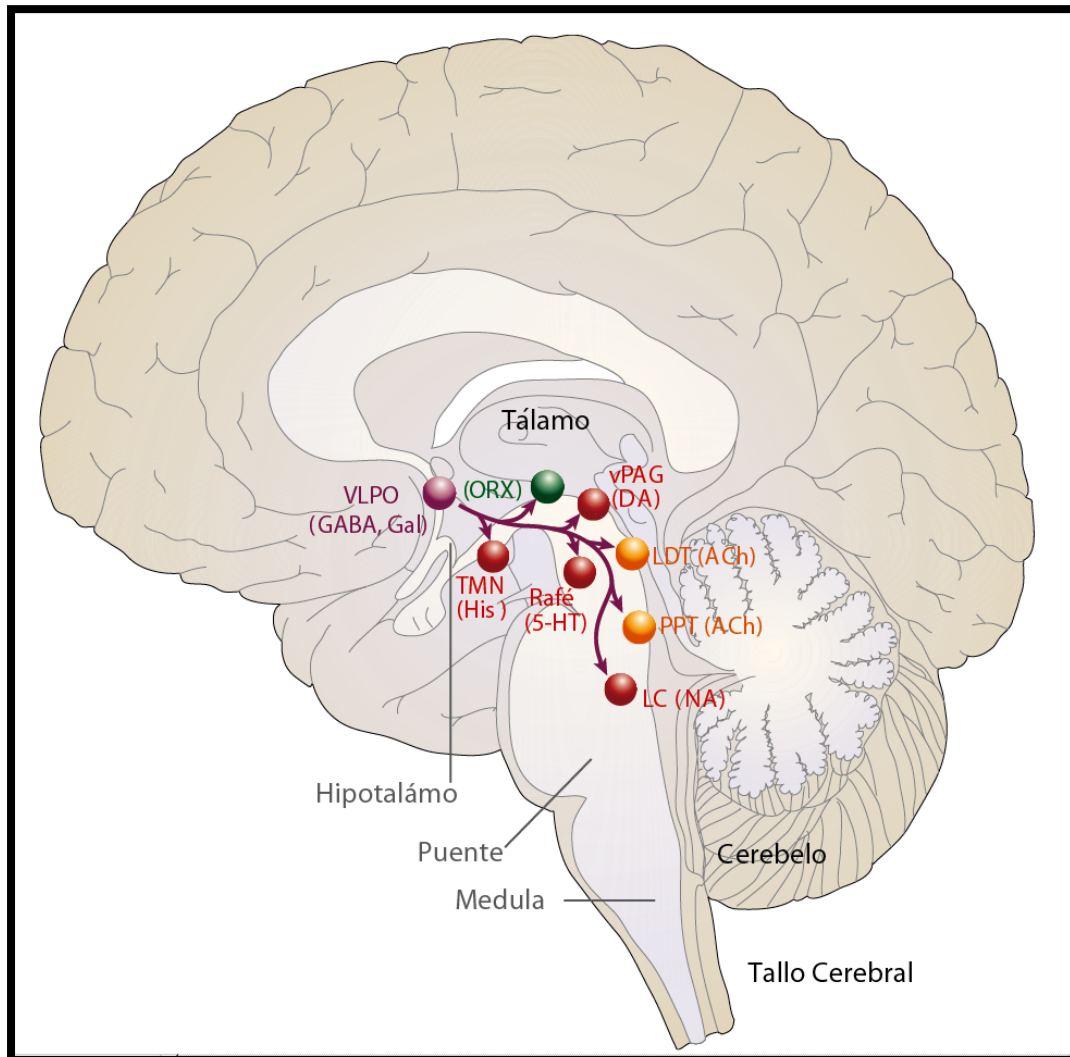


Figura 2. Representación esquemática del núcleo promotor del sueño

El núcleo ventrolateral pre-óptico (VLPO) del hipotálamo envía sus proyecciones GABAérgicas a los grupos monoaminérgicos (TMN, LC, rafé dorsal) (color rojo), al núcleo orexinérgico en el HL (color verde) y a los núcleos colinérgicos pontinos (PPT y LDT) (color amarillo); de esta manera, inhibe a los principales centros promotores de la vigilia, favoreciendo la instauración del sueño nREM y consecutivamente el sueño REM. Modificado de Saper *et al.*, 2005.

Sin embargo, el prosencéfalo basal no es la única estructura cerebral que se ha implicado en la organización del sueño nREM. Hess consiguió dormir a gatos conscientes estimulando el tálamo a baja frecuencia (Hess, 1931). Posteriormente, mediante estimulaciones de baja

frecuencia, se situaron las bases del sistema difuso de proyección talamocortical al describir las respuestas de reclutamiento, semejantes en su estructura y su distribución cortical, a los husos de sueño (Morrison & Dempsey, 1942). Estos mismos autores demostraron que la lesión del tálamo suprimía uno y otro de estos fenómenos bioeléctricos característicos de esta fase del CVS. Steriade, estableció la necesidad del núcleo reticular del tálamo como marcapasos de los husos de sueño (Steriade *et al.*, 1987). Por su parte, Lugaresi demostró que la lesión patognomónica del síndrome “insomnio familiar fatal” es la lesión del núcleo dorsomedial del tálamo (Lugaresi *et al.*, 1993). Marini y Mancina demostraron que la lesión del núcleo dorsomedial del tálamo disminuye el sueño nREM (Marini *et al.*, 1993). Jouvét demostró que en el animal decorticado no se presentaban ondas lentas, por lo que suponía que esta corteza era necesaria para el sueño de ondas lentas (Jouvét, 1961). Hoy conocemos que los mecanismos bioeléctricos que se dan en el sueño nREM dependen esencialmente de las relaciones bidireccionales tálamo-corteza cerebral (Steriade *et al.*, 1991).

Con todo lo anterior, se llegó al consenso de que las neuronas promotoras de la vigilia y sueño se inhiben unas a otras dando como resultado una vigilia y un sueño estable (Saper *et al.*, 2001).

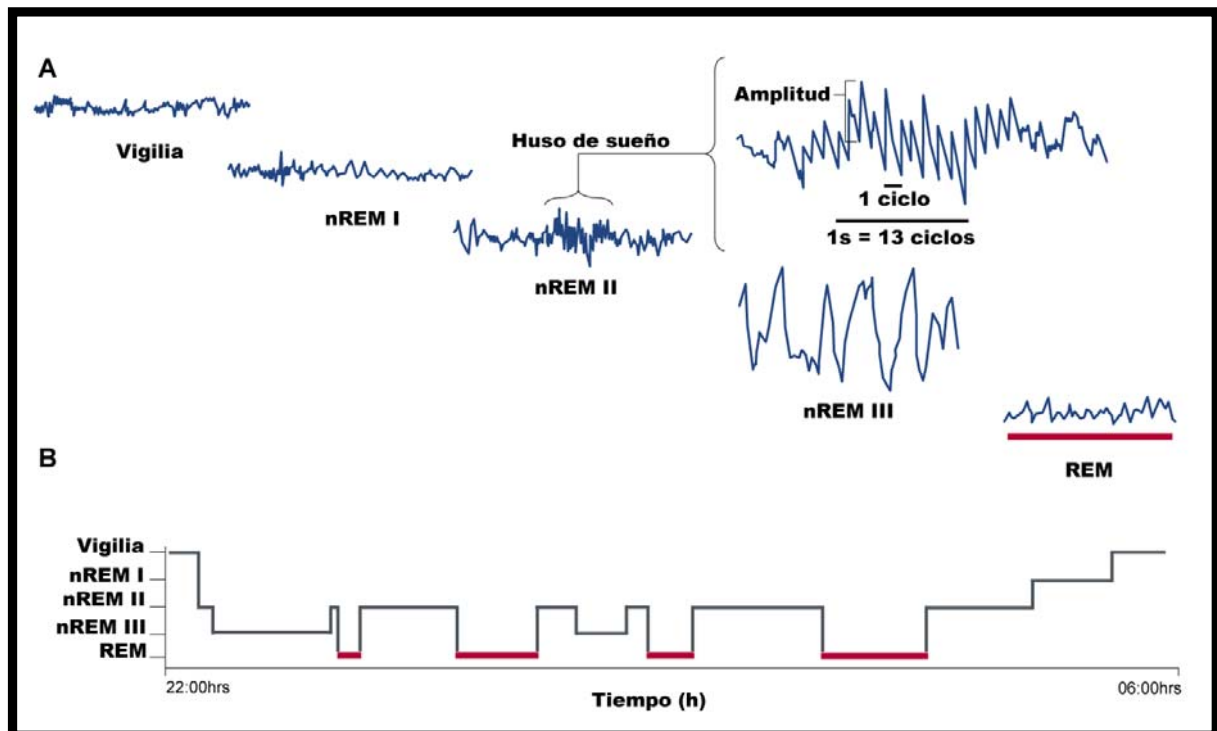


Figura 3. Características del CVS

- (A) Patrón electrofisiológico de la actividad cortical en cada fase del ciclo
- (B) Hipnograma hipotético del CVS de un sujeto normal

Sueño REM

En 1953, Kleitman y Aserinsky describieron una nueva fase del sueño con la cual cambiarían las nociones preconcebidas del sueño; dicha fase presentaba un patrón de actividad EEG similar a la vigilia con periodos regulares de movimientos oculares. El sueño ya no sería un estado homogéneo de “reposo” cerebral. El sueño, especialmente el sueño REM, se consideraría como un estado dinámico de actividad cerebral (Aserinsky & Kleitman, 1953).

Posteriormente, se describió la naturaleza "cíclica" del sueño nocturno y estableció la relación entre el sueño REM y el sueño (Dement & Kleitman, 1957). Este hallazgo condujo a la identificación del sueño REM como un estado independiente del estado de alerta, el cual Jouvett calificó como "sueño paradójico" (Jouvett, 1961).

El sueño REM se caracteriza por los movimientos oculares rápidos, un EEG de bajo voltaje y de alta frecuencia parecido al de la vigilia (responsable del seudónimo “sueño paradójico”), atonía muscular, actividad PGO y ritmo theta en hipocampo (Figura 3A).

Es el sueño en el que se producen las ensoñaciones más copiosas y mejor estructuradas, el cual parece tener una gran importancia en la consolidación de la memoria y el aprendizaje (Reinoso-Suárez *et al.*, 2001; Saper *et al.*, 2001).

Diferentes estudios permitieron precisar las estructuras responsables de cada una de las manifestaciones bioeléctricas que caracterizan el sueño REM (Sakai, 1985; Hobson *et al.*, 1986; Paré *et al.*, 1990), los cuales son mencionados a continuación:

- | | |
|----------------------------------|--|
| 1. Atonía: | Tegmento pontino dorsolateral y el núcleo reticular bulbar magnocelular. |
| 2. Actividad PGO: | Núcleo pedunculopontino. |
| 3. Activación del EEG: | Núcleo pedunculopontino y formación reticular ponto-mesodiencefálica. |
| 4. Movimientos oculares rápidos: | Formación reticular medial del puente, núcleo periabducens y núcleo prepósito del hipogloso. |

También existe un consenso en que el núcleo reticular oral del puente (RPO) posee un papel importante en la generación del ritmo theta hipocampal, actuando a través del hipotálamo lateral y posterior y del prosencéfalo basal (Vertes, 1981; Núñez *et al.*, 1991; De la Roza *et al.*, 2000). El hallazgo de Baghdoyan y colaboradores, de que la estimulación química por la

inyección de un agonista colinérgico (carbacol) en el tegmento pontino y no en los tegmentos bulbar y mesencefálico reducía la latencia al sueño REM, confirmó la importancia del puente en estos mecanismos (Baghdoyan *et al.*, 1984).

También se demostró que durante el sueño REM había un aumento de la actividad de las neuronas de los grupos colinérgicos del prosencéfalo basal y una disminución de las de los grupos aminérgicos (noradrenérgicos y serotoninérgicos) (Reinoso-Suárez *et al.*, 2001).

Por lo tanto, la Ach juega también un papel importante en el sueño REM, mientras que las aminas biógenas lo hacían sólo en la vigilia. En el sueño nREM disminuye ligeramente la actividad neuronal de ambos grupos celulares, aminérgicos y colinérgicos, en relación con la vigilia. Ya que la estimulación colinérgica producía con corta latencia un sueño REM semejante al sueño REM fisiológico, a finales de los años ochenta varios grupos de investigadores trataron de determinar la localización de la estructura responsable de la inducción de sueño REM en el tegmento pontino. Los primeros fueron Baghdoyan y colaboradores que, con inyecciones de de carbacol, precisaron que el lugar se encontraba situado en el tegmento pontino dorsal y oral (Baghdoyan *et al.*, 1987).

En trabajos posteriores, mediante inyecciones de carbacol, se determinó otras áreas inductoras de sueño REM. El primero de estos experimentos, lo sitúa en el locus coeruleus α y en el perilocus coeruleus α , situados dorsalmente al RPO, estructuras con abundantes neuronas colinérgicas, noradrenérgicas y serotoninérgicas (Vanni-Mercier *et al.*, 1989).

En otros trabajos, se identificó el vRPO entre las áreas inductoras de sueño REM; los núcleos dorsal (Vanni-Mercier *et al.*, 1989; Yamamoto *et al.*, 1990), ventrocaudal (Baghdoyan *et al.*, 1987) y caudal (Shiromani *et al.*, 1992). Otros autores demostraron que la región equivalente al vRPO felino (gato), en la rata, era la más efectiva en la inducción del sueño REM por estimulación colinérgica (Iwakiri *et al.*, 1993; Bier *et al.*, 1996; Garzón *et al.*, 1996; Kshatri *et al.*, 1998; Horner *et al.*, 1999; Kohlmeier *et al.*, 2002).

MECANISMOS REGULADORES DEL CVS

REGULACIÓN CIRCADIANA

El control genético del reloj circadiano molecular se expresa sincrónicamente colectiva e individualmente por cada una de las 20 000 células del NSQ (Welsh *et al.*, 1995). Como se mencionó previamente, el NSQ contiene el “reloj maestro”, el cual sincroniza los ciclos a un ritmo de 24 horas para los demás ritmos fisiológicos del organismo; a su vez, el NSQ se regulariza mediante el estímulo del principal “zeitgeber” (sincronizador), la luz del sol.

Las neuronas ganglionares glutamatérgicas de la retina proyectan al NSQ a través del tracto retino-hipotalámico. Este es la vía por la cual un estímulo fótico (luminoso) sincroniza el reloj circadiano del NSQ (Reppert & Weaver, 2001).

Las señales provenientes de las neuronas ganglionares glutamatérgicas también llegan al NSQ a través de dos vías indirectas, una mediante el núcleo geniculado lateral del tálamo y la otra por el núcleo dorsal del rafe del tronco cerebral; sin embargo, se sospecha que estas regulan señales no fóticas (Reppert & Weaver, 2001).

Recientemente se reconoció el mecanismo por el cual un estímulo luminoso en la retina sincroniza el marcapasos circadiano en el NSQ. Se identificó a la Melanopsina como el fotorpigmento circadiano, el cual ocasiona la despolarización de neuronas ganglionares glutamatérgicas fotosensitivas del tracto retino-hipotalámico (Berson *et al.*, 2002).

REGULACIÓN HOMEOSTÁTICA

La interacción entre la “necesidad de dormir” y los ritmos circadianos regulan la duración y las características del sueño. Se ha propuesto que el mecanismo por el cual se desencadena la necesidad del dormir es mediante la acumulación de sustancias durante la vigilia.

La adenosina es un somnógeno endógeno putativo, su acumulación en el SNC durante periodos prolongados de vigilia es el principal indicio de una regulación homeostática del sueño (Porkka-Heiskanen *et al.*, 1997).

Esto se llama “proceso S”, el cual interactúa con factores circadianos (“proceso C”) en el modelo propuesto por Boberly (Boberly, 2001).

Se ha sugerido que durante periodos prolongados de vigilia, la adenosina acumulada inhibe neuronas GABA del hipotálamo anterior y cerebro anterior, las cuales inhiben las neuronas del núcleo VLPO promotoras del sueño durante la vigilia (Shiromani *et al.*, 1999; Strecker *et al.*, 2000). Las neuronas GABA del VLPO promotoras del sueño inhiben a las neuronas promotoras de la vigilia del TMN, LC, DR, LDT, PPT; favoreciendo así el sueño nREM y subsecuentemente el sueño REM (Figura 2 y 4) (Shiromani *et al.*, 1999).

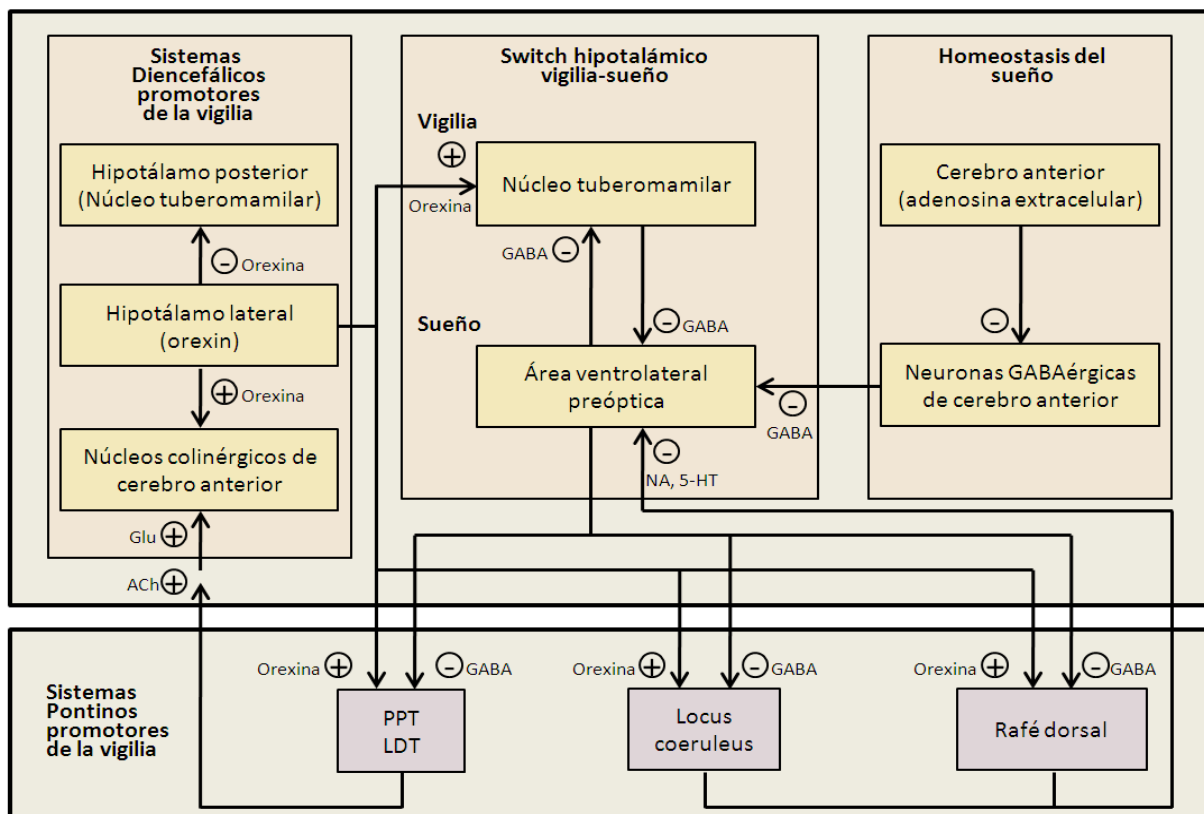


Figura 4. Mecanismos reguladores del CVS

(+) Estimulación, (-) Inhibición

Existe una inhibición recíproca entre el núcleo promotor del sueño (VLPO) y los núcleos promotores de la vigilia (PPT/LDT, LC, RD, HL).

La desinhibición del VLPO secundaria a la inhibición de las neuronas GABA del cerebro anterior por la acumulación de adenosina permite la inhibición de los núcleos promotores de la vigilia.

NARCOLEPSIA

La narcolepsia es una enfermedad crónica neurodegenerativa, caracterizada por una regulación anormal del CVS, la cual cursa con excesiva somnolencia diurna (ESD) y manifestaciones anormales del sueño REM (cataplejía, parálisis del sueño y alucinaciones hipnagógicas y/o hipnopómpicas). Los mecanismos centrales de control del CVS están alterados en la narcolepsia, teniendo una función crucial en su fisiopatología el hipotálamo, y concretamente el sistema orexinérgico.

Las primeras descripciones del síndrome narcolepsia/cataplejía fueron hechas por Westphal en 1877 (Westphal, 1877) y por Fisher en 1878 (Fisher, 1878). La relación entre episodios de debilidad muscular desencadenados por la emoción y el estado de somnolencia fueron descritos en estos 2 reportes.

En 1880, se le reconoció a Gélinau el haber acuñado el término narcolepsia (del griego *nárke*, “letargo”, y *lepis*, “posesión”) y reconocer a este trastorno como una entidad clínica específica (Gélinau, 1880; Gélinau, 1881). Sin embargo, el no diferenció los episodios de debilidad muscular y los ataques de sueño desencadenados por emociones intensas; en lugar de eso, Gélinau sugirió que existía una relación fisiológica entre estos 2 síntomas. Loëwenfeld fue el primero en bautizar a estos episodios de debilidad muscular desencadenados por emociones como “cataplejía” (Loëwenfeld, 1902).

La primera definición consensuada de narcolepsia se elaboró durante el “Primer Simposio Internacional de Narcolepsia” celebrado en Julio de 1975, en La Grande Motte, Francia. En esta reunión se acordó que la narcolepsia era: “Un síndrome de origen desconocido caracterizado por tendencias de sueño anormal, incluyendo una excesiva somnolencia durante el día con disturbios del sueño nocturno y manifestaciones patológicas del sueño REM. Las alteraciones del sueño REM incluyen intrusiones del sueño REM, así como los procesos inhibitorios disociativos del sueño REM, cataplejía y parálisis del sueño” (Guilleminault *et al.*, 1976).

FISIOPATOLOGÍA

Hace más de 2 décadas, Broughton y colaboradores elaboraron la hipótesis de que la narcolepsia debería ser considerada como una enfermedad con alteraciones de los mecanismos que controlan las transiciones del CVS. Ellos argumentaron que la ESD, cataplejía y las alucinaciones podían ser vistas como una disrupción de “algún pegamento neuroquímico” o de los mecanismos fisiológicos integrativos que existe para la continuidad del sueño y la vigilia (Broughton *et al.*, 1986).

Hoy en día, está claramente demostrado que dicho “pegamento neuroquímico” encargado de regular el mantenimiento de la vigilia son las orexinas. A continuación se describirá brevemente las características de dicho neuropéptido.

El Sistema Orexinérgico

En 1998, dos grupos de investigación independientes describieron un nuevo sistema de neuropéptidos hipotalámicos con distintos procedimientos. El primer grupo los denominaron hipocretina 1 y 2 por su origen hipotalámico y su parecido a la hormona secretina (de Lecea *et al.*, 1998) y el segundo, en cambio, orexina A y B por su presumible función en la regulación del apetito (Sakurai *et al.*, 1998). Los péptidos son sintetizados a partir de un gen situado, en humanos, en el cromosoma 17q21, que da origen a una molécula precursora, la prepro-orexina de 131 aminoácidos. De ésta deriva una molécula de 33 aminoácidos (Orexina A) y otra de 28 aminoácidos (Orexina B), ambas con gran conservación de la secuencia de aminoácidos entre diversas especies estudiadas, lo que señala su importante función biológica. La Orexina A contiene en su molécula 2 puentes disulfuro que le confieren una mayor estabilidad estructural, lo que a diferencia de la Orexina B, permitirá su detección en el líquido cefalorraquídeo (LCR).

Las neuronas orexinérgicas se sitúan exclusivamente en el hipotálamo lateral, con un número entre 15000 y 80000, desde donde envían proyecciones a múltiples áreas del SNC, principalmente a áreas noradrenérgicas (locus coeruleus), monoaminérgicas (área tegmental ventral), serotoninérgicas (núcleos del rafe), e histaminérgicas (núcleos tuberomilares), áreas todas ellas implicadas, entre otras funciones, en la regulación del sueño/vigilia (Peyron *et al.*, 1998; Thannickal *et al.*, 2000). Existen 2 tipos de receptores postsinápticos acoplados a

proteínas G (subtipo G_{q/11}) (OXR1 y OXR2), con una distribución prácticamente solapada en el SNC (Trivedi *et al.*, 1999).

La actividad orexinérgica tiene una función excitadora (van del Pol *et al.*, 1998), con un pico de secreción al final del periodo de vigilia tanto en especies diurnas como nocturnas. Las neuronas orexinérgicas están activas en periodos de vigilia según datos obtenidos mediante estudios de la expresión de c-Fos (van del Pol *et al.*, 1998), variaciones de inmunoreactividad para Orexina A y ARN mensajero de prepro-orexina en protuberancia e hipotálamo (Taheri *et al.*, 2000), y medición de concentraciones extracelulares de orexina en el hipotálamo (Yoshida *et al.*, 2001; Kiyashchenko *et al.*, 2002).

Alteraciones del Circuito Orexinérgico y Narcolepsia

La orexina y su relación con la narcolepsia ha acaparado la atención de los investigadores en los últimos años, sin embargo, esto inició con un brillante pero incidental descubrimiento.

El raciocinio era que genes expresados en el hipotálamo podrían tener efectos terapéuticos en el control del apetito. Con el fin de determinar el rol de la orexina en la conducta alimenticia, el grupo de Yanagisawa generó un ratón con una eliminación del gen (knockout) que codifica para prepro-orexina. En dicho ratón no se observó alteraciones en la ingesta de alimentos, no obstante, tras un análisis de registro en video, se determinó que el ratón knockout de orexina presentaba una somnolencia excesiva y episodios catapléjicos (Chemelli *et al.*, 1999).

Esta asociación fue confirmada coincidentemente en el mismo año, cuando el grupo de Mignot identificó el gen que originaba la narcolepsia canina, mediante un análisis cromosómico sistemático. Ellos descubrieron que los perros con narcolepsia hereditaria presentaban una mutación en el gen para el receptor OXR2 (Lin *et al.*, 1999).

En un trabajo subsecuente, el grupo de Yanagisawa creó unos ratones knockout para ambos receptores de orexina. Ellos encontraron que el ratón knockout para OXR2 experimentaba un cese en la actividad, los cuales fueron definidos como “ataques se sueño”. Asimismo, también encontraron que el ratón knockout para OXR1 presentaba un sueño fragmentado (Chemelli *et al.*, 2000; Willie *et al.*, 2003).

Posteriormente, dos grupos independientes encontraron simultáneamente que pacientes que padecieron el síndrome de narcolepsia/cataplejía presentaban una pérdida mayor al 90% de

neuronas orexinérgicas en un análisis histológico postmórtem (Peyron *et al.*, 2000; Thannickal *et al.*, 2000). Esta pérdida fue selectiva, ya que las neuronas MCH, que se encuentran co-localizadas en el HL junto con las neuronas orexinérgicas, se encontraban intactas. Con esto infirieron que se trataba de una pérdida celular de la población orexinérgica y no una regulación a la baja en la expresión de orexina. Asimismo, las neuronas orexinérgicas contienen prodinorfina (PDYN) y pentraxina neuronal II (NPTX2).

Estudios han demostrado que estas dos proteínas se encuentran ausentes en el HL, pero no en otras áreas del cerebro de pacientes narcolépticos, sugiriendo que las neuronas orexinérgicas cesan la producción de PDYN y NPTX2 o que existe una pérdida de la población orexinérgica (Peyron *et al.*, 2000; Thannickal *et al.*, 2000).

Coincidentemente, el grupo de Mignot encontró que los pacientes narcolépticos presentan niveles indetectables de orexina en líquido cefalorraquídeo (LCR) (Nishino *et al.*, 2000).

El grupo de Shiromani sugirió que, ya que lesiones electrolíticas o químicas del HL no producen un patrón narcoléptico, una población específica necesitaba ser destruida.

Ellos dañaron específicamente la población orexinérgica del HL mediante la administración de orexina conjugada con la proteína saporina (inactivadora ribosomal). Las ratas lesionadas presentaron un aumento en sueño nREM y REM, así como intrusiones de sueño REM en el estado de vigilia, lo cual es característico de un fenotipo narcoléptico (Gerashchenko *et al.*, 2001).

No obstante, en la mayoría de los casos, la narcolepsia humana no es secundaria a lesiones como lo es en las ratas lesionadas con saporina. Con el fin de crear un modelo animal que se asemejara a la narcolepsia humana, el grupo de Yanagisawa generó un ratón en el cual se provoca una neurodegeneración progresiva de neuronas orexinérgicas al transfectar un gen con una multiplicación anómala de poliglutamina (ataxina-3). Estos ratones presentan una neurodegeneración de la población orexinérgica y un fenotipo equivalente a la narcolepsia humana (Hara *et al.*, 2001).

Con todo lo anterior, claramente se ha demostrado que la narcolepsia es secundaria a una alteración selectiva del sistema orexinérgico; sin embargo, la pérdida orexinérgica podría no ser causada solo por una alteración genética, ya que la narcolepsia se adquiere durante la adultez joven y la mayoría de los pacientes no presentan alteraciones en el gen que codifica la prepro-orexina o los receptores OX1 y OX2 (Guilleminault & Anognos, 2000).

EPIDEMIOLOGÍA

La narcolepsia no es una enfermedad rara. Estudios poblacionales dan un valor de prevalencia de 1 entre 2000-4000 habitantes (Aldrich, 1998; Ohayon *et al.*, 2002), de lo que se deduce que probablemente es una enfermedad subdiagnosticada. El inicio de la clínica suele ocurrir en la adolescencia, aunque puede debutar años más tarde según una distribución bimodal (Dauvilliers *et al.*, 2001), con igual afectación de ambos sexos. Casi todos los casos son esporádicos, aunque ocasionalmente se han descrito casos de narcolepsias secundarias a lesión del área hipotalámica por tumores, ictus o esclerosis múltiple (Malik *et al.*, 2001). Estudios en familiares de primer grado revelan un aumento del riesgo de narcolepsia, entre 10-40 veces, aunque sólo un 25-30% de gemelos monocigóticos son concordantes para narcolepsia (Mignot, 1998). Todo ello implicaría a factores ambientales que al interactuar sobre una base genética predisponente, participarían en el desarrollo de la enfermedad.

CLÍNICA

Las manifestaciones clínicas de la narcolepsia se pueden agrupar en una tetraada sintomatológica (ESD, cataplejía, parálisis del sueño, alucinaciones hipnagógicas/hipnopómpicas) (Yoss & Daly, 1957), aunque sólo un 10-15% de pacientes la presentan de forma completa (Parkes, 1985; Martínez-Rodríguez *et al.*, 2002).

Excesiva Somnolencia Diurna

La hipersomnolia de los pacientes con narcolepsia no es distinta a la que se encuentra en otras entidades con alteraciones del sueño, aunque una de sus características es que se suele aliviar tras un sueño de corta duración, con un intervalo de minutos a horas (siestas refrescantes). Es variable a lo largo del día, predominando en situaciones pasivas. A consecuencia de la hipersomnolia, los pacientes pueden presentar conductas automáticas, en las que el paciente realiza acciones que posteriormente no recuerda debido a un menor estado de vigilia. Ocasionalmente, la hipersomnolia se manifiesta como ataques de sueño incoercibles, sin sensación subjetiva premonitoria de somnolencia. La cantidad de sueño de un paciente narcoléptico a lo largo de las 24 horas no es distinta de la de un sujeto normal. El problema principal estriba en una dificultad para mantener un estado de vigilia y/o sueño de forma continuada. Derivado de ello, presentan intrusiones de sueño en vigilia, y un sueño nocturno fragmentado (Figura 5B) (considerado en sí mismo como el quinto síntoma característico de la narcolepsia).

Trastornos del Sueño Rem

Las primeras descripciones del sueño REM y su respectiva atonía muscular llevaron a diversos investigadores a estudiar las características del inicio del sueño en la narcolepsia, así como la relación entre el sueño REM y dicha patología.

En 1960, Vogel fue el primero en reportar una transición directa al sueño REM desde vigilia (Figura 3) en un paciente narcoléptico (Vogel, 1960); ese hallazgo fue corroborado por Rechtschaffen y Dement años más tarde (Rechtschaffen & Dement, 1967). Posteriormente, Hishikawa estudió el EEG de pacientes narcolépticos durante la parálisis de sueño y alucinaciones hipnagógicas (Hishikawa *et al.*, 1968). Estos estudios sentaron las bases para determinar que las alteraciones del sueño REM ocasionan la mayoría de los síntomas de la narcolepsia.

Cataplejía

La cataplejía consiste en episodios súbitos de atonía muscular desencadenada por emociones (Anic-Labat *et al.*, 1999). La musculatura afecta puede ser generalizada, o bien, limitarse a grupos musculares determinados, como faciales o de extremidades. La respiración y los movimientos oculares nunca se ven afectados en los episodios de cataplejía. La pérdida de fuerza suele ser rápida, pero progresiva, por lo que los pacientes no suelen presentar traumatismos. El episodio dura generalmente unos segundos, aunque raramente pueden ser prolongados o muy frecuentes y desencadenados por estímulos leves, sobre todo si ha habido una retirada brusca de medicación anticatapléjica. El nivel de conciencia no está afectado en los episodios, aunque si son prolongados, el paciente puede llegar a dormirse.

La cataplejía, aunque muy específica de narcolepsia, no es patognomónica, ya que también puede ocurrir en algunas enfermedades poco frecuentes como el síndrome de Prader-Willi, la enfermedad de Niemann Pick tipo C, la enfermedad de Norrie, el síndrome de Moebius, y en el síndrome paraneoplásico anti-Ma2 (Parkes *et al.*, 1998; Rosenfeld *et al.*, 2001).

Durante los episodios de cataplejía, la actividad de neuronas noradrenérgicas en el locus coeruleus cesa, disminuye la de neuronas serotoninérgicas, pero se mantiene a niveles similares a los de vigilia la actividad de neuronas histaminérgicas, lo que estaría en concordancia con la preservación de la vigilia durante los episodios. Estímulos emocionales intensos provocarían una reducción fisiológica de aferencias excitadoras sobre estas áreas, que en los pacientes narcolépticos, al carecer de la principal aferencia excitadora del sistema hipocretina, originaría un desequilibrio en el balance de neurotransmisión originando una atonía muscular (John *et al.*, 2004).

Parálisis de Sueño y Alucinaciones Hipnagógicas/Hipnopómpicas

Aunque característica de la narcolepsia, la parálisis de sueño puede ocurrir ocasionalmente en sujetos sanos. Al igual que la cataplejía, se considera una intrusión parcial del sueño REM en vigilia, originando una atonía muscular generalizada, respetando la musculatura diafragmática y ocular, pero característicamente ocurre bien al despertar (hipnopómpica) o al inicio del sueño (hipnagógica) y se puede acompañar de alucinaciones visuales o incluso auditivas. El episodio acaba espontáneamente tras unos segundos o minutos, o bien al estimular al paciente.

DIAGNÓSTICO

A pesar de que la cataplejía es muy específica de la enfermedad, no siempre está presente. En ocasiones, sujetos sanos pueden reportar experiencias de “falta de fuerza” o “parálisis” que pueden llegar a ser difíciles de diferenciar por la historia clínica de una verdadera cataplejía.

Los criterios diagnósticos de narcolepsia cataplejía según la “International Classification of Sleep Disorders” (American Academy of Sleep Medicine, 2005) son:

A. El paciente se queja de excesiva somnolencia diurna, que ocurre casi diariamente durante los últimos tres meses.

B. Una historia de cataplejía definida como episodios repentinos y transitorios de pérdida del tono muscular desencadenado por emociones.

C. En la medida de lo posible, debería confirmarse el diagnóstico mediante polisomnografía nocturna (PSGn) seguida de una prueba múltiple de latencias de sueño (MLST): La latencia media de sueño debe ser menor o igual a 8 minutos con 2 o más entradas en REM, seguidas a un sueño nocturno suficiente durante la noche anterior a la prueba (mínimo 6 horas).

La característica polisomnográfica de la narcolepsia es la presencia de transiciones directas de vigilia a REM (DREM) en el MSLT (Figura 5B). En esta prueba, se le da al paciente 4 ó 5 oportunidades para dormir durante 20 minutos cada 2 horas, entre las 9:30 y las 17:30 horas. Sin embargo, la presencia de DREMs es relativamente inespecífica, pudiendo presentarse también en otras entidades con hipersomnia. Un número mayor de dos DREMs, en cambio, sería altamente sugestivo de narcolepsia. Sin embargo, hasta un 15% de narcolépticos tienen un MSLT sin presencia de DREM (Aldrich *et al.*, 1997).

D. La hipersomnia no es explicada por otro trastorno del sueño neurológico o mental, por uso de medicamentos o trastorno de abuso de sustancias. Aunque su diagnóstico es fundamentalmente clínico; actualmente, de entre las pruebas complementarias más usadas para el diagnóstico, resaltar que la MLST es la técnica de elección en la mayoría de los casos, siendo especialmente útil en casos sin cataplejía (realizándose con un PSGn previo la noche anterior y sin tratamiento antidepresivo o estimulante en el momento de la realización).

Alternativamente, los niveles de Orexina A en LCR son menores o iguales a 110 pg/mL o un tercio de los valores normales de los controles. Los niveles de Orexina A en LCR guardan una buena correlación con la población neuronal hipotalámica (Gerashchenko *et al.*, 2003). La

determinación de Orexina A, dentro de un contexto clínico adecuado, ayudaría en el diagnóstico de casos problemáticos, presentando una sensibilidad de 87% y una especificidad de 99% para la entidad narcolepsia-cataplejía (Mignot *et al.*, 2002). Por lo general, otras hipersomnias tienen un valor de Orexina A en LCR normal (mayor de 200 pg/ml).

Otras enfermedades en las que se han descrito niveles indetectables de Orexina A en LCR son en el síndrome de Guillain-Barré (Mignot *et al.*, 2002) y en la encefalitis paraneoplásica anti-Ma246. Niveles reducidos, pero detectables, de Orexina A se han descrito en algunos pacientes con narcolepsia sin cataplejía, distrofia miotónica y en la enfermedad de Niemann-Pick tipo C, entre otras entidades (Mignot *et al.*, 2002; Martínez-Rodríguez *et al.*, 2003, Vankova *et al.*, 2003).

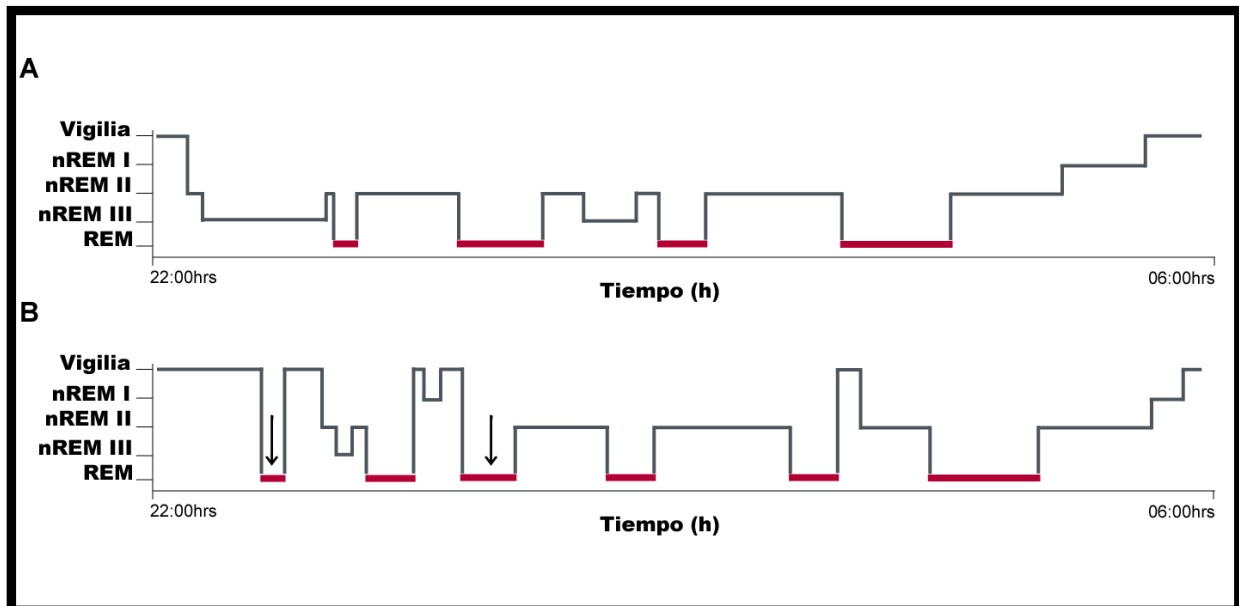


Figura 5. Alteraciones del CVS en pacientes con narcolepsia

- (A) Hipnograma de un sujeto normal
 - (B) Hipnograma de un paciente narcoléptico
- Flecha: Episodio DREM

TRATAMIENTO

Para el tratamiento de la narcolepsia, se deben separar por un lado, la excesiva somnolencia diurna, y por otro lado la cataplejía. Para mejorar el control de ambos síntomas, es útil establecer unas medidas de higiene del sueño, realizando un patrón de CVS lo más regular posible, evitando privaciones de sueño o cambios bruscos del ritmo circadiano como ocurre en los cambios laborales de turno. El realizar siestas cortas a intervalos estratégicamente situados, puede suponer un mejor control de los síntomas, incluso llegando a reducir considerablemente la necesidad de tratamiento farmacológico.

Excesiva Somnolencia Diurna:

De las directrices de la European Federation of Neurological Societies (EFNS) se pueden extraer las principales indicaciones para el tratamiento de la narcolepsia. Para el tratamiento de la ESD (primera manifestación clínica en casi todos los pacientes, el síntoma más grave y la causa más frecuente de consulta), el fármaco de primera elección lo constituye actualmente el modafinilo por diferentes motivos, destacando su bajo potencial de abuso que podría ser especialmente importante en casos sin cataplejía; además, los efectos de éste fármaco han sido cuidadosamente estudiados en diseños doble ciego, placebo/control, demostrando su eficacia.

El principal efecto de los estimulantes descritos en la tabla 1 es el de incrementar la transmisión monoaminérgica por un doble mecanismo, estimulando la liberación y bloqueando la recaptura de monoaminas.

Las anfetaminas y similares poseen un impacto directo sobre las sinapsis noradrenérgicas, ayudando así a controlar la cataplejía y la parálisis del sueño; sin embargo, el modafinilo no posee esta propiedad, siendo aún desconocido su mecanismo de acción. Los efectos adrenérgicos de los fármacos similares a las anfetaminas están relacionados con los efectos que ejerce sobre el sueño REM.

Alteraciones del Sueño REM:

El tratamiento de la cataplejía, las alucinaciones hipnagógicas y la parálisis del sueño requieren de la administración de antidepresivos, que son eficaces en parte debido a su potente efecto supresor del sueño REM.

Recientemente, el oxibato sódico ha sido considerado como un fármaco de primera línea en el tratamiento holista de la narcolepsia-cataplejía. Este fármaco ha demostrado que mejora todos los síntomas de la narcolepsia-cataplejía con una evidencia de clase A, lo que le ha valido la aprobación de la *Food and Drug Administration* estadounidense y de la Agencia Europea del Medicamento para el tratamiento de esta enfermedad.

MEDICAMENTO	MECANISMO DE ACCIÓN
Somnolencia excesiva diurna	
Metilfenidato	Potente inhibidor de la recaptura de DA.
Dextroanfetamina y Metanfetamina	Agonista indirecto de los receptores presinápticos de DA. Se utiliza cuando el metilfenidato es ineficaz.
Modafinilo	Con mecanismo de acción indefinido. Posee menor potencial de abuso que las drogas anteriores y un perfil de efectos secundarios bastante benigno.
Alteraciones del sueño REM	
Protriptilina	Antidepresivo tricíclico inhibidor del transportador de NA y 5-HT. Su eficacia está limitada sobre todo por los efectos colaterales anticolinérgicos.
Sintomatología completa	
Oxibato sódico	También conocido como gamma hidroxibutirato sódico o GHB Sódico. Es agonista del receptor Gamma hidroxibutirato, el cual promueve la liberación de DA y Glu.

Tabla 1. Terapéutica actual para la narcolepsia

No obstante, a pesar de todos los avances para el tratamiento de la narcolepsia, el enfoque actual es meramente sintomático y no se dispone, hasta la fecha, de un tratamiento específico que revierta o prevenga la enfermedad.

MODELOS ANIMALES DE NARCOLEPSIA

Los modelos animales son necesarios para el estudio de enfermedades humanas cuando es impráctico o poco ético utilizar humanos. Estos modelos poseen características físicas o sufren alteraciones similares a aquellas observadas en pacientes; las cuales permiten realizar comparaciones entre la fisiología animal y humana, facilitando el entendimiento de la fisiopatología de una enfermedad.

Los modelos pueden ser ya sea espontáneos, donde un animal posee naturalmente las características observadas en los humanos; o inducida donde el animal ha sido alterado, por ejemplo, mediante cirugía o manipulación genética. Estos modelos animales son útiles para el estudio de las causas subyacentes de una enfermedad.

A continuación se describirán los modelos animales de narcolepsia más utilizados en la actualidad.

NARCOLEPSIA CANINA (CANARC)

En la década de los 70's se describió la narcolepsia canina (Knecht *et al.*, 1973; Mitler *et al.*, 1974), lo cual llevó al establecimiento de una colonia de perros narcolépticos en la Universidad de Stanford para el estudio de dicha enfermedad (Mitler & Dement, 1974).

Este modelo se ha sido extensamente utilizado para estudios farmacológicos, neurofisiológicos, neuroquímicos, neuroanatómicos y genéticos (Boehme *et al.*, 1984; Bowersox *et al.*, 1987; Kaitin *et al.*, 1985; Kilduff *et al.*, 1986; Lucas *et al.*, 1977; Mefford *et al.*, 1982; Mignot *et al.*, 1988; Nishino *et al.*, 1994; Siegel *et al.*, 1992).

La narcolepsia canina es un modelo animal que presenta similitudes clínicas y electrofisiológicas con la narcolepsia humana (Lucas *et al.*, 1979; Baker & Dement, 1985; Kushida *et al.*, 1985; Mignot *et al.*, 1998). En perros labrador y doberman, la enfermedad es un trastorno autosómico recesivo en el cual está alterado el gen llamado canarc-1 (canarc: canine narcolepsy); todos los animales homocigóticos de padres narcolépticos presentan ataques catapléjicos espontáneos, un sueño fragmentado e hipersomnolencia (Baker & Dement, 1985; Mignot *et al.*, 1998).

Un análisis subsecuente de posicionamiento clonal identificó al gen *canarc-1* como el gen para OXR2 (Lin *et al.*, 1999). El descubrimiento de que una mutación en el locus para OXR2 produce la narcolepsia canina sugirió que las orexinas y sus respectivos receptores son los principales neuromoduladores del sueño, al interactuar con los sistemas aminérgicos y colinérgicos.

RATA TAIEP

El modelo TAIEP (temblor, ataxia, inmovilidad episódica y parálisis) es una rata mutante en la cual se degenera progresivamente la mielina del SNC (Holmgren *et al.*, 1989; Duncan *et al.*, 1992). Esta pérdida de mielina central es secundaria a una acumulación anómala de microtúbulos en el citoplasma de los oligodendrocitos, la cual interfiere con el tránsito normal de proteínas recién sintetizadas y ARN mensajero (mARN) encargadas de formar mielina (Duncan *et al.*, 1992; Couve *et al.*, 1997).

La rata TAIEP ha sido descrita como un modelo similar al síndrome de narcolepsia/cataplejía debido a los eventos de inmovilidad, los cuales, durante el registro EEG muestran una actividad desincronizada asociada con ritmo teta en el hipocampo. Estos eventos tónicos de inmovilidad (reflejo/respuesta de inmovilidad) se inducen al tomar a la rata de la base de la cola o al tomarla del tórax.

Asimismo, también muestra un patrón de sueño desorganizado (Prieto *et al.*, 1991; Anch & Laposky, 2000). Estos hallazgos muestran que las ratas TAIEP poseen un EEG y un CVS similar al observado en la narcolepsia canina y humana (Aldrich, 1998; Nishino & Mignot, 1997; Eguibar & Cortés, 2010).

La causa de las alteraciones en el CVS en este modelo es la activación de células gliales, las cuales se activan posteriormente a la pérdida de mielina en el SNC, distorsionando los mecanismos que regulan el tono muscular en el tallo cerebral (Krsulovic *et al.*, 1999; Lunn *et al.*, 1997; Siegel *et al.*, 1999).

RATÓN KNOCKOUT DE OREXINA

Este ratón fue creado con el fin de determinar el rol de las orexinas en la conducta alimenticia. Para eliminar el gen de prepro-orexina (proteína precursora), se construyó un vector para reemplazar el exón 1 por un casete nuclear lac-Z mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias (Chemelli *et al.*, 1999). Animales homocigotos presentan una pérdida total de la señal orexinérgica, mientras que animales heterocigotos mostraban un 50% de la señal orexinérgica con respecto a los ratones silvestres.

Contrario a la hipótesis inicial, este ratón no presentó alteraciones significativas en la conducta alimenticia; sin embargo, tras un análisis conductual en video, se observó que este animal presentaba un fenotipo narcoléptico. Dicho fenotipo se caracteriza por un cese abrupto de la actividad motora, el cual, tras un análisis electrofisiológico reveló que consistía de una intrusión de sueño REM durante la vigilia. Además, tanto con en el paciente narcoléptico, el ratón knockout de orexina también presenta hipersomnolencia y una disrupción del patrón de sueño (Chemelli *et al.*, 1999).

RATONES KNOCKOUT DE OXR1 Y OXR2

Estudios posteriores en ratones demostraron que el ratón knockout de OXR2 también presentaba cataplejía, pero con un fenotipo narcoléptico menos severo que el del ratón knockout de orexina (Chemelli *et al.*, 2000).

En contraste, el ratón knockout de OXR1 prácticamente no presenta alteraciones conductuales evidentes, con la excepción de una ligera fragmentación del sueño (Kisanuki *et al.*, 2000).

Con estos estudios, se infiere que la falta de OXR2 es esencial para el desarrollo de un fenotipo narcoléptico, mientras que OXR1 actúa meramente como un potenciador de los síntomas narcolépticos.

RATÓN OREXINA-ATAXINA-3

Estudios previos en ratones determinaron que modificaciones del circuito orexinérgico a nivel genético, ya sea del péptido o del receptor, resultaban en un fenotipo narcoléptico; sin embargo, en pacientes narcolépticos, no existen alteraciones en los genes de prepro-orexina o en los OXRs.

Con el propósito de crear un modelo que se asemejara más a un paciente narcoléptico, se decidió elaborar un ratón que presentara una degeneración gradual y progresiva de la población orexinérgica. Para esto, se acopló al gen de prepro-orexina un transgen tóxico con el fin de remover selectivamente las neuronas orexinérgicas en ratones transgénicos. Este transgen, ataxina-3, un cADN truncado obtenido de un paciente con la enfermedad Machado-Joseph, induce la expansión anormal de tripletes de glutamina, la cual provoca apoptosis en células que la expresan.

En este modelo, las neuronas orexinérgicas hipotalámicas degeneran gradualmente, llegando a desaparecer por completo a las 15 semanas de edad. Estos ratones presentan un fenotipo narcoléptico tras alcanzar una pérdida del 70% de la población orexinérgica (Hara *et al.*, 2001).

DEGENERACION DE LA POBLACION OREXINERGICA

Actualmente, contamos con una gran variedad de modelos de narcolepsia, los cuales han sentado las bases para el entendimiento de la enfermedad; sin embargo, el conocimiento sobre los mecanismos por los cuales degenera la población orexinérgica es prácticamente nulo.

La asociación entre la narcolepsia y los marcadores del sistema antígeno de leucocitos humanos (en inglés: human leukocyte antigen, HLA) DR2 y DQB1*0602 sugiere que la narcolepsia es una enfermedad autoinmune, ya que el 90% de los pacientes narcolépticos tienen el gen HLA-DQB1*0602 (Honda *et al.*, 1983; Matsuki *et al.*, 1992; Mignot *et al.*, 1994).

MOLECULAS EXPRESADAS EN LA POBLACIÓN OREXINÉRGICA

Debido a la estrecha relación con el sistema HLA, actualmente se sospecha que la narcolepsia sea el resultado de un proceso autoinmune, sin embargo, la causa por la cual se pierde la población orexinérgica es aún un misterio.

Con el fin de determinar genes que pudieran estar alterados en la narcolepsia y que pudieran regular la expresión de orexina o ser el blanco de una reacción autoinmune, el laboratorio del Dr. Mignot realizó un perfil de expresión génica en el hipotálamo de pacientes narcolépticos y ratones orexina-ataxina-3 (Honda *et al.*, 2009).

PROTEÍNA	1 / Regulación a la baja
Prodinorfina (PDYN)	5.7
Orexina	5.3
Factor de transcripción O/E3	2.6
Pentraxina neuronal 2 (NPTX2)	2.6

Tabla 2. Proteínas reguladas a la baja en el HL de pacientes y animales narcolépticos

Ellos encontraron, como era de esperarse, una disminución de la expresión de orexina, PDYN y NPTX2 en el HL de pacientes y ratones narcolépticos (Tabla 2). Esta disminución en los niveles de expresión está relacionada con la pérdida de la población orexinérgica.

Interesantemente, también reportaron la regulación a la baja de una proteína relacionada con diversos procesos de desarrollo y diferenciación, esta proteína es el factor de transcripción O/E3 (Honda *et al.*, 2009).

FACTOR DE TRANSCRIPCION O/E3

El factor de transcripción O/E3 (también llamado Ebf2) pertenece a la familia de factores de transcripción “hélice-bucle-hélice” involucrados en el control de expresión génica que determina el destino celular y/o la diferenciación celular (Malgaretti *et al.*, 1997; Garel *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997; Garcia-Dominguez *et al.*, 2003).

O/E3 regula la diferenciación neuronal en el hipotálamo, médula espinal, cerebelo y tejido óseo (Bally-Cuif *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2004; Croci *et al.*, 2006; Jimenez *et al.*, 2007). Asimismo, ratones knockout para O/E3 (KO-O/E3) presentan diversas alteraciones anatómicas, incluyendo una migración deficiente de neuronas GnRH de la placoda olfatoria hacia el hipotálamo (Corradi *et al.*, 2003), osteopenia (Kieslinger *et al.*, 2005) y una muerte selectiva de células Purkinje en el cerebelo (Chung *et al.*, 2008). Consecuentemente, los ratones KO-O/E3 sufren de infertilidad, enanismo y ataxia como consecuencia de estas alteraciones (Figura 6).

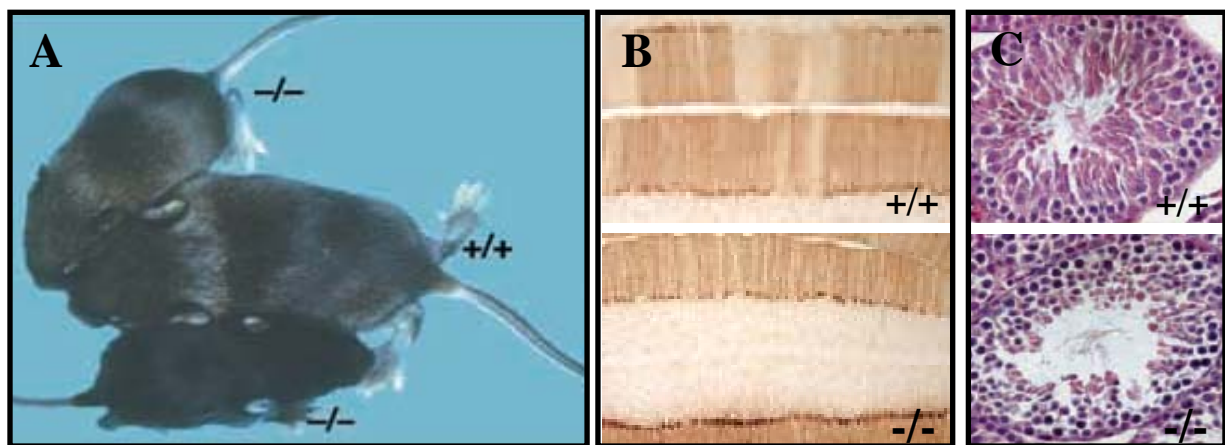


Figura 6. Alteraciones anatómicas en el ratón KO-O/E3
(+/, Silvestre; -/, KO-O/E3)

- (A) Fenotipo “enano” del ratón KO-O/E3 comparado con un ratón de la misma camada.*
- (B) Distribución en “rayas” del cerebelo de un ratón silvestre. Esta arquitectura se pierde en el ratón KO-O/E3 por la apoptosis de neuronas de Purkinje.**
- (C) Hipoplasia de los túbulos seminíferos en el ratón KO-O/E3.*

* Corradi *et al.*, 2003; ** Chung *et al.*, 2008

JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente, se desconocen las moléculas involucradas en la regulación de la población orexinérgica, así como los mecanismos por los cuales se degenera dicha población para el desarrollo de la narcolepsia.

Como se ha mencionado previamente, el factor de transcripción O/E3 es un regulador del desarrollo neuronal, el cual está expresado en las neuronas orexinérgicas del HL.

Asimismo, se encuentra regulado a la baja en un modelo animal de narcolepsia; dicha regulación a la baja se encuentra directamente relacionada con la degeneración de las neuronas productoras de orexina en los ratones orexina-ataxina-3 (Honda *et al.*, 2009).

Esta proteína es un candidato potencial como regulador de la población orexinérgica.

HIPÓTESIS

La eliminación del factor de transcripción O/E3 ocasionará alteraciones en el sistema orexinérgico, lo cual generará un fenotipo narcoléptico.

Con el fin de determinar si la pérdida de O/E3 ocasiona alteraciones de la población orexinérgica y subsecuentemente el establecimiento de un fenotipo narcoléptico, nos planteamos los siguientes objetivos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si el ratón KO-O/E3 presenta un fenotipo narcoléptico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar el CVS de ratones KO-O/E3 con ratones silvestres.
- Cuantificar la población orexinérgica en los ratones KO-O/E3.
- Cuantificar la inervación orexinérgica en la región pontina de ratones KO-O/E3.
- Caracterizar el efecto de la administración intracerebroventricular (ICV) de orexina sintética en el CVS de ratones KO-O/E3.

MATERIALES Y METODOS

GENERACION DEL RATON KO-O/E3

Todos los procedimientos realizados a animales fueron llevados a cabo siguiendo protocolos aprobados por nuestra institución, basados en estándares nacionales (http://www.senasica.gob.mx/?doc_743) e internacionales (http://www.cioms.ch/frame_1985_texts_of_guidelines.htm).

Los ratones KO-O/E3 fueron generados mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias 129S2/SvPasCrl (desarrolladas por Mitra Cowan en la Universidad Johns Hopkins). Se utilizó un vector pRVKI para generar el constructo O/E3-blanco y reemplazar los primeros 5 exones del gen O/E3 por el marcador selectivo Pgk-neo.

Un fragmento Xho IBamH de 3.2 kb de la región promotora de O/E3 fue clonada como un homólogo 5' entre la tirosina cinasa del virus del herpes simple y el marcador selectivo Pgk-neo de pRVKI.

Un fragmento Spe I-Sal I de 5.3 kb del gen O/E3 fue clonado como un homólogo 3' entre el quinto exón y el marcador selectivo Pgk-neo de pRVKI.

El constructo fue linearizado con la endonucleasa I.Sce I y electroporada en las células madre 129S2/SvPasCrl. Las células fueron seleccionadas mediante la resistencia a gancyclovir (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)/geneticin (InvitroGen, San Diego, CA, USA). Estas células fueron insertadas en blastocitos C57BL/6NCrl para la generación de quimeras.

Los ratones KO-O/E3 se obtuvieron a través de cruza entre ratones hembra y macho heterocigotos de diferentes camadas.

Para los experimentos, solo se utilizaron ratones macho KO-O/E3 y ratones silvestres de la misma camada. Los ratones se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura y humedad en cajas con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, con acceso a agua y comida *ad libitum*.

REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO DEL CVS

Doce ratones (n= 6 por grupo, 12 semanas de edad) fueron anestesiados intra-peritonealmente con ketamina-xilazina (100 y 10 mg/kg, respectivamente). Se utilizaron técnicas estériles quirúrgicas y estereotáxicas para la colocación del implante para el registro electrofisiológico.

El cráneo fue expuesto mediante una incisión longitudinal, para posteriormente realizar dos trépanos (1.5 mm lateral a la sutura sagital; 1 mm anterior a bregma y 1 mm anterior a lambda). La señal EEG fue registrada mediante la implantación de un tornillo de acero inoxidable (PlasticsONE, Roanoke, VA, USA) en cada uno de los trépanos previamente realizados. Se realizó un tercer trépano en el hueso occipital para la colocación de un electrodo de referencia (tierra) (Figura 7A).

Adicionalmente, se colocó una cánula guía de acero inoxidable (PlasticsONE C315GS-2-SPC guide 56GA 38835) en el ventrículo lateral izquierdo (coordenada estereotáxica: 0.3 mm posterior a bregma, 0.9 mm lateral a línea media, 2.4 mm ventral a la superficie del cráneo) (Figura 7B).

Para el registro EMG, la señal se obtuvo mediante la implantación de dos cables de acero inoxidable cubiertos de teflón (A-M Systems, Carlsborg, WA, USA) insertados en los músculos del cuello (Figura 7A).

Se permitió un periodo de convalecencia de 10 días a cada animal antes de realizar cualquier experimento. Para permitir el libre movimiento a cada animal durante el registro, el implante colocado en el cráneo se conectó a un cable ligero de 15 cm, el cual transmitió la señal a un conmutador giratorio. Después de dos días de habituación, cada ratón fue registrado por un periodo consecutivo de 12 hrs (inicio: 19:00 hrs). La señal EEG/EMG fue amplificada utilizando un polígrafo modelo Grass 78 (Grass Instruments, West Warwick, RI, USA) y filtrada (EEG: 0.3–100 Hz, EMG: 30–300 Hz) antes de ser digitalizada a una tasa de muestreo de 128 Hz utilizando un dispositivo de adquisición de datos (National Instruments, Austin, TX, USA). Las señales se almacenaron y analizaron utilizando un programa especializado (ICELUS, post-acquisition analysis build, University of Michigan).

Posteriormente, la señal EEG/EMG fue calificada en épocas de vigilia, sueño nREM y sueño REM, de 12 segundos cada una, utilizando los criterios de Radulovacki (Radulovacki *et al.*, 1984). Una intrusión de sueño REM fue considerada como la transición directa de vigilia a sueño REM.

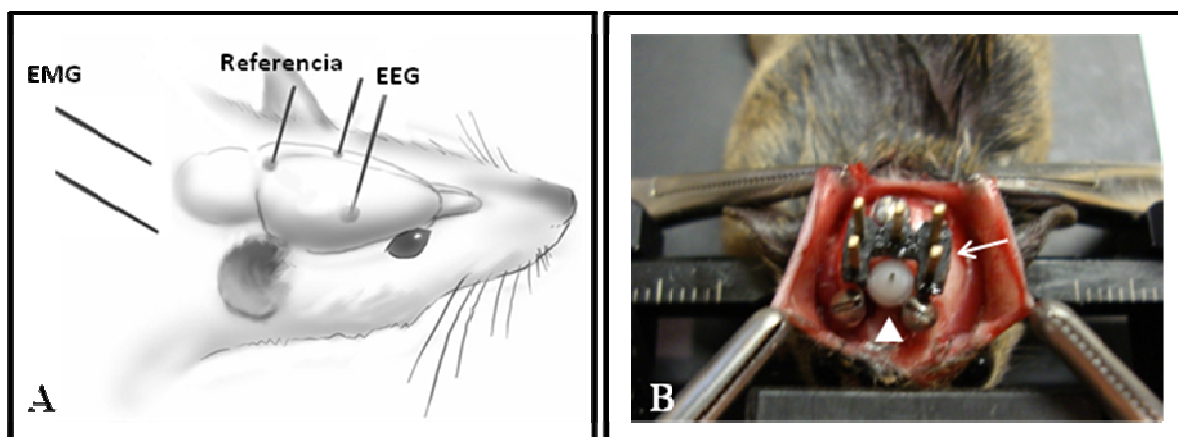


Figura 7. Registro electrofisiológico del CVS

- A) Esquema de la colocación de los electrodos para el registro EEG y EMG.
- B) Implante para el registro electrofisiológico. Flecha: implante; punta de flecha: cánula.

ADMINISTRACION DEL PEPTIDO OREXINA A

Una dosis ICV de orexina A sintética (3 nmol per mouse, Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Belmont, CA, USA; catalog n° 003-49) o de LCR artificial (vehículo) fueron administradas utilizando un diseño aleatorio ya establecido (n= 6 por grupo) (Mieda *et al.*, 2004).

Justo antes del inicio de la fase de oscuridad, se inmovilizó suavemente a cada animal y se administró una dosis de orexina A sintética o vehículo a través de una cánula (PlasticsONE C315IS-2SPC internal 33GA) insertada directamente a la cánula guía colocada en el ventrículo lateral izquierdo. Se administró un volumen de 1µl a cada ratón durante un periodo de 30 segundos (Figura 7B).

Posterior a la administración de orexina A o LCR, cada ratón fue registrado por un periodo consecutivo de 12 hrs, siguiendo el protocolo de registro previamente mencionado.

INMUNOHISTOQUIMICA CONTRA OREXINA A

Una vez concluida la fase experimental, los animales (n= 6 por grupo) fueron sacrificados con una dosis letal de fentobarbital y perfundidos transcardial con solución salina al 0.9%, seguido de paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; catalog n° P6148). Los cerebros fueron removidos de la bóveda craneal, se fijaron durante la noche en paraformaldehído al 4% y posteriormente se incubaron en sacarosa al 20% (en PBS al 0.1 M) durante 48 hrs.

Cada cerebro fue cortado en rebanadas coronales de 30 μ m, las cuales fueron montadas en orden serial en laminillas con carga positiva (Fisher, Thermo Scientific, Portsmouth, NH, USA). Las secciones fueron lavadas tres veces con PBS durante 5 minutos; subsecuentemente se bloquearon sitios de unión no específicos mediante la aplicación de una solución compuesta de PBS, 2.5% de albúmina bovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; catalog n° A-7030) y 0.25% de Tritón X-100 durante una hora a temperatura ambiente.

Posterior al bloqueo, las secciones fueron incubadas con anti-orexina A (huésped conejo, dilución 1:1000; Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Belmont, CA; catalog n° H-003-30) y con anti-colín acetiltransferasa (ChAT) (huésped cabra, dilución 1:1000, Millipore, Billerica, MA, USA; catalog n° AB144P) durante 24 hrs. Consecutivamente, las secciones se enjuagaron con tres veces con PBS durante 5 minutos, para posteriormente incubar con anticuerpos secundarios fluorescentes. Como anticuerpo secundario contra anti-orexina A se utilizó AlexaFluor 555 IgG de burro anti-conejo (dilución 1:500; Invitrogen, San Diego, CA, USA; catalog n° A31572) combinado con anticuerpo secundario AlexaFluor 680 IgG de burro anti-cabra (dilución 1:500; Invitrogen, San Diego, CA, catalog n° A21084) contra anti-ChAT durante 2 horas.

Posteriormente, cada sección fue enjuagada 3 veces con PBS durante 5 minutos, aplicando el marcador nuclear DAPI (Invitrogen, San Diego, CA, USA; catalog n° D3571, dilución 1:10,000) en el segundo enjuague, para finalmente montar cada laminilla con medio de montaje fluorescente Dako (Dako North America, Inc., ref S3023) y un cubreobjetos.

Cada sección fue visualizada utilizando un microscopio laser confocal Olympus FV-1000 con un objetivo apocromático de 60x (apertura numérica de 1.4).

CONTEO CELULAR Y CUANTIFICACION DE PÍXELES

Axones y neuronas inmunoreactivas a orexina A fueron contadas utilizando un sistema de detección automático con el programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Para cumplir con los criterios de este sistema de conteo estereológico, cada tercera sección hipotalámica fue procesada para inmunohistoquímica contra orexina A. Con el fin de evitar la sobre-estimación de somas, se definió como soma positivo para orexina a aquel objeto de forma semi-esférica con medidas mayores a 200 μm que co-localice con DAPI. El número de somas orexinérgico se calculó utilizando el método de conteo tridimensional diseñado por Williams & Rakic (<http://www.nervenet.org/papers/3DCounting.html>).

La inervación en el área pontina fue evaluada utilizando un sistema de conteo automático de partículas lineares positivas a orexina que midieran más de 9 píxeles. La intensidad de pixel se normalizó utilizando la señal de DAPI. La intensidad de pixel y el número de partículas fueron utilizadas para dicha evaluación. Se utilizó el mismo método 3D (Williams and Rakic, 1988) para el conteo de fibras orexinérgicas en el núcleo pedúnculo-pontino.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresan como media \pm SEM (error estándar de la media); n se refiere al número de células o animales. Para los cálculos estadísticos, se utilizó el Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales (SPSS) versión 16.0. El análisis T de Student fue utilizado para el número de células, densidad celular y área celular. Las diferencias significativas de tamaño de pixel e intensidad de la distribución de inervación orexinérgica fueron comparadas mediante el test de Kolmogorov-Smirnov para frecuencias acumulativas.

La comparación del efecto de cada condición (basal, LCR y orexina A) en cada fase de sueño (vigilia, nREM y REM) en dos grupos independientes (silvestre y KO-O/E3) fue evaluada mediante una ANOVA de medidas repetidas. El análisis fue realizado a cada fase del CVS (vigilia, nREM y REM), considerando el genotipo (silvestre y KO-O/E3) como factores entre-grupo y el tiempo que pasó en cada fase de sueño bajo diferentes condiciones (basal, LCR y orexina A) como factores dentro-grupo.

Posteriormente, se realizó un ANOVA para comparar la media en cada variable dependiente, seguida de un análisis *post hoc* de Tukey.

Para todas las comparaciones estadísticas, el nivel de alfa se fijó a <0.01

RESULTADOS

EVENTOS PARECIDOS A CATAPLEJIA EN EL RATON KO-O/E3

El análisis conductual en video mostró claramente el ratón KO-O/E3 presenta eventos parecidos a la cataplejía, caracterizados por un cese abrupto de la conducta motora, asociados con un cambio sostenido en la postura durante todo el episodio y una abrupta reanudación de la actividad motora (dato en video, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452211002879>).

ALTERACIONES EN EL CVS DEL RATON KO-O/E3

Los eventos parecidos a cataplejía en el análisis conductual del ratón KO-O/E3 sugirieron que este ratón podía presentar eventos DREM, característicos del fenotipo narcoléptico.

Para evaluar esta hipótesis, registramos la señal EEG/EMG a través de electrodos colocados crónicamente en ratones silvestre y KO-O/E3. Los hipnogramas representativos que muestran las transiciones del CVS fueron obtenidos de este registro.

Los hipnogramas representativos de los animales silvestre (Figura 8E) muestran un CVS con transiciones de sueño normales. En contraste, el CVS de los ratones KO-O/E3 se caracteriza por la presencia de eventos DREM (Flechas en figura 8F), con una distribución de poder de predominio en la frecuencia Teta (Figura 8D) y un patrón de sueño fragmentado, consistente con un fenotipo narcoléptico (Scamell *et al.*, 2009).

No se detectaron episodios DREM en los ratones silvestres (Figura 8 G, lado izquierdo) o en ratones heterocigotos con una copia funcional del gen O/E3 (datos no mostrados); en estos animales, el sueño REM siempre está precedido por el sueño nREM (Figura 8A) con una distribución de poder de predominio en la frecuencia Delta (Figura 8C).

Como se muestra en la tabla 4, existen diferencias significativas en el tiempo de cada fase del CVS entre los ratones silvestre y los KO-O/E3, donde los animales mutantes pasan más tiempo en sueño nREM [$F(1,8)= 14.28$, $P\leq 0.001$], sueño REM [$F(1,8)= 23.35$, $P\leq 0.001$] y mucho menos tiempo en vigilia [$F(1,8)= 24.42$, $P\leq 0.001$].

Se observaron interacciones estadísticas entre genotipo y fase del CVS [$F(2,7)= 34.35$, $P\leq 0.001$]. Adicionalmente, los ratones KO-O/E3 presentan una latencia acortada al sueño REM, comparados con los ratones silvestres ($P\leq 0.01$) (Figura 8G, lado derecho).

No hubo diferencias significativas en el tiempo pasado en vigilia, sueño nREM y sueño REM entre los animales silvestre y animales heterocigotos (datos no mostrados).

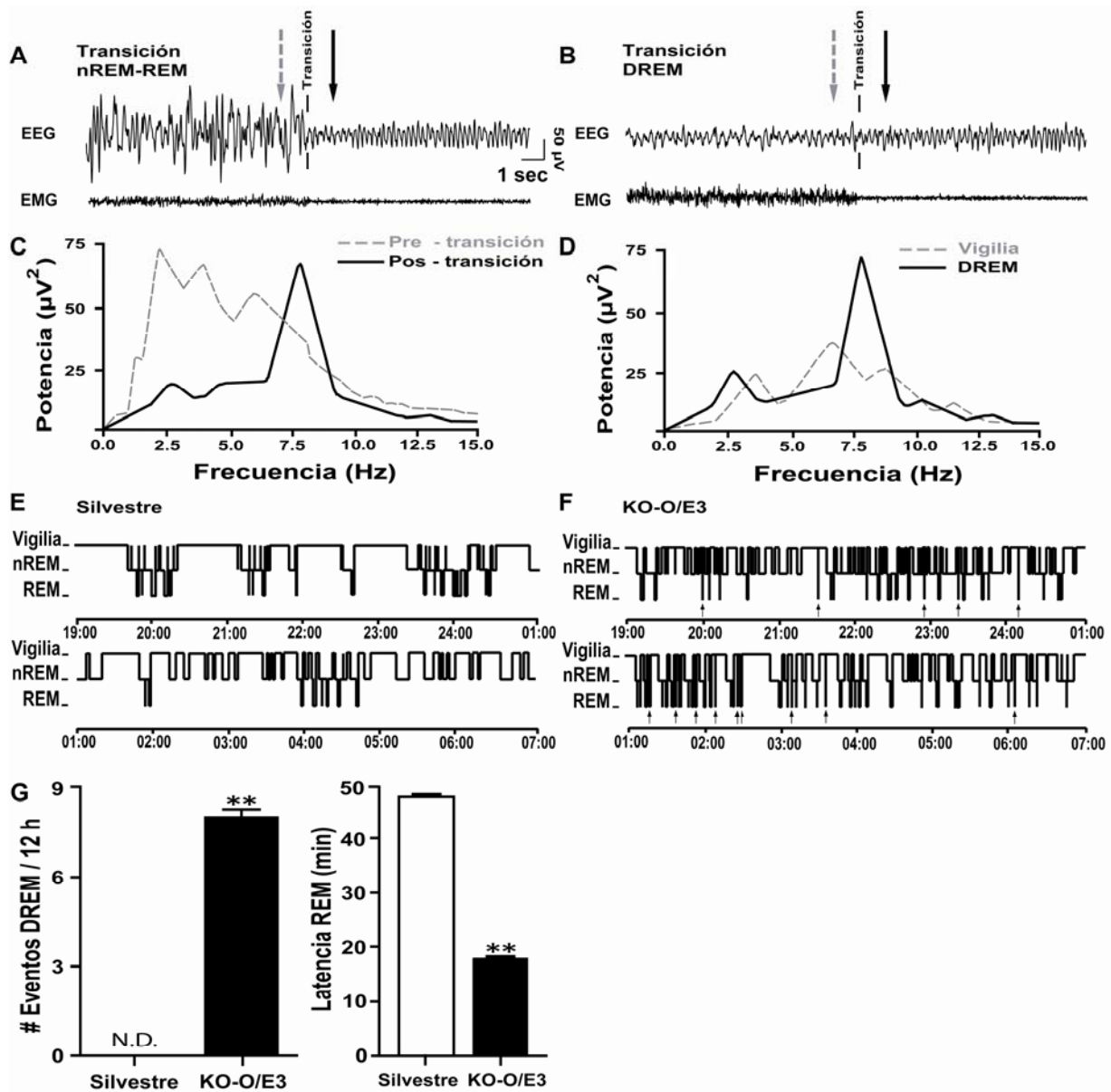


Figura 8. Fenotipo narcoléptico del ratón KO-O/E3

Los registros EEG/EMG representativos de las transiciones de sueño fueron obtenidos durante la fase de oscuridad. Los animales silvestres (A) presentan sueño REM (flecha negra en A, B) con un pico de distribución de poder del EEG en la frecuencia de 7-9 Hz (línea negra en C, D) con atonía muscular en el EMG. El sueño REM es precedido de un episodio de sueño nREM (flecha con línea intermitente en A; línea intermitente en B).

Los registros representativos del ratón KO-O/E3 revelan la presencia de episodios de intrusión REM durante la vigilia (DREM, línea continua en B), donde el sueño REM (línea continua en D) es inmediatamente precedido por un episodio de vigilia (flecha con línea intermitente en B; línea intermitente en D).

Los hipnogramas representativos obtenidos de estos registros muestran múltiples episodios DREM en los ratones KO-O/E3 (flechas negras en F); en contraste, no se observó ninguno de estos eventos en los animales silvestre (E y panel izquierdo en G). La latencia a sueño REM se encuentra disminuida en los ratones KO-O/E3 (panel derecho en G).

La distribución de poder fue obtenida de épocas de 12 segundos representativas.

** $P \leq 0.01$ vs Silvestre. N.D. (no detectado)

DISMINUCION DE LA POBLACION OREXINERGICA EN RATONES KO-O/E3

La narcolepsia es un desorden relacionado con alteraciones del circuito orexinérgico, por lo cual analizamos el núcleo orexinérgico en el HL de los ratones KO-O/E3.

La inmuno-fluorescencia contra orexina A en ratones silvestres muestra que los somas productores de orexina se encuentran restringidos al hipotálamo (Figura 9A, B). La inmunoreactividad a orexina A se encontró predominantemente en el hipotálamo postero-lateral y el área peri-fornical; se encontraron algunas neuronas orexinérgicas dispersas en el hipotálamo antero-lateral y en el núcleo dorso-medial, como ha sido descrito anteriormente (Peyron *et al.*, 1998; Nambu *et al.*, 1999).

En contraste, los compañeros de camada KO-O/E3 exhiben una pérdida significativa de neuronas orexinérgicas en el HL; los somas productores de orexina se encuentran exclusivamente dispersos en el hipotálamo postero-lateral y el área perifornical (Figura 9; recuadro en C, D).

Utilizando un enfoque para conteo celular basado en estereología, cuantificamos un total de 1434 ± 99 células orexinérgicas en los ratones silvestres. El número de neuronas orexinérgicas en los ratones KO-O/E3 se encuentra dramáticamente reducido a 292 ± 28 células [test *t* de Student, $t(10)=18.26$, $P \leq 0.01$]. La pérdida de neuronas orexinérgicas en los ratones KO-O/E3 consecuentemente ocasiona un decremento en la densidad orexinérgica [$t(116)=9.40$, $P \leq 0.01$] y a una reducción del área orexinérgica en el HL [$t(10)=18.38$, $P \leq 0.01$] (ver tabla 3).

Genotipo	Número total de células (por ratón)	Densidad celular orexinérgica (cels/mm ³)	Volumen del área orexinérgica (mm ³)
O/E3 ^{+/+}	1434.5 ± 98.6	93.6 ± 4.7	0.5 ± 0.02
O/E3 ^{-/-}	292.6 ± 27.7 **	43.9 ± 3.2 **	0.2 ± 0.01 **

Tabla 3. Disminución de la población orexinérgica en ratones KO-O/E3

El número total de neuronas orexinérgicas en el HL de los ratones KO-O/E3 (O/E3^{-/-}) se encuentra disminuido un 80% en comparación con ratones (O/E3^{+/+}).

** denota $p < 0.01$ vs. silvestre.

PROYECCIONES OREXINÉRGICAS ABERRANTES EN LOS RATONES KO-O/E3

En ratones silvestres, pudimos identificar fácilmente la presencia de fibras orexinérgicas en casi todo el cerebro (datos no mostrados) como ha sido reportado (Peyron *et al.*, 1998; Nambu *et al.*, 1999). Sin embargo, nuestro análisis de fibras orexinérgicas fue enfatizado en el área pontina con el fin de determinar si la disminución de la población orexinérgica en los ratones KO-O/E3 ocasionaba una disminución en la inervación orexinérgica del puente cerebral, un área involucrada en la regulación del CVS.

Usando al PPT como referencia anatómica (Figura 10E), el cual puede ser fácilmente identificado anatómicamente y por inmuno-reactividad a ChAT (Wang & Morales, 2009), detectamos una abundante inervación orexinérgica en el puente de ratones silvestres. En contraste, imágenes adquiridas del PPT de los ratones KO-O/E3 muestran que en estos ratones la inervación orexinérgica en el puente se encuentra severamente disminuida (Figura 10F).

El análisis de distribución de intensidad de pixel muestra un 75% de disminución en el número de fibras orexinérgicas en el puente de los ratones KO-O/E3 ($D= 0.7164$; $P= < 0.00001$; $n= 5$ por grupo; 476 partículas en animales silvestre *versus* 160 partículas en animales KO-O/E3), así como una disminución en la intensidad de la señal fluorescente, la cual podría estar relacionada con un decremento en los niveles de expresión de orexina A en cada axón individual (Figura 10G).

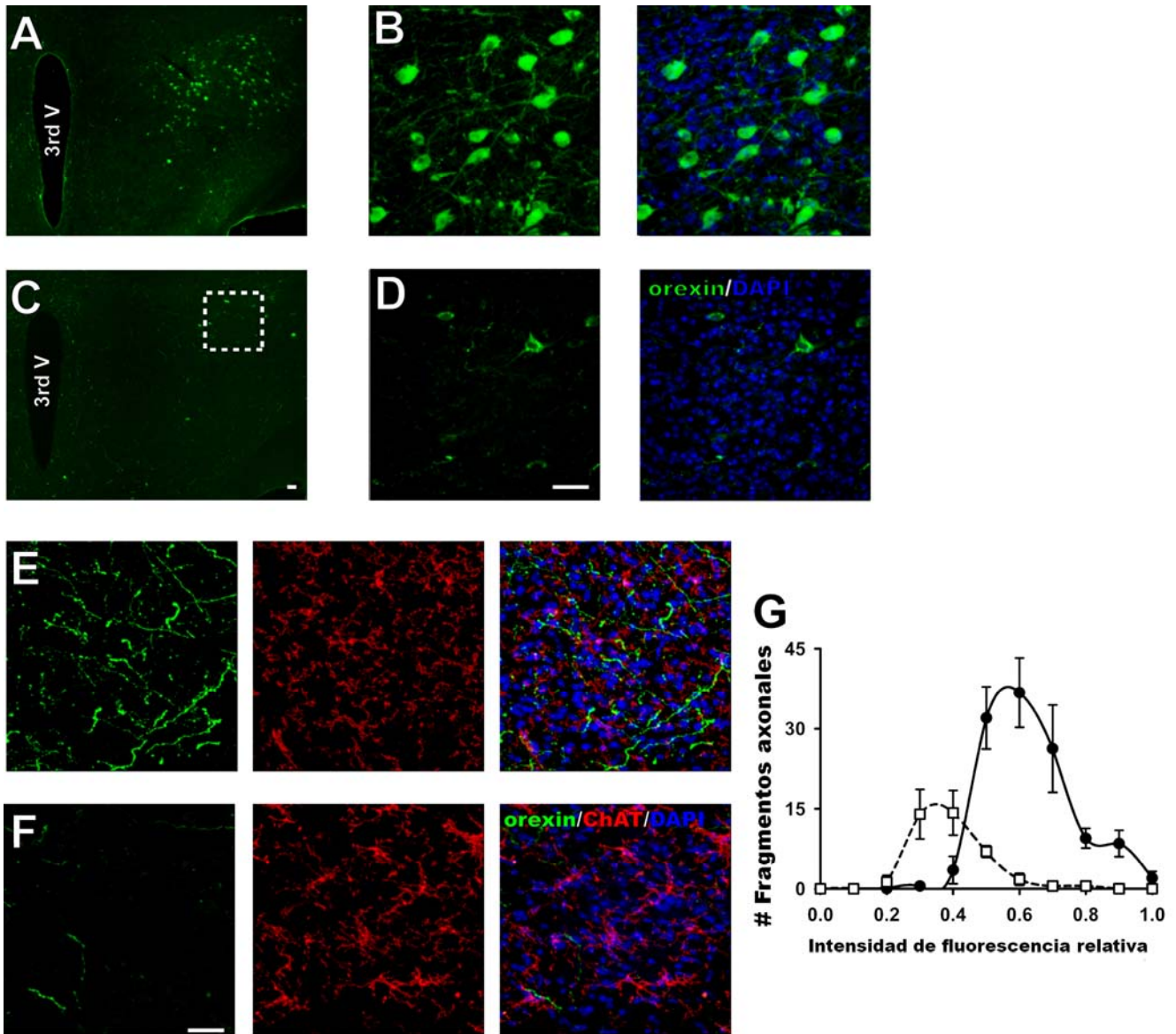


Figura 10. Disminución del número de neuronas orexinérgicas en el HL e invasión orexinérgica aberrante en el puente cerebral de ratones KO-O/E3

La inmunohistoquímica contra orexin A (señal verde) de secciones coronales muestra somas orexinérgicas en la región de HL de ratones silvestre (A, B). En contraste, en el HL de ratones KO-O/E3, los somas orexinérgicos se encuentran drásticamente reducidos (C, D). La invasión orexinérgica en puente se detecta fácilmente en los ratones silvestres (E). Sin embargo, la invasión orexinérgica pontina se encuentra disminuida en los ratones KO-O/E3 (F, barra representa 20µ).

La distribución del número de fragmentos axonales, así como la intensidad fluorescente de los axones que invierten el puente es mayor en los ratones silvestres en comparación con los KO-O/E3 (G).

La señal de ChAT (colín-acetil-transferasa) se aprecia en señal de color rojo. DAPI denota la marca nuclear (color azul) con 4', 6-diamidino-2-fenilindol.

LA ADMINISTRACION DE OREXINA A SINTETICA REVIERTE EL FENOTIPO NARCOLEPTICO EN EL RATON KO-O/E3

La narcolepsia es secundaria a alteraciones del circuito orexinérgico, ya sea a nivel del neuropéptido o de los receptores. Decidimos analizar si el fenotipo narcoléptico en los ratones KO-O/E3 estaba estrictamente relacionado con la pérdida de neuronas orexinérgicas, o si la sensibilidad a orexina también se encontraba alterada en estos animales.

Para analizar esto, evaluamos los efectos de la administración ICV de orexina A sintética en el CVS de animales silvestres y KO-O/E3 mediante el registro EEG/EMG. Seguimos un protocolo el cual ha demostrado eliminar los eventos DREM en los ratones narcolépticos orexina-ataxina-3 (Mieda *et al.*, 2004).

Cuando se administró una dosis de LCR artificial (control), los ratones KO-O/E3 muestran el mismo fenotipo narcoléptico que aquellos sin tratamiento (Vigilia, $P= .467$; nREM, $P= .634$; REM, $P= .960$) (Figura 11A and Tabla 4).

Cuando a los mismos animales se les administró una dosis de orexina A, los eventos DREM desaparecieron completamente en cada ratón durante todo el registro (Figura 11B y C). Adicionalmente, la orexina A incrementó significativamente la vigilia [$F(2, 12) = 258.30$, $P= < 0.001$], disminuyó sueño nREM [$F(2, 12) = 124.67$, $P= < 0.001$] y abolió sueño REM [$F(2, 12) = 28.72$, $P= < 0.001$] (Tabla 4), este patrón es consistente con el efecto robusto de la orexina A sobre la vigilia observado en ratones narcolépticos (Hagan *et al.*, 1999). Se observaron interacciones entre la condición de tratamiento (basal, LCR y orexina A) y fase de sueño [$F(4, 5) = 211.40$, $P= < 0.001$].

Asimismo, las comparaciones de las tres condiciones (basal, LCR y orexina A) con el test *post-hoc* de Tukey, muestran que la administración de orexina es significativamente diferente a la condición con LCR y el estado basal en cada una de las fases del CVS (wake, $P= < 0.001$; nREM, $P= < 0.001$; REM, $P= < 0.001$), tanto en el tiempo total como en la duración de cada episodio (Tabla 4).

Fase	Genotipo	BASAL		LCR		OREXINA - A	
		Tiempo total (min)	por hora (min)	Tiempo total (min)	por hora (min)	Tiempo total (min)	por hora (min)
Vigilia	O/E3 ^{+/+}	432.0 ± 22.3	36.0 ± 2.7	443.1 ± 23.9	36.9 ± 2.8	694.2 ± 0.3 ††	57.8 ± 2.7
	O/E3 ^{-/-}	300.0 ± 19.2 *	25.0 ± 1.4	258.2 ± 7.9 *	23.0 ± 1.4	673.9 ± 0.7 †	56.1 ± 2.8
nREM	O/E3 ^{+/+}	245.7 ± 22.3	20.47 ± 2.2	243.3 ± 24.2	20.2 ± 2.4	25.7 ± 0.3 †	2.1 ± 0.2
	O/E3 ^{-/-}	329.8 ± 18.4 **	28.83 ± 1.5	367.1 ± 8.6 **	30.5 ± 1.2	45.9 ± 0.7 †	3.8 ± 0.3
REM	O/E3 ^{+/+}	42.2 ± 2.0	3.5 ± 0.6	33.5 ± 2.3	2.7 ± 0.5	0.0 ± 0.0 †	0.0 ± 0.0
	O/E3 ^{-/-}	88.9 ± 2.5 *	6.1 ± 0.6	94.5 ± 2.1 *	6.3 ± 0.6	0.0 ± 0.0 †	0.0 ± 0.0
Latencia REM	O/E3 ^{+/+}	48.3 ± 0.7	-	48.8 ± 0.7	-	-	-
	O/E3 ^{-/-}	17.5 ± 0.5 *	-	16.6 ± 0.4 *	-	-	-

Tabla 4. Parámetros del CVS obtenidos del registro electrofisiológico

Los ratones KO-O/E3 (O/E3^{-/-}) pasan menos tiempo en vigilia, lo cual se refleja en mayor tiempo en las fases de sueño (nREM y REM) que los ratones silvestre (O/E3^{+/+}). La infusión ICV de orexina A revierte el fenotipo narcoléptico de los ratones KO-O/3.

* denota P<0.01 vs. Silvestre, ** denota P<0.05 vs. Silvestre.

† denota P<0.01 vs. CSF, †† denota P<0.05 vs. CSF.

IDENTIFICACION DE ELEMENTOS RESPONSIVOS A O/E3 EN EL GEN DE PREPRO-OREXINA

La pérdida de neuronas productoras de orexina en el HL consecuentemente lleva a una disminución de los niveles de ARNm de O/E3, confirmando que O/E3 se expresa en el HL (Honda *et al.*, 2009), donde pudiera regular la expresión del gen de prepro-orexina.

Mediante el empleo de un método de “alineamiento de secuencias”, decidimos determinar si el factor de transcripción O/E3 podría regular la expresión en el locus de prepro-orexina (prepro-hipocretina [Hcrt]). En la figura 11 se pueden observar los alineamientos de la región promotora putativa del gen de prepro-orexina de cuatro especies diferentes (<http://www.ensembl.org/>; Hubbard *et al.*, 2009): ratón (*mus musculus*), rata (*rattus norvegicus*), perro (*canis familiaris*) y humano (*homo sapiens sapiens*).

En esta región promotora, dos elementos reguladores (elementos orexina OE1 y OE2; sin relación con la familia de factores de transcripción O/E) se han descrito y parecen ser responsables de orquestar y restringir la expresión de prepro-orexina al HL.

Utilizando el programa de predicción para factores de transcripción TFSEARCH (Searching Transcription Factor Binding Sites", <http://molsun1.cbrc.aist.go.jp/research/db/TFSEARCH.html>; Heinemeyer *et al.*, 1998), pudimos identificar dos secuencias conservadas en las regiones promotoras del gen de orexina en estas cuatro especies, las cuales parecen corresponder a una secuencia responsiva a olf-1. Se ha demostrado que los sitios de unión olf-1 sirven como blanco a los miembros de la familia de factores de transcripción O/E (Wang *et al.*, 1993). Uno de estos sitios olf-1 en el gen de prepro-orexina se encuentra superpuesto al elemento OE1, lo que sugiere que O/E3 pudiera regular directamente la expresión del gen de prepro-orexina.

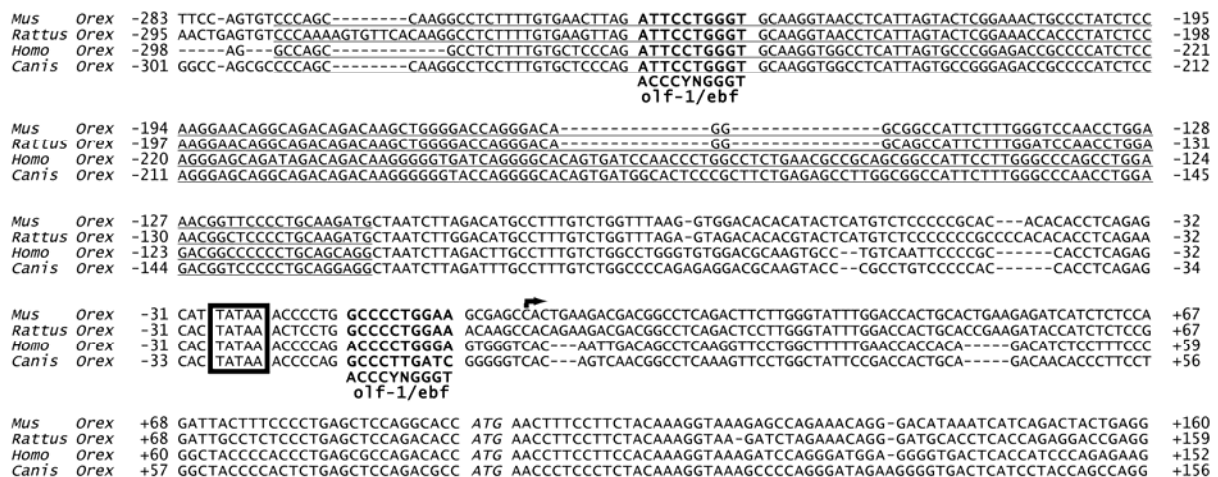


Figura 4. Presencia de elementos olf-1 (sitio de unión para O/E3) en la región promotora de los genes de prepro-orexina

El alineamiento “río arriba” (283-300 bp) de las secuencias del locus de prepro-orexina (prepro-hipocretina) locus de cuatro diferentes mamíferos muestra dos regiones altamente conservadas de olf-1 (olf-1/ebf). La secuencia consenso de olf-1, mostrada debajo de los alineamientos, se identificó como sitios de unión OE1, los cuales restringen la expresión de prepro-orexina en el HL.

El segundo elemento olf-1 se encuentra en la posición -7 del sitio putativo para el inicio de la transcripción (la flecha indica la dirección de la transcripción). Una “caja TATA” conservada se puede observar en la posición -24 de todos los genes. El sitio de inicio de transcripción (ATG) está en letra cursiva.

DISCUSION

En este estudio demostramos que los ratones KO-O/E3 presentan una pérdida dramática del número de neuronas orexinérgicas en el HL. La pérdida de células orexinérgicas deriva en un decremento de la inervación orexinérgica en el puente cerebral, un área involucrada en la regulación del CVS, resultando en un fenotipo narcoléptico, el cual puede ser revertido farmacológicamente tras la administración ICV de orexina A sintética.

Aunque se ha demostrado que el ratón KO-O/E3 presenta diversas alteraciones en diferentes sub-poblaciones neuronales, este es el primer reporte que correlaciona la pérdida del factor de transcripción O/E3 con el síndrome de narcolepsia/cataplejía, revelando la importancia funcional de O/E3 en el desarrollo de un circuito orexinérgico eficiente.

En este momento, no podemos determinar los mecanismos moleculares responsables de la pérdida de las neuronas orexinérgicas en el HL de los ratones KO-O/E3, esta pérdida pudiera estar relacionada con un decremento en la expresión del gen de prepro-orexina o simplemente debido a que las neuronas orexinérgicas perecen durante el desarrollo. Sin embargo, a continuación se discutirán los probables mecanismos por los cuales el factor de transcripción O/E3 pudiera regular varios aspectos de la población orexinérgica.

Regulación de la expresión de prepro-orexina en el HL

Un factor de transcripción (también llamados “factores de unión al ADN de secuencia específica”) son proteínas que se unen a secuencias específicas del ADN, las cuales controlan el flujo (transcripción) de información genética de ADN a ARNm (Latchman, 1997). Los factores de transcripción ejercen esta función ya sea promoviendo (como activador) o bloqueando (como represor) el reclutamiento de la ARN polimerasa (la enzima que realiza la transcripción de la información genética de ADN a ARN) a genes específicos (Lee & Young, 2000).

La característica cardinal de los factores de transcripción es que contienen uno o más dominios de unión al ADN [en inglés: DNA-binding domains (DBDs)], los cuales se unen a secuencias específicas de ADN adyacentes a los genes que regulan (Ptashne & Gann, 1997).

Los factores de transcripción interactúan con sus sitios de unión utilizando una combinación de fuerzas electroestáticas y de Van der Waals. La secuencia de ADN a la cual se une un factor de transcripción es llamada “sitio de unión del factor de transcripción” o “elemento responsivo” (Wang, 2005).

La presencia de secuencias olf-1 (elemento responsivo) en la región promotora del gen de prepro-orexina sugiere que O/E3 pudiera regular la expresión de dicho gen en este *locus*, tal y como ha sido demostrado para otros miembros de la familia de factores de transcripción O/E en otros *locus* (Wang & Reed, 1993; Wang *et al.*, 1993).

Aunque nuestro análisis inicial de la región promotora del gen de prepro-orexina identificó elementos responsivos a O/E3 en esta región, todavía se necesita demostrar experimentalmente si O/E3 juega un papel importante en la regulación de la expresión de prepro-orexina. Esto se pudiera determinarse mediante la técnica de inmuno-precipitación de cromatina con chip (ChIP-chip), la cual revela los sitios de unión de un factor de transcripción a una región específica de ADN *in vivo*.

Determinar las secuencias blanco de los factores de transcripción es esencial para entender como las células modifican su programación en respuesta a estímulos externos, lo cual pudiera ser el caso O/E3 y con las neuronas orexinérgicas.

Regulación de la sobrevivencia de la población orexinérgica durante el desarrollo

Durante el desarrollo, diversas poblaciones neuronales están programadas para expirar, mientras que otras se valen de factores anti-apoptóticos para sobrevivir. Una larga lista de factores de transcripción han sido reportados como promotores de la sobrevivencia neuronal durante el desarrollo (Huang & Reichardt, 2001).

Como respuesta a ciertas señales (estímulos), los factores de transcripción pueden encender/apagar la transcripción de ciertos genes, los cuales en cambio, permiten cambios en la morfología celular o los procesos necesarios para la determinación del linaje celular y la diferenciación celular. Actualmente, se ha reconocido a la familia de factores de transcripción O/E como factores elementales que regulan ciertos aspectos del desarrollo en el SNC, así

como reforzadores de la diversidad regional de poblaciones neuronales post-mitóticas. (Pawson, 1993).

Se ha descrito que el factor de transcripción O/E3 está involucrado en la formación de la corteza cerebelar; específicamente, regula la migración y la supervivencia de una sub-población neuronal específica de células de Purkinje durante el desarrollo embrionario y el desarrollo post-natal (Crocì *et al.*, 2006). Del mismo modo, también se ha reportado que O/E3 regula la migración y supervivencia de las neuronas GnRH hipotalámicas (Corradi *et al.*, 2003).

Así como O/E3 regula la supervivencia de estas dos sub-poblaciones neuronales y dado que O/E3 es altamente expresado en el SNC, es muy factible que O/E3 pudiera regular la supervivencia y/o diferenciación de la población orexinérgica durante la embriogénesis o durante el desarrollo post-natal.

No obstante, aún queda por caracterizar en su totalidad las sub-poblaciones neuronales que son reguladas por el factor de transcripción O/E3.

Desarrollo y dirección de las proyecciones orexinérgicas

Avances importantes en los últimos años han revelado la importancia de un gran número de factores de transcripción como reguladores maestros de los programas genéticos que controlan la arquitectura axonal y dendrítica, así como la formación de sinapsis. Es muy probable que estos factores de transcripción ejerzan su influencia mediante la regulación de la expresión de genes involucrados directamente en el control de la respuesta neuronal a factores de señalización y a neurotransmisores (Polleux *et al.*, 2007).

La falta de O/E3 ocasiona una severa reducción en el número de neuronas productoras de orexina en el HL y una inervación orexinérgica deficiente en el puente cerebral, lo que sugiere que O/E3 podría jugar un papel importante para el correcto desarrollo y/o diferenciación del circuito orexinérgico. Esta pérdida también sugiere que O/E3 pudiera ser esencial para la correcta extensión y/o navegación de los axones de las neuronas orexinérgicas desde el HL hacia el puente, como ya ha sido observado con los axones motores periféricos (Corradi *et al.*, 2003).

Sin embargo y verosímilmente, el establecimiento de un circuito orexinérgico funcional requiere de una respuesta selectiva a señales guía y sinaptogénicas en un lapso particular y áreas específicas. Aún falta por caracterizar todas las moléculas que podrían regular este proceso neuronal que especifica la respuesta axonal de la población orexinérgica y la interacción entre dichas moléculas.

Determinación de la distribución de OXRs

La disminución de la población orexinérgica en el HL de los ratones KO-O/E3 ocasiona alteraciones del sueño REM (episodios DREM), un sueño fragmentado y una disminución del tiempo en la fase de vigilia, resultando en un fenotipo narcoléptico, como ha sido propuesto por Lu (Lu *et al.*, 2006). Asimismo, esto indica que las neuronas orexinérgicas sobrevivientes dispersas en el HL del ratón KO-O/E3 que sobreviven son insuficientes para prevenir la aparición de transiciones anormales del estado de vigilia a sueño REM (Lu *et al.*, 2006).

Nosotros inferimos que la falta de inervación orexinérgica en el puente cerebral es la principal causa de estos rasgos narcolépticos, dado que el puente regula y coordina la transición entre un estado conductual y otro (vigilia/sueño) (Hagan *et al.*, 1999; Datta *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2006).

Con el fin de determinar si el déficit orexinérgico en el puente era la única causa de la instauración del fenotipo narcoléptico, o si la sensibilidad a orexina también se encontraba afectada, decidimos emular un trabajo previo el cual demostró que la administración directa de orexina A en el ventrículo lateral izquierdo revierte el fenotipo narcoléptico (Mieda *et al.*, 2004). De esta manera, este ensayo también nos sirvió para comparar nuestro modelo con otros modelos animales de narcolepsia. Interesantemente, la administración de orexina A sintética reveló que los ratones KO-O/E3 mantienen la sensibilidad al péptido orexina, lo que nos hace inferir que los receptores orexinérgicos se encuentran funcionales en estos animales mutantes.

Cabe resaltar que la administración de orexina A tuvo un efecto más profundo en los ratones KO-O/E3 que en aquellos ratones narcolépticos con degeneración de la población orexinérgica (orexina-ataxina-3), dado que los ratones KO-O/E3 pasan más tiempo en el

estado de vigilia tras la administración de orexina A sintética; esto sugiere que la distribución y/o la sensibilidad de los receptores de orexina se encuentra alterada en los ratones KO-O/E3, o que otras estructuras involucradas en la regulación del CVS también se encuentran alteradas.

El fenotipo narcoléptico del ratón KO-OE/3 difiere del fenotipo observado en el ratón knockout de prepro-orexina (Chemelli *et al.*, 1999) y en el ratón orexina-ataxina-3 (Hara *et al.*, 2001), dado que el ratón KO-O/E3 presentan menos vigilia y un incremento de sueño nREM y sueño REM.

Sin embargo, estas diferencias podrían deberse al historial genético en cual se mantienen las distintas mutaciones: mientras que los ratones con alteraciones del gen de orexina se establecieron en líneas roedoras C57BL/6 cruzadas, ya sea con DBA/1 (orexin-ataxina-3) o 129/SvEv (knockout prepro-orexina); el ratón KO-O/E3 se mantuvo dentro del estirpe 129S2/Sv.

Se ha demostrado que con tan solo una sustitución cromosómica se pueden alterar los parámetros del CVS (Yang *et al.*, 2009).

O/E3 como molécula blanco de un proceso autoinmune

Contrario a la idea de que las neuronas juegan un rol pasivo en la respuesta inflamatorio, muchos de sus productos desempeñan un papel importante en dicho proceso; tal es el caso para las proteínas membranales CD22, CD47, CD200, CX3CL, ICAM-5, NCAM, semaforinas y lectinas tipo C. Asimismo, las neuronas expresan niveles bajos de moléculas del complejo mayor de histo-compatibilidad (en inglés: major histocompatibility complex, MCH) las cuales promueven activamente la apoptosis mediada por células T (Tian *et al.*, 2009). Neuronas que han sufrido algún tipo de daño son menos proclives a mantener esta defensa y consecuentemente son susceptibles a más daños.

En resumen, una vez que el SNC ha sido sometido a un insulto, es susceptible a la exposición de antígenos y pierde su estatus inmuno-privilegiado.

La instauración de la narcolepsia está frecuentemente asociada con factores ambientales no específicos, tales como trauma craneal, tumores e infartos. Estudios recientes han asociado la narcolepsia con infecciones estreptocócicas, vacunas o infecciones, así como a la exposición a metales pesados e insecticidas (Mignot, 1998).

Como se mencionó anteriormente, esta enfermedad se encuentra asociada con el gen HLA-DQB1*0602, razón por la cual actualmente se sospecha que la narcolepsia es una enfermedad auto-inmune. Aunado a esto, diversas investigaciones han identificado distintas moléculas que co-localizan en las neuronas orexinérgicas, tales como Trib2, dinorfina, pentraxina e IGFBP3 (Honda *et al.*, 2009; Kornum *et al.*, 2011) y recientemente O/E3, los cuales pudieran ser blancos moleculares para un proceso auto-inmune en contra de la población orexinérgica.

En los humanos, más de 20 genes HLA polimórficos codifican múltiples subtipos del MHC, el cual presenta péptidos ajenos a las células T durante un proceso infeccioso, desencadenando una respuesta inmune. En el caso de la auto-inmunidad, los péptidos nativos se reconocen erróneamente como ajenos, provocando una destrucción tisular. Más de 60 enfermedades auto-inmunes afectan prácticamente todos los órganos del cuerpo humano, casi todos asociados a subtipos HLA. En el caso de la narcolepsia, células T auto-reactivas podrían reaccionar en contra de las células orexinérgicas tras haber escapado la selección negativa del timo (Kornum *et al.*, 2011).

El concepto de mimetismo molecular ha sido considerado como un posible mecanismo para la inducción de anti-anticuerpos (Rose, 1998).

En la narcolepsia, probablemente se generan anti-anticuerpos contra la población orexinérgica debido a un antígeno u organismo patológico que se asemeje estructuralmente a alguna molécula presente en las neuronas orexinérgicas. Cuando el sistema inmune induce un anticuerpo a reconocer el organismo patológico para atacarlo, existe una plétora de solapamiento, ocasionando que se reconozca a las células orexinérgicas como patógenas. Este probable reconocimiento erróneo resultaría en una pérdida funcional de auto-tolerancia y la subsecuente destrucción de la población orexinérgica por el sistema inmune.

Ya que O/E3 se expresa en las neuronas orexinérgicas y que se encuentra regulado a la baja en un modelo de narcolepsia con degeneración progresiva de la población orexinérgica (ratón orexina-ataxina-3), el factor de transcripción O/E3 es un candidato plausible como molécula blanco de un proceso auto-inmune.

CONCLUSION

Nuestros resultados revelan que el ratón KO-O/E3 es un diferente modelo de narcolepsia con alteraciones del circuito orexinérgico. Evidencia previa revela que distintas sub-poblaciones neuronales se encuentran alteradas en este ratón (Corradi *et al.*, 2003; Chung *et al.*, 2008); no obstante, este es el primer reporte que asocia el síndrome de narcolepsia/cataplejía con la pérdida del factor de transcripción O/E3, lo cual nos brinda un mejor entendimiento sobre cómo se forma, sobrevive y opera el circuito orexinérgico.

Igualmente, este trabajo le concede gran importancia a los factores de transcripción como reguladores del CVS. Sin embargo, es necesario realizar más experimentos con el fin de caracterizar las anomalías estructurales que ocasionan el CVS aberrante en los ratones KO-O/E3.



Neuroscience is an international journal under the editorial direction of the
International Brain Research Organisation (IBRO)



May 9, 2011

Dr. Drucker-Colín
Dr. Alberto K. De la Herrán-Arita
Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Fisiología Celular
Mexico

Dear Dr. Drucker-Colín and Dear Dr. Alberto K. De la Herrán-Arita:

This letter is to confirm that your submitted cover art was selected for the cover of *Neuroscience* 183.

We thank you for your contribution to our journal.

Best regards,

Don Prince
Journal Manager
Elsevier San Diego
525 B Street
San Diego, CA 92101
neuroscience@journal-office.com

NEUROSCIENCE

Volume 183, June 2, 2011
ISSN 0306-4522



IBRO
JOURNAL

ASPECTS OF THE NARCOLEPSY-CATAPLEXY SYNDROME IN O/E3-NULL MUTANT MICE

A. K. DE LA HERRÁN-ARITA,^a
V. C. ZOMOSA-SIGNORET,^b D. A. MILLÁN-ALDACO,^a
M. PALOMERO-RIVERO,^a M. GUERRA-CRESPO,^a
R. DRUCKER-COLÍN^{a*} AND R. VIDALTAMAYO^{a1}

^aDepartamento de Neuropatología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México Distrito Federal, Mexico

^bDepartamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, México

Abstract—Orexins (hypocretins) are peptide neurotransmitters produced by a small group of neurons located exclusively in the lateral hypothalamus (LH). Orexins modulate arousal, and as a result, have profound effects on feeding behavior and the sleep-wake cycle. Loss of orexin producing neurons leads to a narcoleptic phenotype, characterized by sudden transitions from vigilance to rapid eye movement (REM) sleep (direct transition to REM, DREM) observed in electroencephalogram (EEG) and electromyogram (EMG) recordings. In this study, we demonstrate that mice lacking the basic helix-loop-helix transcription factor O/E3 (also known as *ebf2*) have a decrease in orexin-producing cells in the LH, in addition to a severely impaired orexinergic innervation of the pons. These changes in the orexinergic circuit of O/E3-null animals induce a narcoleptic phenotype, similar to the one arising in orexin-deficient and orexin-ataxin-3 mice. Taken together, our results suggest that O/E3 plays a central role during the establishment of a functional orexinergic circuit by controlling the expression of essential hypothalamic neurotransmitter and the correct development of the nerve fibers arising from the hypothalamus. This is the first report regarding the narcolepsy-cataplexy syndrome in O/E3-null mice, which adds the importance of transcription factors in the regulation of neural subpopulations that control the sleep-wake cycle. © 2011 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: CNS development, hypothalamus, sleep, transcription factors.

Orexins (orexin-A and B) are neuropeptides derived from a common precursor protein called prepro-orexin, whose expression is restricted to a small population of neurons residing in the LH (Broberger et al., 1998; Nambu et al.,

1999; Moriguchi et al., 2002). Albeit being a small cell group, orexinergic projections extensively innervate the CNS, reaching the cortex, pons, spinal cord and hypothalamus, where orexins modulate arousal (Peyron et al., 1998; Sakurai et al., 1998; Lin et al., 1999; Marcus et al., 2001; Tsujino and Sakurai, 2009) via interaction with two G-protein coupled receptors, OXR1 and OXR2 (Sakurai et al., 1998; de Lecea et al., 1998; Date et al., 1999). Perturbations of the orexinergic system, either at the neurotransmitter or the receptor level, lead to disruptions in the arousal system, resulting in a narcoleptic phenotype (Chemelli et al., 1999; Lin et al., 1999; Nishino et al., 2000; Peyron et al., 2000; Thannickal et al., 2000; Hara et al., 2001; Willie et al., 2003; Beuckmann et al., 2004).

Narcolepsy is a sleep disorder characterized by excessive daytime sleepiness, cataplexy, sleep paralysis and hypnagogic hallucinations (Nishino et al., 2000; Thannickal, 2009). In addition, narcoleptic patients show decreased orexin levels in cerebrospinal fluid (CSF) and postmortem analysis revealed a loss of orexinergic neurons in the LH (Peyron et al., 2000; Nishino et al., 2000; Thannickal et al., 2000). In mice, null-mutations of the prepro-orexin gene result in a narcoleptic phenotype (Chemelli et al., 1999; Willie et al., 2003), moreover, this phenotype also arises in mice where a degeneration of orexinergic neurons is induced by targeted expression of a neurotoxin called ataxin-3, driven by the regulatory elements of the prepro-orexin gene (Hara et al., 2001; Beuckmann et al., 2004). In these orexin-ataxin-3 animals, several genes expressed in neurons residing in the LH show decreased levels of expression related to the loss of the orexinergic population (Honda et al., 2009); one of which is the transcription factor O/E3.

O/E3 belongs to the superfamily of basic helix-loop-helix transcription factors involved in the control of gene expression that determines cell fate and/or differentiation (Malgaretti et al., 1997; Garel et al., 1997; Wang et al., 1997; Garcia-Dominguez et al., 2003). O/E3 regulates neuronal differentiation in the hypothalamus, spinal cord, cerebellum, adipose and bone tissue (Bally-Cuif et al., 1998; Wang et al., 2004; Croci et al., 2006; Jimenez et al., 2007).

Furthermore, O/E3-null mice present several anatomical alterations, including defective migration of gonadotropin-releasing hormone-synthesizing neurons from the olfactory placode towards the hypothalamus (Corradi et al., 2003), reduced bone mass (Kieslinger et al., 2005) and selective Purkinje cell death in the cerebellum (Chung et al., 2008); consequently, these mice suffer from infertility, dwarfism and ataxic gait as a result of these alterations

¹ Present address: Center for Molecular Diagnostics and Personalized Medicine, Universidad de Monterrey, Avenue Morones Prieto 4500, 66238 San Pedro Garza García, Nuevo León, Mexico.

*Corresponding author. Tel: +52-55-5550-0064; fax: +52-55-5550-0064.

E-mail address: drucker@servidor.unam.mx (R. Drucker-Colín).

Abbreviations: ChAT, choline acetyltransferase; CSF, cerebrospinal fluid; DREM, direct transition to REM; EEG, electroencephalogram; EMG, electromyogram; LH, lateral hypothalamus; MCH, melanin concentrating hormone; nREM, non rapid eye movement; PBS, phosphate-buffered saline; PPTg, pedunculopontine nuclei; REM, rapid eye movement; Wt, wildtype.

(Corradi et al., 2003; Kieslinger et al., 2005; Chung et al., 2008).

Since O/E3 is a regulator of neuron development, is expressed in orexin-producing cells of the LH and is down-regulated in a model of narcolepsy with degeneration of the orexinergic population (Honda et al., 2009), we analyzed the sleep-wake cycle and the orexinergic circuitry in O/E3-null mice, to determine whether they express the narcoleptic phenotype, which has not been previously studied.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Generation of O/E3-null mutant mice

All animal procedures were carried out following protocols approved by our local IACUC, based on national (<http://www.se-nasica.gob.mx/?doc=743>) and international standards (http://www.cioms.ch/frame_1985_texts_of_guidelines.htm). O/E3-null mice were generated by homologous recombination in 129S2/SvPasCrl (XY) embryonic stem cells (developed by Mitra Cowan at the Transgenics Core facility of the Johns Hopkins University School of Medicine, from blastocysts of inbred 129S2/SVPas mice obtained from Charles River Laboratories mice) following basically the procedure described elsewhere (Wang et al., 2004). Shortly, we used the pRVKI vector, a pBC (Stratagene, La Jolla, CA, USA) derivative to generate the O/E3-targeting construct and replaced the first five exons of the O/E3 gene by the selectable marker Pgk-neo. A 3.2 kb Xho I-BamH I fragment of the O/E3 putative promoter region was cloned as a 5' homology arm between the herpes simplex virus tyrosine kinase and the Pgk-neo selectable markers of pRVKI. A 5.3 kb Spe I-Sal I fragment from the O/E3 gene downstream to the fifth exon was cloned as a 3' homology arm, downstream to the Pgk-neo selectable marker of pRVKI vector. The targeting construct was linearized with the I-Sce I homing endonuclease and electroporated into 129S2/SVPas ES cells and cells were selected for gancyclovir (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)/geneticin (InvitroGen, San Diego, CA, USA) resistance. Two (out of 50) resistant ES cell colonies tested positive by PCR and Southern hybridization and carried the correct targeted insertion and one of them (V35) was injected into C57BL/6Ncrl blastocyst for chimera generation.

Founder males were crossed to 129S2/SvPasCrl females to keep genetic background as homogenous as possible and mutant mice were reproduced as heterozygote randomly backcrossed to 129S2/SvPas animals at the animal facilities of IFC, UNAM.

To obtain O/E3-null homozygotes, randomly selected heterozygote dams and sires from different litters were crossed. Only male animals were employed for the experiments and control animals were wildtype (Wt) (129S2/SvPas) littermates obtained from the same heterozygote crosses. Mice were housed under controlled temperature and humidity conditions in microfiltration cages and were maintained on a 12 h light/dark cycle (lights out 19:00 h) at all times. They had access to food and water *ad libitum*.

EEG/EMG recordings

Twelve mice ($n=6$ per group; male, 12-week-old) were i.p. anesthetized with ketamine-xylazine (100 and 10 mg/kg, respectively) and standard sterile-surgical and stereotactic procedures were employed for implant placement. The cranium was exposed and three burr holes were drilled. EEG signals were recorded using two ipsilateral stainless steel screws (1.5 mm to the right of the sagittal suture; 1 mm anterior to bregma and 1 mm anterior to

lambda; PlasticsONE, Roanoke, VA, USA) and a third screw was used as a reference electrode. In addition, an indwelling stainless steel guide (PlasticsONE C315GS-2-SPC guide 56GA 38835) was placed into the left lateral ventricle (stereotaxic coordinates: 0.3 mm posterior to bregma, 0.9 mm lateral from midline, 2.4 mm depth from skull surface). EMG signals were acquired by a pair of multistranded teflon-coated stainless steel wires (A-M Systems, Carlsborg, WA, USA) inserted into the neck extensor muscles. All animals were allowed to recover for 10 days before performing any experiment. To allow full freedom of movement mice were housed individually, and the head-mounted connector was coupled to a 15 cm lightweight cable connected to a slip ring commutator, which was suspended from a counter-balanced arm mounted to a standard shoebox cage (19×30 cm²). Additionally, the cage was modified to provide side delivery of food and water that were available throughout the recording. After 2 days of cage habituation, each mouse was recorded for a consecutive 12 h period, beginning at 19:00 h. EEG/EMG signals were amplified using a Grass Model 78 polygraph (Grass Instruments, West Warwick, RI, USA) and filtered (EEG: 0.3–100 Hz, EMG: 30–300 Hz) before being digitized at a sampling rate of 128 Hz by means of a data acquisition device (National Instruments, Austin, TX, USA). Signals were then programmed for a 4× interpolation with effective rate of 512 Hz, displayed on a paperless polygraph system and archived for off-line sleep staging. The obtained data were analyzed using custom software (ICELUS, post-acquisition analysis build, University of Michigan). EEG/EMG records were scored into 12-s epochs of wake, non rapid eye movement (nREM) and rapid eye movement (REM) sleep according to the Radulovacki criteria (Radulovacki et al., 1984) and direct transition to REM (DREM) defined as a direct transition from wake to REM sleep.

Administration of orexin-A peptide

I.c.v. doses of synthetic orexin-A (3 nmol per mouse, Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Belmont, CA, USA; catalog n° 003-49) or artificial CSF (vehicle) were administered using a randomized crossover design ($n=6$ per group) (Mieda et al., 2004).

Just before the onset of the dark period, mice were gently restrained and given a dose of orexin-A delivered through a cannula (PlasticsONE C315IS-2SPC internal 33GA) inserted directly into the stainless steel guide using a gas-tight syringe (Hamilton Company, Reno, NV, USA). An injection volume of 1 μ l was delivered over a 30-s period to each mouse, with the cannula remaining in position for an additional 15-s period to ensure dispersal of the liquid. After the administration of orexin-A or CSF, each mouse was then recorded for a consecutive 12 h period, following the EEG/EMG recording protocol previously mentioned.

Immunohistochemistry

Immediately after the experimental phase took place, six O/E3-null mice and six Wt mice were sacrificed with a lethal dose of pentobarbital and transcardially perfused with 0.9% saline solution followed by 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; catalog n° P6148). The brains were removed and post-fixed overnight in 4% paraformaldehyde followed by incubation in 20% sucrose (in 0.1 M PBS) for 48 h. After this, 30 μ m brain coronal sections were cut and collected in serial order onto Fisher superfrost plus slides (Thermo Scientific, Portsmouth, NH, USA). Section slides were rinsed in PBS three times for 5 min, subsequently non-specific binding sites were blocked by means of 2.5% bovine albumin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; catalog n° A-7030) with 0.25% Triton X-100 in PBS for 1 h at room temperature. After blocking, sections were incubated with anti orexin-A (rabbit host, 1:1000 dilution; Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Belmont, CA; catalog n° H-003-30) and anti choline acetyl transferase (ChAT) (goat host, 1:1000

dilution; Millipore, Billerica, MA, USA; catalog n° AB144P). Sections were then rinsed in PBS three times for 5 min for a subsequent incubation in secondary antibodies. As secondary antibody against anti orexin-A, we employed AlexaFluor 555 donkey anti-rabbit IgG (1:500 dilution; Invitrogen, San Diego, CA, USA; catalog n° A31572) combined with secondary antibody AlexaFluor 680 donkey anti-goat IgG (1:500 dilution; Invitrogen, San Diego, CA, catalog n° A21084) against anti ChAT, diluted in 0.25% Triton X-100/PBS for 2 h at room temperature. Afterward, sections were rinsed in PBS three times for 5 min, applying DAPI (Invitrogen, San Diego, CA, USA; catalog n° D3571, 1:10,000 dilution) in the second rinse and finally mounted with Dako fluorescence mounting medium (Dako North America, Inc., ref S3023). Sections were imaged under an Olympus FV-1000 laser confocal scanning microscope equipped with a Plan apochromat 60× oil immersion objective (N.A. 1.4). Images were acquired with a 1.0 airy unit pinhole aperture and the mean fluorescence intensity of each pixel was averaged three times during acquisition. Micrographs are presented as flat mount projections of 3D scanning across the whole 30 μm crosssection of the slides.

Cell number and innervation quantitation

Orexin-immunoreactive neurons and axons were counted by semiautomatic detection using NIH ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). To fulfill the requirements of this stereologic based system, every third hypothalamic section (six sections total) from Wt and O/E3-null mice was processed for immunostaining against orexin-A. In order to avoid overestimation of cell body counts, orexin-positive cell bodies in the LH were defined as those objects with a round entity measuring more than 200 μm^2 , which co-localized with nuclear DAPI staining. All orexinergic somas, in both hemispheres, were counted in all sections. The cell number was estimated by the modified three-dimensional counting (<http://www.nervenet.org/papers/3DCounting.html>) method designed by Williams and Rakic (Williams and Rakic, 1988).

Innervation of the pontine area was evaluated using semiautomatic counts of linear orexin-positive particles measuring more than 9 pixels. Pixel intensity was normalized using DAPI signal from same day acquisitions of Wt and O/E3-null samples. The maximum intensity of the LUT (LookUp Table) was defined by the orexin signal obtained from the LH sections of Wt animals. Pixel intensity and particle number were used for evaluation. The same 3D counting box method was used to estimate the number of orexin-positive fibers in the pedunculo-pontine nucleus (PPTg) (Williams and Rakic, 1988). The PPTg (0.84 mm lateral, 4.5–5.0 mm posterior to bregma; 3.5–4.0 mm ventral to top of the skull, 0.25 mm rostral to the fourth ventricle), an area with profuse ChAT immunoreactivity, was used as anatomic reference to the pons.

Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm SEM; *n* refers to the number of cells or animals, as indicated. For statistical calculations, we used IBM Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 16.0. The Student's *t*-test was used for orexinergic cell number, cell density and cell area.

Significant differences in distributions of orexinergic-innervation particle size and intensity in Wt and O/E3-null animals were compared using the Kolmogorov-Smirnov test for cumulative frequencies.

The comparison of the effect of treatment condition (basal, CSF and orexin) on sleep stage (Wake, nREM, REM) in two independent groups (between factors; Wt and O/E3-null) were evaluated by RM ANOVA (repeated measures analysis of variance).

The analysis was performed for each sleep stage (Wake, nREM, REM) considering genotype (Wt and O/E3-null) as between factor and the time spent in each sleep stage under different treatment conditions (basal, CSF and orexin) as within factors, the analysis was done for total time and episode duration.

Afterward, ANOVA was performed to compare means on each dependent variable, followed by Tukey's post hoc test.

For all statistical comparisons, the alpha level was set at <0.01 .

RESULTS

Altered sleep-wake cycle in O/E3-null animals

Analysis of locomotor behavior of O/E3-null mice shows periods of obvious behavioral arrest, characterized by an abrupt cessation of purposeful motor activity associated with a sustained change in posture that was maintained throughout the episode, ending abruptly with complete resumption of purposeful motor activity (supplementary video 1), which suggested that these collapses in O/E3-null animals might be a DREM episode characteristic of a narcoleptic phenotype. To evaluate this hypothesis, we recorded EEG/EMG signals through chronically implanted electrodes in Wt and O/E3-null animals (*n*=5 per group). Hypnograms depicting phase transitions during the sleep-wake cycle were obtained from our EEG/EMG recordings.

Representative hypnograms from Wt (Fig. 1E) and O/E3-null (Fig. 1F) mice show that the sleep-wake cycle of O/E3-null animals is characterized by the appearance of DREM episodes (arrows in Fig. 1B, F) with a predominant theta frequency (Fig. 1D) and more fragmented nREM sleep episodes, distinctive of a narcoleptic phenotype (Scammell et al., 2009). We did not detect DREM episodes in Wt animals (Fig. 1G, left side) or in heterozygote O/E3 \pm animals which carry a single functional copy of the O/E3 gene (data not shown); in these animals REM sleep is always preceded by nREM sleep (Fig. 1A), with a predominant delta wave frequency (Fig. 1C).

As shown in Table 2, there are significant differences in time spent in sleep/wake states between Wt and O/E3-null animals, where mutant mice spend more time in nREM sleep ($F(1,8)=14.28$, $P\leq 0.001$), REM sleep ($F(1,8)=23.35$, $P\leq 0.001$) and much less time in wake ($F(1,8)=24.42$, $P\leq 0.001$). Interactions between genotype and sleep stage were observed ($F(2,7)=34.35$, $P\leq 0.001$).

O/E3-null mice also present a shorter REM latency compared to Wt mice ($P\leq 0.01$) (Fig. 1G, right side). There were no significant differences in the time spent in wake, nREM and REM sleep between Wt and heterozygote (O/E3 $^{+/-}$) mice (data not shown).

Number of orexinergic neurons is decreased in O/E3-null mice

Since narcolepsy is a disorder related to disruptions of the orexinergic system, we next analyzed the orexinergic nuclei in the LH of O/E3-null animals. Immunostaining of Wt mice using an anti-orexin-A antibody shows that orexin-producing somas are restricted to the hypothalamus (Fig. 2A, B). Orexin-A immunoreactivity was found predominantly within the posterior LH and perifornical area, some

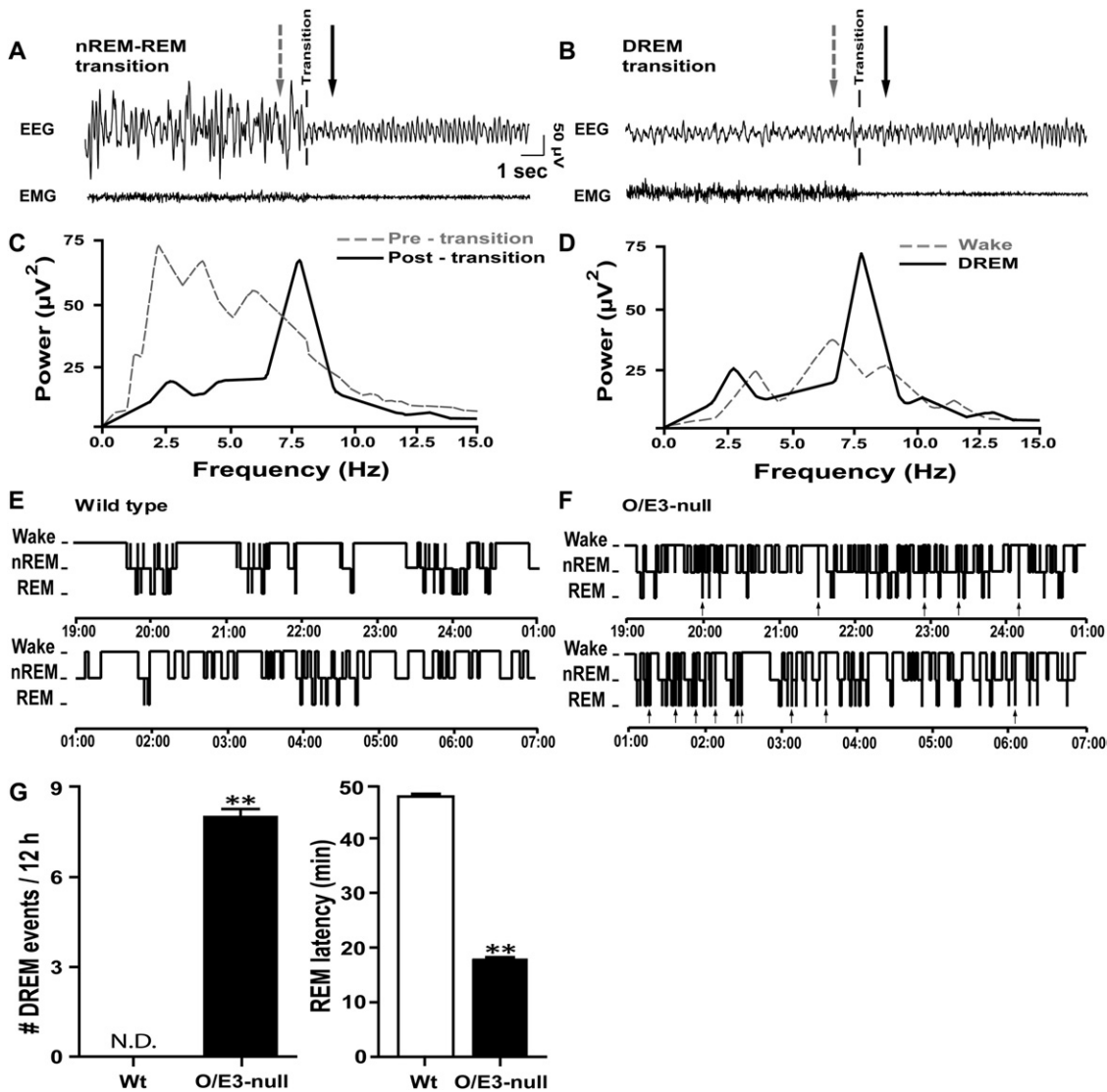


Fig. 1. Narcoleptic phenotype of O/E3-null mice. Representative EEG/EMG recordings of transitions to REM sleep obtained during the dark period from Wt mice (A) show REM sleep (black arrow in A, B), with a characteristic EEG power distribution peak at a frequency of 7–9 Hz (black line in C, D) and decreased EMG signals. REM sleep is preceded by nREM sleep (broken line arrow in A; broken line in B). Representative recordings and power distributions from O/E3-null animals (D) show REM intrusions (DREM, solid line in B), where REM sleep (solid line in D) is immediately preceded by an epoch of wake (broken line arrow in B; broken line in D). Representative hypnograms derived from the EEG/EMG recordings show multiple DREM episodes occurring in O/E3-null mice (black arrows in F), while none can be detected in Wt animals (E and left panel in G). Latency to REM sleep (measured from the start of the recording) is also drastically reduced in O/E3-null animals (right panel in G). Representative hypnogram demonstrates that O/E3-null mice spend 30% less time in the wake state than Wt animals, which is due to increases in the time spent in nREM (roughly 40% increase) and REM sleep states (two-fold increase). Power distributions were obtained from representative 12-s epochs of eight mice per group. ** $P < 0.01$ vs. Wt. N.D. (not detected).

scattered orexin cells were also found in the anterior LH and dorsomedial nucleus, as it has been previously described (Peyron et al., 1998; Nambu et al., 1999). In contrast, O/E3-null littermates exhibit a significant loss of orexin-immunoreactive neurons in the hypothalamic area; orexin-producing somas appear to be dispersed exclusively in the posterior LH and perifornical area (Fig. 2, inset in C, D).

Using a stereology-based cell counting approach, we quantified a total number of 1434 ± 99 orexinergic neurons in Wt animals. The number of orexin-positive cell bodies in

O/E3-null mice was dramatically decreased to 292 ± 28 cells (Student's *t*-test, $t(10) = 18.26$, $P \leq 0.01$).

The loss of orexinergic neurons in O/E3-null mice subsequently leads to a decrease in orexinergic cell density (Student's *t*-test, $t(116) = 9.40$, $P \leq 0.01$) and to a reduced size of the orexinergic area in the LH (Student's *t*-test, $t(10) = 18.38$, $P \leq 0.01$) (see Table 1).

Interestingly, the Melanin Concentrating Hormone (MCH) population was intact in O/E3-null mice (data not shown). Additionally, there were no significant differences in the orexinergic and MCH population between

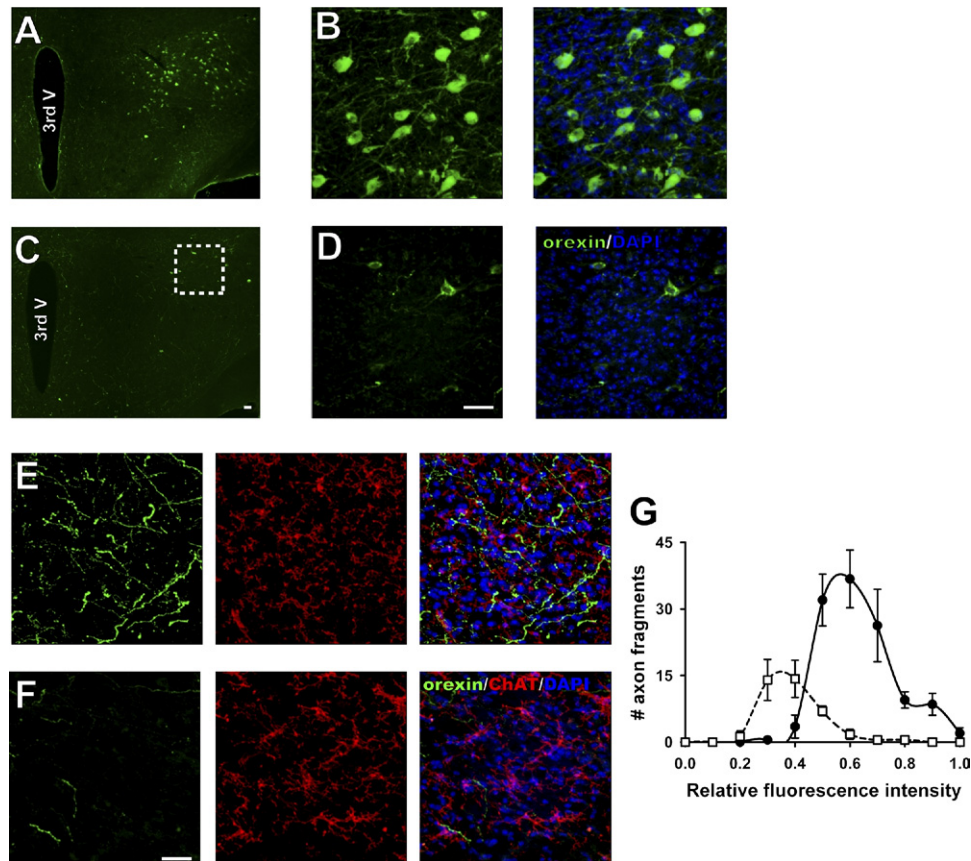


Fig. 2. Decreased number of orexin-producing cells in the LH and abnormal patterns of orexinergic innervation in the brain of *O/E3*-null mice. Orexin-A immunostaining of brain coronal sections show orexin-producing cell bodies in the lateral hypothalamic region of Wt animals (A, B, bregma -1.70 mm, 3rdV denotes the lumen of the third ventricle). In *O/E3*-null mice, orexin-A-positive cell bodies are drastically reduced in number and are restricted to a smaller region of the LH (inset in C, D) (Bar in C represents $50 \mu\text{m}$, bar in D represents $20 \mu\text{m}$). Orexinergic innervation of the pontine reticular formation can easily be detected in Wt animals (E). However, orexinergic innervation of the reticular formation is severely reduced in *O/E3*-null mice (F). Frequency distribution plots show that both the number and the fluorescence intensity of the orexinergic axons innervating the PPTg are higher in Wt than *O/E3*-null mice, mean \pm SEM (some error bars may not be apparent at this scale) (G). Black circles symbolize Wt and white squares represent *O/E3*-null mice.

Wt and *O/E3*-heterozygote (*O/E3*^{+/-}) mice (data not shown).

Loss of *O/E3* induces abnormal orexinergic projections

In Wt animals, we could easily identify orexin immunoreactive fibers throughout the brain (data not shown) as it has been previously described (Peyron et al., 1998;

Table 1. Decreases in orexinergic areas in the lateral hypothalamus of *O/E3*-null mice

Genotype	Total cell number (per mouse)	Orexinergic cell density (cells/mm ³)	Volume size of the orexinergic areas (mm ³)
<i>O/E3</i> ^{+/+}	1434.5 \pm 98.6	93.6 \pm 4.7	0.5 \pm 0.02
<i>O/E3</i> ^{-/-}	292.6 \pm 27.7*	43.9 \pm 3.2*	0.2 \pm 0.01*

The total number of orexinergic neurons in the LH of *O/E3*-null (*O/E3*^{-/-}) mice is decreased by 80%, with respect to Wt (*O/E3*^{+/+}) littermates. This decrease is due to both reductions in cell density and size of the orexinergic areas in the mutant animals. * $P < 0.01$ vs. Wt.

Nambu et al., 1999), however, our orexin fiber analysis was emphasized in the pontine area, to determine if the decrease in orexin-producing neurons observed in *O/E3*-null mice leads to a lowered orexinergic innervation of the pons, an area involved in the regulation of the sleep-wake cycle.

Using the PPTg as anatomical reference (Fig. 2E), which can be easily identified by anatomic cues and immunoreactivity to ChAT (Wang and Morales, 2009), we detected rich orexinergic innervation of the pons in Wt mice. In contrast, images acquired from the PPTg of *O/E3*-null mice showed that orexinergic innervation of the pons was severely decreased (Fig. 2F).

Pixel intensity distribution analysis shows a 75% decrease in the number of orexinergic fibers innervating the pons in *O/E3*-null mice ($D = 0.7164$; $P \leq 0.00001$; $n = 5$ per group; 476 total axon particles in Wt versus 160 total axon particles in *O/E3*-null animals), as well as a decrease in the intensity of the fluorescent signal, which could be due to decreased levels of expression of orexin-A within individual axons (Fig. 2G).

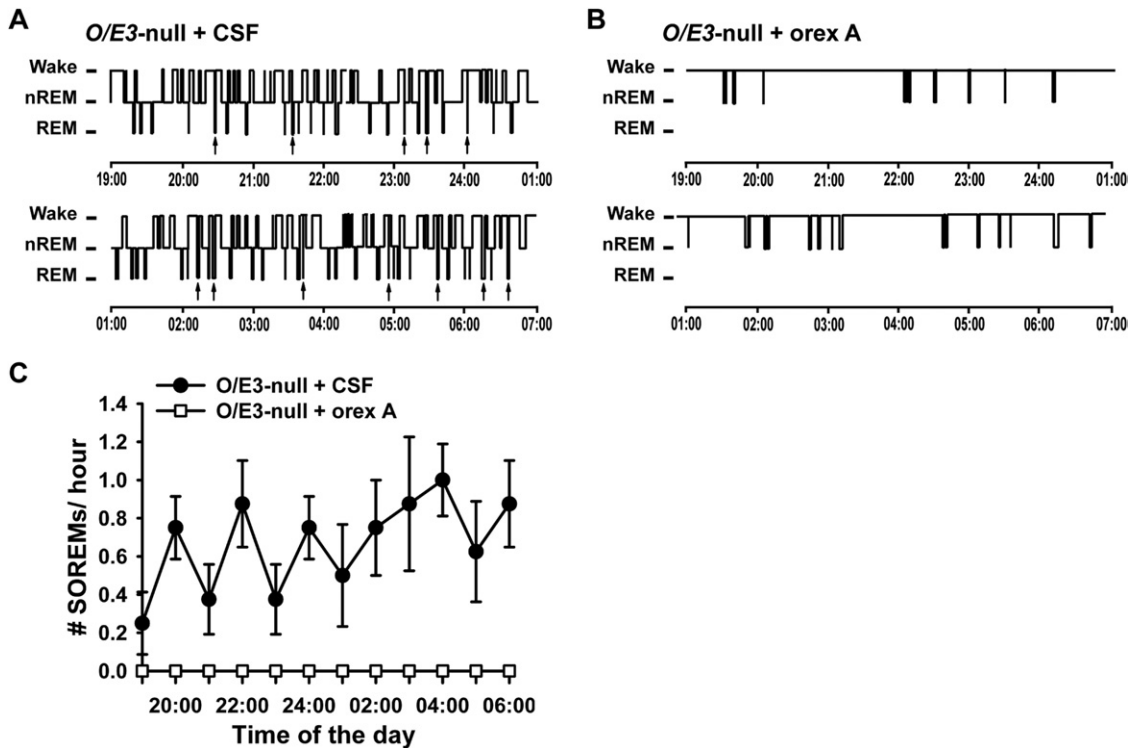


Fig. 3. I.c.v. infusion of orexin A abolishes REM sleep in O/E3-null animals. O/E3-null mice injected with artificial CSF show multiple DREMs (black arrows in A; solid circles in C), that disappear after orexin-A i.c.v. injections (B; squares in C). A strong arousing effect of orexin-A is demonstrated by abolition of REM sleep with the consequent obliteration of DREM episodes (C).

In addition, a similar decrease in orexinergic innervation was observed in other brain structures of O/E3-null mice, areas that would be highly innervated in wildtype mice (data not shown). The implications of the decrease in these other brain areas should be subject of further analysis.

Orexin-A peptide administration in O/E3-null mice reverts the narcoleptic phenotype

Narcolepsy is caused by disruptions of either orexins or their receptors. We decided to analyze if the narcoleptic phenotype of O/E3-null mice was strictly related to the loss of orexinergic cells in the LH or whether the sensitivity to orexin was also compromised in these mutant animals. In order to do this, we assessed the effects of i.c.v. injections

of orexin-A synthetic peptide on the sleep-wake cycle of Wt and O/E3-null animals by means of EEG/EMG recordings. We followed a previously tested protocol for i.c.v. injections, which has been shown to abolish DREM episodes in the narcoleptic orexin-ataxin-3 mouse (Mieda et al., 2004).

O/E3-null mice injected with CSF alone, exhibit the same narcoleptic phenotype as untreated mutant animals (Wake, $P=0.467$; nREM, $P=0.634$; REM, $P=0.960$) (Fig. 3A, Table 2). When the same O/E3-null mice were administered with orexin-A, DREM episodes were abolished in each mouse during the entire dark period (Fig. 3B, C). Additionally, orexin-A strikingly increased wakefulness [$F(2,12)=258.30$, $P\leq 0.001$], diminished nREM sleep [$F(2,12)=124.67$, $P\leq 0.001$] and suppressed REM sleep [$F(2,12)=28.72$, $P\leq$

Table 2. Vigilance state parameters recorded from Wt and O/E3-null mice

Stage	Genotype	Baseline		CSF		Orexin	
		Total time (min)	Episode duration (s)	Total time (min)	Episode duration (s)	Total time (min)	Episode duration (s)
Wake	O/E3 ^{+/+}	432.0±22.3	473.75±5.3	443.1±23.9	483.33±4.1	694.2±0.3*	1261.0±27.0*
	O/E3 ^{-/-}	300.0±19.2**	249.50±4.7***	276.2±7.9**	249.00±3.4***	674.0±0.7*	1218.0±29.1*
nREM	O/E3 ^{+/+}	245.7±22.3	186.63±3.4	243.3±24.2	182.17±2.5	25.7±0.3*	83.50±3.3*
	O/E3 ^{-/-}	346.0±18.4**	282.25±5.3***	367.1±8.6**	286.33±5.4***	45.9±0.7*	88.33±4.0*
REM	O/E3 ^{+/+}	42.2±2.0	68.50±1.9	33.5±2.3	69.67±2.0	0.0±0.0*	0.0±0.0*
	O/E3 ^{-/-}	73.4±2.5**	83.50±1.7***	76.5±2.1**	84.00±1.0***	0.0±0.0*	0.0±0.0*

O/E3-null (O/E3^{-/-}) mice spend less time in active wake and more time in sleep (REM and nREM) states than their Wt (O/E3^{+/+}) littermates. I.c.v. orexin infusion in O/E3-null mice induces a pattern which resembles the pattern in Wt mice. * $P<0.001$ vs. CSF, ** $P<0.001$ vs. Wt, *** $P<0.05$ vs. Wt.

0.001] in O/E3-null mice (Table 2), this observed pattern is consistent with the robust arousing effect of orexin-A in narcoleptic mice (Hagan et al., 1999). Interactions between treatment condition (basal, CSF, orexin) and sleep stage were observed [$F(4,5)=211.40$, $P\leq 0.001$].

In addition, Tukey post-hoc comparisons of the three treatment conditions (basal, CSF, orexin) indicate that orexin infusion was significantly different from CSF infusion and basal state in the time spent in each sleep state (wake, $P\leq 0.001$; nREM, $P\leq 0.001$; REM, $P\leq 0.001$), both in total time and episode duration (Table 2).

Identification of responsive elements to O/E3 in the prepro-orexin gene

Loss of orexin-producing neurons in the LH leads to decreased levels of O/E3 mRNA, confirming that O/E3 is expressed in the LH (Honda et al., 2009), where it might regulate prepro-orexin gene expression.

By using a sequence alignment approach, we decided to determine if O/E3 could regulate expression at the prepro-orexin (prepro-hypocretin [Hcrt]) locus. Fig 4 shows alignments of the putative promoter region of the prepro-orexin genes from four separate species (<http://www.ensembl.org/>; Hubbard et al., 2009): mice (*Mus musculus*), rats (*Rattus norvegicus*), dogs (*Canis familiaris*) and humans (*Homo sapiens sapiens*). In this promoter region, two regulatory elements (orexin elements OE1 and OE2; not related to O/E transcription factor family) have been described and appear to be responsible for driving and restricting prepro-orexin expression to the LH.

Using the transcription factor database prediction software TFSEARCH (Searching Transcription Factor Binding Sites, <http://molsun1.cbrca.aist.go.jp/research/db/TFSEARCH.html>; Heinemeyer et al., 1998), we were able to identify two

conserved sequences within the promoter regions of the prepro-orexin genes of these four species, which appear to correspond to putative olf1-responsive sequences. Olf-1 binding sites have been demonstrated to serve as targets for members of the O/E transcription factor family (Wang et al., 1993). One of the olf-1 sites in the prepro-orexin gene is superposed to the OE1 element, which suggests that O/E3 could directly regulate prepro-orexin gene expression.

DISCUSSION

In this study we demonstrate that O/E3-null mutant mice show a remarkable decrease in the number of orexinergic neurons in the LH. The loss of orexin cells derives in a decrease of orexinergic innervation of the pons, an area involved in the regulation of the sleep-wake cycle, hence resulting in a narcoleptic phenotype that can be pharmacologically reverted by i.c.v. administration of orexin-A. Although it has been shown that O/E3-null mice have many alterations in different neuronal subpopulations, this is the first report that correlates the loss of transcription factor O/E3 with the narcolepsy-cataplexy syndrome, revealing the functional importance of O/E3 in the development of an efficient orexinergic system.

Loss of O/E3 leads to a severe reduction in the number of orexin-producing cells in the LH and an impaired orexinergic innervation in the pons, suggesting that O/E3 could play a major role for the correct development and/or differentiation of the orexinergic circuit. This loss also suggests that O/E3 activity might be required for the correct extension and/or navigation of axons from the orexinergic neurons, as it has been observed with peripheral motor axons (Crocì et al., 2006); although this reduction in orexinergic innervation could also be due to a mere reduction of

<i>Mus</i>	<i>Orex</i>	-283	TTCC-AGTGTCCAGC-----CAAGGCTCTTTTGTGAAGTTAG	ATTCTGGGT	GCAAGGTAACCTCATTAGTACTCGGAACTGCCATATCTCC	-195
<i>Rattus</i>	<i>Orex</i>	-295	AAGTGAAGTGTCCCAAAGTGTTCACAAGGCTCTTTGTGAAGTTAG	ATTCTGGGT	GCAAGGTAACCTCATTAGTACTCGGAACTGCCATATCTCC	-198
<i>Homo</i>	<i>Orex</i>	-298	-----AG---GCCAGC-----GCCTCTTTTGTGCTCCAG	ATTCTGGGT	GCAAGGTTGGCTCATTAGTGCCTGGAGACCGCCCATCTCC	-221
<i>Canis</i>	<i>Orex</i>	-301	GGCC-AGCGCCAGC-----CAAGGCTCTTTTGTGCTCCAG	ATTCTGGGT	GCAAGGTTGGCTCATTAGTGCCTGGAGACCGCCCATCTCC	-212
				ACCCYNGGGT		
				olf-1/ebf		
<i>Mus</i>	<i>Orex</i>	-194	AAGGAACAGGCAGACAGACAAGCTGGGGACAGGGACA-----GG-----GCGGCCATTCTTTGGGTCCAACCTGGA			-128
<i>Rattus</i>	<i>Orex</i>	-197	AAGGAACAGGCAGACAGACAAGCTGGGGACAGGGACA-----GG-----GCGGCCATTCTTTGGGTCCAACCTGGA			-131
<i>Homo</i>	<i>Orex</i>	-220	AGGGAGCAGATAGACAGACAAGGGGGTGTATCAGGGGACAGATGATCAACCTGGCTCTGAACCGCCAGCGGCCATTCTTTGGGCCAGCCTGGA			-124
<i>Canis</i>	<i>Orex</i>	-211	AGGGAGCAGGCAGACAGACAAGGGGGGTACCAGGGGACAGATGATGGCACTCCCGCTTCTGAGAGCCTTGGCGGCCATTCTTTGGGCCAACCTGGA			-145
<i>Mus</i>	<i>Orex</i>	-127	AACGGTCCCTGCAAGATGCTAATCTTAGACATGCCTTTGTCTGGTTAAG-GTGACACACATACTCATGTCTCCCCGCAC---ACACACCTCAGAG			-32
<i>Rattus</i>	<i>Orex</i>	-130	AACGGTCCCTGCAAGATGCTAATCTTAGACATGCCTTTGTCTGGTTAAG-GTAGACACACGTACTCATGTCTCCCCCGCCACACACTCAGAA			-32
<i>Homo</i>	<i>Orex</i>	-123	GACGGCCCTGCAGCAGGCTAATCTTAGACTTGCCTTTGTCTGGCTGGTGTGGACGCAAGTGCC--TGTAATCCCCC---CACCTCAGAG			-32
<i>Canis</i>	<i>Orex</i>	-144	GACGGTCCCTGCAGGAGGCTAATCTTAGATTGCTTTGTCTGGCCAGAGAGGACGCAAGTACC--CGCTGTCCCCAC-----CACCTCAGAG			-34
<i>Mus</i>	<i>Orex</i>	-31	CAT TATAA ACCCTCTG GCCCTGGAA GCGAGCCTGAAGACGACGGCCTCAGACTTCTTGGGTATTTGGACCCTGCACTGAAGAGATCATCTCTCCA			+67
<i>Rattus</i>	<i>Orex</i>	-31	CAC TATAA ACTCTCTG GCCCTGGAA ACAAGCCACAGAAGACGACGGCCTCAGACTCTTGGGTATTTGGACCCTGCACTGAAGAGATCATCTCTCCG			+67
<i>Homo</i>	<i>Orex</i>	-31	CAC TATAA ACCCCAG ACCCCTGGGA GTGGGTCAAC---AATTGACAGCCTCAAGGTTCTGGCTTTTGAACCAACACA----GACATCTCTTTTCCC			+59
<i>Canis</i>	<i>Orex</i>	-33	CAC TATAA ACCCCAG GCCCTGTATC GGGGGTCAAC---AGTCAACGGCCTCAAAGTCTCTGGCTATTTCCGACCCTGCA----GACAACACCTTCTCT			+56
				ACCCYNGGGT		
				olf-1/ebf		
<i>Mus</i>	<i>Orex</i>	+68	GATTACTTCCCTGAGCTCCAGGCACC	<i>ATG</i> AACTTTCCTTCTACAAAGGTAAGAGCCAGAAACAGG-GACATAAATCATCAGACTACTGAGG		+160
<i>Rattus</i>	<i>Orex</i>	+68	GATTGCCTCTCCCTGAGCTCCAGACACC	<i>ATG</i> AACCTTCTTCTACAAAGGTAAGAGCCAGAAACAGG-GATGCACCTCACCAGAGGACCGAGG		+159
<i>Homo</i>	<i>Orex</i>	+60	GGCTACCCACCTGAGCGCCAGACACC	<i>ATG</i> AACCTTCTTCTACAAAGGTAAGAGCCAGAAACAGG-GGGGTGACTCACCATCCAGAGAAAG		+152
<i>Canis</i>	<i>Orex</i>	+57	GGCTACCCACTCTGAGCTCCAGACGCC	<i>ATG</i> AACCTTCTTCTACAAAGGTAAGAGCCAGGATAGAAGGGGTGACTCATCTACCAGCCAGG		+156

Fig. 4. Presence of olf-1 (O/E3 binding site) like elements in the promoter region of prepro-orexin genes. Alignment of the upstream (283–300 bp) sequences of the prepro-orexin (prepro-hypocretin) locus (Hcrt) from four separate mammals shows two highly conserved olf-1-like (olf-1/ebf, bold face) elements. The consensus olf-1 sequence, depicted under the alignments, was identified as an OE1 binding site in genes expressed in the olfactory epithelium. One of these olf-1-like elements overlaps with one of the regions (OE1, underlined) that appear to restrict prepro-orexin expression in the lateral hypothalamus. The second olf-1-like element lies at position -7 from the putative transcription start site (arrow indicating direction of transcription). A conserved TATA box can also be identified at position -24 in all these genes. Translation start site (ATG) is indicated in italics.

the orexinergic nuclei, since the decrease in innervation is observed in the whole brain.

Taken together, these results imply that O/E3 could specifically regulate the orexinergic-neuron population within the LH, since MCH neurons, which are co-distributed with orexin neurons, appeared to be intact in O/E3-null mice.

At this moment, we cannot define the molecular mechanisms responsible for the loss of orexinergic neurons in the LH of O/E3-null animals, this loss could be related to a decrease in prepro-orexin gene expression or a failure of the orexinergic neurons to appear during development.

Presence of olf-1 like sequences in the promoter region of the prepro-orexin gene suggests that O/E3 could regulate expression of this locus, as it has been demonstrated for members of the O/E transcription factor family at other loci (Wang and Reed, 1993; Wang et al., 1993). Although our initial analysis of the prepro-orexin gene promoter region identified putative O/E3-responsive elements in this region, it remains to be experimentally demonstrated whether O/E3 indeed plays a major role in the regulation of prepro-orexin expression.

The alterations of the orexinergic circuit in O/E3-null mice causes REM sleep alterations (such as DREMs) and decreases in the time spent in the wake state, resulting in a narcoleptic phenotype as proposed by Lu (Lu et al., 2006). Furthermore, the variations of the system indicate that the remaining orexinergic neurons dispersed in the LH, specifically the ones residing in the perifornical area, are insufficient to prevent abnormal transitions from wake to REM sleep (Lu et al., 2007).

We believe the lack of orexinergic innervation of the pons might be the principal cause of the narcoleptic traits, given the fact that the pons regulates the sleep-wake cycle (Hagan et al., 1999; Datta et al., 2001; Lu et al., 2006). In order to determine if the orexinergic deficit in the pons was the sole cause of the narcoleptic phenotype, or whether the sensitivity to the orexin peptide was also compromised, we emulated a previous work where orexin-A is directly administered in the left lateral ventricle (Mieda et al., 2004). Additionally, this also serve to adequately compare both narcolepsy models. Interestingly, synthetic orexin-A administration reveals that O/E3-null mice sensitivity to orexin peptide remains intact in these mutant mice, which led us to infer that orexin receptors are functional in the narcoleptic animals, as they present a pattern which resembles the pattern in Wt mice after orexin-peptide administration. Noteworthy, orexin-A administration has a stronger effect in O/E3-null mice than orexin neuron-ablated (orexin-ataxin-3) animals, since O/E3-null mutants spend more time in wakefulness than orexin-ataxin-3 mice when administered with the synthetic orexin peptide, suggesting that the orexin receptor distribution and/or sensitivity might be altered in O/E3-null mice, or that other structures involved in the regulation of the sleep-wake cycle are distorted in these mutants.

The narcoleptic phenotype of our O/E3-null mice differs from orexin-null (Chemelli et al., 1999) and orexin-ataxin-3 transgenic mice (Hara et al., 2001), since O/E3-

null mice have less wakefulness, more nREM sleep and an increase in REM sleep during the dark period. These differences could be partially due to the genetic background in which the distinct mutations are maintained: while the orexin-modified mouse lines are C57BL/6 hybrids, crossed to either DBA/1 (orexin-ataxin) or 129/SvEv (orexin knockout) strains, our O/E3-null mice are kept within a 129S2/Sv background. It has been demonstrated that even a single chromosome substitution within a given background can alter the sleep-wake cycle parameters of mouse strains (Yang et al., 2009).

In addition, there is evidence of anorexia in O/E3-null mice, null homozygotes are smaller compared with their Wt and heterozygote littermates. Also, homozygotes weigh less than half the bodyweight of their littermates by postnatal day 30 (Corradi et al., 2003). At the moment we are not able to discern if this anorexic disorder is due to a growth deficiency and newborns are impaired to eat or if it is related to the loss of the orexinergic neurons and/or alterations of other neuronal subpopulations. Conducting new experiments should clarify the mechanisms of this alteration.

CONCLUSION

Our findings reveal that O/E3-null mouse is a different model of narcolepsy where the orexinergic circuitry is distorted. Evidence proves that many neuronal subpopulations are altered in O/E3-null mice (Corradi et al., 2003; Chung et al., 2008), however, this is the first association of the Narcolepsy-Cataplexy syndrome and the absence of O/E3 transcription factor, this opens new options for the understanding of how complex neuronal circuits are formed, survive and operate. Moreover, it adds consideration to the importance of transcription factors in the regulation of the sleep-wake cycle. Nevertheless, further experiments need to be done in order to characterize the structural abnormalities that cause this aberrant sleep-wake cycle.

Acknowledgments—This work was supported by CONACyT grant 56295 to R. Vidaltamayo and UNAM-DGAPA-PAPIIT grants IN208311 to R. Vidaltamayo and IN225209 to R. Drucker-Colin. We would like to thank Dr. Óscar Prospero-García for his assistance with the EEG/EMG recordings, Dr. Raúl Aguilar-Roblero for his guidance in the statistical analysis, Gabriel Orozco-Hoyuela for his support with the confocal microscopy image acquisition and Teresa Torres-Peralta, María Valverde, Francisco Pérez-Eugenio and Eduardo Blanco-Hernández for their technical assistance. Mitra Cowan, now at McGill University, kindly provided the 129S2/SvPasCrl ES cell line used to generate the O/E3-LNL allele. R. Vidaltamayo generated the O/E3-null mice while working under contract to Howard Hughes Medical Institute at Randall R. Reed's laboratory at Johns Hopkins University School of Medicine, who kindly provided the homology arms used to target the insertion of the null allele at the O/E3 locus and the founder animals to expand the colony at IFC, UNAM. We would also like to thank the Doctorado en Ciencias Biomédicas of the Universidad Nacional Autónoma de México and the DGIP of the Universidad Autónoma de Sinaloa for their support.

REFERENCES

- Bally-Cuif L, Dubois L, Vincent A (1998) Molecular cloning of *Zco2*, the zebrafish homolog of *Xenopus Xcoe2* and mouse *EBF-2*, and its expression during primary neurogenesis. *Mech Dev* 77:85–90.
- Beuckmann CT, Sinton CM, Williams SC, Richardson JA, Hammer RE, Sakurai T, Yanagisawa M (2004) Expression of a poly-glutamine-ataxin-3 transgene in orexin neurons induces narcolepsy-cataplexy in the rat. *J Neurosci* 24:4469–4477.
- Broberger C, De Lecea L, Sutcliffe JG, Hökfelt T (1998) Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *J Comp Neurol* 402:460–474.
- Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xiong Y, Kisanuki Y, Fitch TE, Nakazato M, Hammer RE, Saper CB, Yanagisawa M (1999) Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 98:437–451.
- Chung SH, Marzban H, Croci L, Consalez GG, Hawkes R (2008) Purkinje cell subtype specification in the cerebellar cortex: early B-cell factor 2 acts to repress the zebrin II-positive Purkinje cell phenotype. *Neuroscience* 153:721–732.
- Corradi A, Croci L, Broccoli V, Zecchini S, Previtali S, Wurst W, Amadio S, Maggi R, Quattrini A, Consalez GG (2003) Hypogonadotropic hypogonadism and peripheral neuropathy in *Ebf2*-null mice. *Development* 130:401–410.
- Croci L, Chung SH, Masserdotti G, Gianola S, Bizzoca A, Gennarini G, Corradi A, Rossi F, Hawkes R, Consalez GG (2006) A key role for the HLH transcription factor *EBF2*, *COE2*, *O/E-3* in Purkinje neuron migration and cerebellar cortical topography. *Development* 133:2719–2729.
- Date Y, Ueta Y, Yamashita H, Yamaguchi H, Matsukura S, Kangawa K, Sakurai T, Yanagisawa M, Nakazato M (1999) Orexins, orexinergic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:748–753.
- Datta S, Patterson EH, Spoley EE (2001) Excitation of the pedunculo-pontine tegmental NMDA receptors induces wakefulness and cortical activation in the rat. *J Neurosci Res* 66:109–116.
- de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS 2nd, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG (1998) The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:322–327.
- García-Domínguez M, Poquet C, Garel S, Charnay P (2003) *Ebf* gene function is required for coupling neuronal differentiation and cell cycle exit. *Development* 130:6013–6025.
- Garel S, Marin F, Mattei MG, Vesque C, Vincent A, Charnay P (1997) Family of *Ebf/Olf-1*-related genes potentially involved in neuronal differentiation and regional specification in the central nervous system. *Dev Dyn* 210:191–205.
- Hagan JJ, Leslie RA, Patel S, Evans ML, Wattam TA, Holmes S, Benham CD, Taylor SG, Routledge C, Hemmati P, Munton RP, Ashmeade TE, Shah AS, Hatcher JP, Hatcher PD, Jones DN, Smith MI, Piper DC, Hunter AJ, Porter RA, Upton N (1999) Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10911–10916.
- Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Sugiyama F, Yagami K, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T (2001) Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron* 30:345–354.
- Heinemeyer T, Wingender E, Reuter I, Hermjakob H, Kel AE, Kel OV, Ignatieva EV, Ananko EA, Podkolodnaya OA, Kolpakov FA, Podkolodny NL, Kolchanov NA (1998) Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic Acids Res* 26:362–367.
- Honda M, Eriksson KS, Zhang S, Tanaka S, Lin L, Salehi A, Hesla PE, Maehlen J, Gaus SE, Yanagisawa M, Sakurai T, Taheri S, Tsuchiya K, Honda Y, Mignot E (2009) *IGFBP3* colocalizes with and regulates hypocretin (orexin). *PLoS One* 4:e4254.
- Hubbard TJ, Aken BL, Ayling S, Ballester B, Beal K, Bragin E, Brent S, Chen Y, Clapham P, Clarke L, Coates G, Fairley S, Fitzgerald S, Fernandez-Banet J, Gordon L, Graf S, Haider S, Hammond M, Holland R, Howe K, Jenkinson A, Johnson N, Kahari A, Keefe D, Keenan S, Kinsella R, Kokocinski F, Kulesha E, Lawson D, Longden I, Megy K, Meidl P, Overduin B, Parker A, Pritchard B, Rios D, Schuster M, Slater G, Smedley D, Spooner W, Spudich G, Trevanion S, Vilella A, Vogel J, White S, Wilder S, Zadissa A, Birney E, Cunningham F, Curwen V, Durbin R, Fernandez-Suarez XM, Herrero J, Kasprzyk A, Proctor G, Smith J, Searle S, Flicek P (2009) Ensembl 2009. *Nucleic Acids Res* 37:D690–D697.
- Jimenez MA, Akerblad P, Sigvardsson M, Rosen ED (2007) Critical role for *Ebf1* and *Ebf2* in the adipogenic transcriptional cascade. *Mol Cell Biol* 27:743–757.
- Kieslinger M, Folberth S, Dobrova G, Dorn T, Croci L, Erben R, Consalez GG, Grosschedl R (2005) *EBF2* regulates osteoblast-dependent differentiation of osteoclasts. *Dev Cell* 9:757–767.
- Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, Lin X, Qiu X, de Jong PJ, Nishino S, Mignot E (1999) The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell* 98:365–376.
- Lu J, Sherman D, Devor M, Saper CB (2006) A putative flip-flop switch for control of REM sleep. *Nature* 441:589–594.
- Lu JW, Fenik VB, Branconi JL, Mann GL, Rukhadze I, Kubin L (2007) Disinhibition of perifornical hypothalamic neurones activates noradrenergic neurones and blocks pontine carbachol-induced REM sleep-like episodes in rats. *J Physiol* 582:553–567.
- Malgaretti N, Pozzoli O, Bosetti A, Corradi A, Ciarmatori S, Panigada M, Bianchi ME, Martinez S, Consalez GG (1997) *Mmot1*, a new helix-loop-helix transcription factor gene displaying a sharp expression boundary in the embryonic mouse brain. *J Biol Chem* 272:17632–17639.
- Marcus JN, Aschkenasi CJ, Lee CE, Chemelli RM, Saper CB, Yanagisawa M, Elmquist JK (2001) Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J Comp Neurol* 435:6–25.
- Mieda M, Willie JT, Hara J, Sinton CM, Sakurai T, Yanagisawa M (2004) Orexin peptides prevent cataplexy and improve wakefulness in an orexin neuron-ablated model of narcolepsy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4649–4654.
- Moriguchi T, Sakurai T, Takahashi S, Goto K, Yamamoto M (2002) The human prepro-orexin gene regulatory region that activates gene expression in the lateral region and represses it in the medial regions of the hypothalamus. *J Biol Chem* 277:16985–16992.
- Nambu T, Sakurai T, Mizukami K, Hosoya Y, Yanagisawa M, Goto K (1999) Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res* 827:243–260.
- Nishino S, Ripley B, Overeem S, Lammers GJ, Mignot E (2000) Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *Lancet* 355:39–40.
- Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS (1998) Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 18:9996–10015.
- Peyron C, Faraco J, Rogers W, Ripley B, Overeem S, Charnay Y, Nevsimalova S, Aldrich M, Reynolds D, Albin R, Li R, Hungs M, Pedrazzoli M, Padigaru M, Kucherlapati M, Fan J, Maki R, Lammers GJ, Bouras C, Kucherlapati R, Nishino S, Mignot E (2000) A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat Med* 6:991–997.
- Radulovacki M, Virus RM, Djuricic-Nedelson M, Green RD (1984) Adenosine analogs and sleep in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 228:268–274.
- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR,

- Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M (1998) Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92:573–585.
- Scammell TE, Willie JT, Guilleminault C, Siegel JM (2009) A consensus definition of cataplexy in mouse models of narcolepsy. *Sleep* 32:111–116.
- Thannickal TC, Moore RY, Nienhuis R, Ramanathan L, Gulyani S, Aldrich M, Cornford M, Siegel JM (2000) Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron* 27:469–474.
- Thannickal TC (2009) A decade of hypocretin/orexin: accomplishments in sleep medicine. *Sleep Med Rev* 13:5–8.
- Tsujino N, Sakurai T (2009) Orexin/hypocretin: a neuropeptide at the interface of sleep, energy homeostasis, and reward system. *Pharmacol Rev* 61:162–176.
- Wang HL, Morales M (2009) Pedunculopontine and laterodorsal tegmental nuclei contain distinct populations of cholinergic, glutamatergic and GABAergic neurons in the rat. *Eur J Neurosci* 29:340–358.
- Wang MM, Reed RR (1993) Molecular cloning of the olfactory neuronal transcription factor Olf-1 by genetic selection in yeast. *Nature* 364:121–126.
- Wang MM, Tsai RY, Schrader KA, Reed RR (1993) Genes encoding components of the olfactory signal transduction cascade contain a DNA binding site that may direct neuronal expression. *Mol Cell Biol* 13:5805–5813.
- Wang SS, Tsai RY, Reed RR (1997) The characterization of the Olf-1/EBF-like HLH transcription factor family: implications in olfactory gene regulation and neuronal development. *J Neurosci* 17:4149–4158.
- Wang SS, Lewcock JW, Feinstein P, Mombaerts P, Reed RR (2004) Genetic disruptions of O/E2 and O/E3 genes reveal involvement in olfactory receptor neuron projection. *Development* 131:1377–1388.
- Williams RW, Rakic P (1988) Three-dimensional counting: an accurate and direct method to estimate numbers of cells in sectioned material. *J Comp Neurol* 278:344–352.
- Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Tokita S, Williams SC, Kisanuki YY, Marcus JN, Lee C, Elmquist JK, Kohlmeier KA, Leonard CS, Richardson JA, Hammer RE, Yanagisawa M (2003) Distinct narcolepsy syndromes in orexin receptor-2 and orexin null mice: molecular genetic dissection of non-REM and REM sleep regulatory processes. *Neuron* 38:715–730.
- Yang HS, Vitaterna MH, Laposky AD, Shimomura K, Turek FW (2009) Genetic analysis of daily physical activity using a mouse chromosome substitution strain. *Physiol Genomics* 39:47–55.

APPENDIX

Supplementary Data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.03.029.

(Accepted 12 March 2011)
(Available online 22 March 2011)



Narcolepsy and orexins: an example of progress in sleep research

Alberto K. De la Herrán-Arita, Magdalena Guerra-Crespo and René Drucker-Colín*

Departamento de Neuropatología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México

Edited by:

Michael J. Thorpy, Albert Einstein College of Medicine of Yeshiva University, USA

Reviewed by:

Michael J. Thorpy, Albert Einstein College of Medicine of Yeshiva University, USA
Thomas C. Thannickal, University of California Los Angeles, USA

*Correspondence:

René Drucker-Colín, Departamento de Neuropatología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-600, 04510 México D.F., México.
e-mail: drucker@servidor.unam.mx

Narcolepsy is a chronic neurodegenerative disease caused by a deficiency of orexin-producing neurons in the lateral hypothalamus. It is clinically characterized by excessive daytime sleepiness and by intrusions into wakefulness of physiological aspects of rapid eye movement sleep such as cataplexy, sleep paralysis, and hypnagogic hallucinations. The major pathophysiology of narcolepsy has been recently described on the bases of the discovery of the neuropeptides named orexins (hypocretins) in 1998; considerable evidence, summarized below, demonstrates that narcolepsy is the result of alterations in the genes involved in the pathology of the orexin ligand or its receptor. Deficient orexin transmission is sufficient to produce narcolepsy, as we describe here, animal models with dysregulated orexin signaling exhibit a narcolepsy-like phenotype. Remarkably, these narcoleptic models have different alterations of the orexinergic circuit, this diversity provide us with the means for making comparison, and have a better understanding of orexin-cell physiology. It is of particular interest that the most remarkable findings regarding this sleep disorder were fortuitous and due to keen observations. Sleep is a highly intricate and regulated state, and narcolepsy is a disorder that still remains as one of the unsolved mysteries in science. Nevertheless, advances and development of technology in neuroscience will provide us with the necessary tools to unravel the narcolepsy puzzle in the near future. Through an evaluation of the scientific literature we traced an updated picture of narcolepsy and orexins in order to provide insight into the means by which neurobiological knowledge is constructed.

Keywords: narcolepsy, orexins, hypothalamus, sleep

HISTORICAL ASPECTS OF NARCOLEPSY

The term narcolepsy derives from the french word “narcolepsie” created by the physician Jean-Baptiste-Édouard Gélinau by combining the Greek νάρκη (narkē, “numbness” or “stupor”), and λάψις (leipsis, “attack” or “seizure”). Even though Narcolepsy was first described over 120 years ago (Fisher, 1878; Gélinau, 1880; Westphal, 1887; Löwenfeld, 1902), only in the last decade the underlying neurobiology started to become clear.

Narcolepsy affects approximately 0.2% of the population worldwide and causes disability in 24% of the affected subjects (Longstreth et al., 2007). Narcoleptic patients frequently have severe sleepiness which makes particularly difficult remaining awake during activities that demand an alert state. In addition, these individuals regularly have fragments of rapid eye movement (REM) sleep that intrude into wakefulness, such as dream-like hallucinations (hypnagogic) as they drift off to sleep and cataplexy or have brief episodes of muscle paralysis triggered by strong emotions.

All narcoleptic subjects present chronic sleepiness, but the intensity varies across the day and between individuals. This sleepiness is most troublesome during periods of inactivity, though is often improved temporarily by a brief nap. As a consequence of sleepiness, patients may report inattention, poor memory, blurry vision, diplopia, and automatic behaviors such as driving without awareness (Broughton et al., 1998; Harsh et al., 2000).

Hypnagogic hallucinations are dream-like, often frightening hallucinations that typically occur with drowsiness or the onset of sleep. These hallucinations are usually visual, but also tactile, auditory, or even vestibular with a sense of sudden falling are not uncommon.

Sleep paralysis is profound weakness occurring at the onset of sleep or upon awakening, an intrusion of REM sleep paralysis into wakefulness, and can be associated with a sensation of fear or suffocation. Hypnagogic hallucinations and sleep paralysis are not specific to narcolepsy and can be seen with other conditions of increased sleep pressure such as chronic sleep deprivation or obstructive sleep apnea, and occasionally in normal individuals (Dahlitz and Parkes, 1993; Aldrich, 1996).

Cataplexy is a sudden muscle weakness brought on by strong emotions, particularly joking, laughter, or anger (Guilleminault and Gelb, 1995; Anic-Labat et al., 1999). Most likely, this also is an intrusion of REM sleep atonia into wakefulness, but in contrast with sleep paralysis, cataplexy occurs almost exclusively in narcolepsy. Consciousness is never impaired unless the patient subsequently falls asleep or begins having hypnagogic hallucinations. Episodes of cataplexy may begin with clonic inhibitory movements leading to a fall, followed by a period of atonia and arreflexia usually lasting less than 2 min (Rubboli et al., 2000). Cataplexy may result from excessive activation of descending motor

inhibitory pathways that are active during strong emotions or REM sleep (Siegel et al., 1991).

HYPOTHALAMUS AND SLEEP

For years, the notion that narcolepsy was caused by some dysfunction of the hypothalamus or REM sleep-regulating pathways existed, but the fundamental neuropathology has remained a mystery until the last few years.

The first correlation between the hypothalamus and sleep regulation was characterized by the Viennese neurologist Constantin von Economo during the 1915 Spanish influenza epidemic which allowed the pathoanatomical study of brain specimens from patients who had died of encephalitis lethargica (Economo, 1917). The frequent occurrence of pathologically increased sleep in encephalitis lethargica secondary to lesions in the posterior hypothalamus or at the junction of the brainstem and forebrain, prompted him to assume that an ascending arousal system originating in the brainstem that kept the forebrain awake existed.

This belief would be later confirmed by Moruzzi and Magoun (1949), they found that stimulation of the reticular formation of the brain stem evoked changes in the EEG, consisting of abolition of synchronized discharge and introduction of low voltage fast activity in its place, awakening animals from normal sleep; which developed the concept of the “ascending activating reticular system.”

Circling back to Von Economo’s findings, he also established that patients who had experienced sleeplessness before dying had brain lesions in the preoptic area of the anterior hypothalamus, area which came to be known as the “sleep center.”

REM SLEEP AND NARCOLEPSY

The dissection of the mechanisms involved in the regulation of sleep-wake cycling provided a better understanding of the nature of narcolepsy.

Discovery of REM sleep by Aserinsky and Kleitman (1953) was one of the most valuable breakthroughs regarding sleep research. They described that this novel sleep stage had an EEG pattern that resembled the vigilance state, occurred in a recurrent interval and presented characteristic REM with muscle atonia, suggesting that these physiological phenomena, and probably dreaming, were very likely all manifestations of a particular level of cortical activity which is encountered normally during sleep (Aserinsky and Kleitman, 1953). With this finding, they placed the last piece of the puzzle of sleep architecture.

The early descriptions of REM sleep and its associated atonia led multiple investigators to study sleep onset in narcolepsy. Vogel was the first to report REM sleep at sleep onset in a narcoleptic patient, establishing the close relationship between REM sleep and narcolepsy (Vogel, 1976). However, regardless of having mapped the structural design of the sleep-wake cycle (SWC), the factual nature of narcolepsy was not established hitherto.

THE MIDBRAIN RETICULAR FORMATION AND ITS CHEMICAL NATURE IN SLEEP

The consensus notion that sleep resulted from active inhibition of the vigilance midbrain reticular neurons located in the rostral part of the brainstem gave Hernández-Peón’s group the notion

that presynaptic hypnogenic inhibitory terminals were located in the same anatomical region.

By administering a perfused substance from a sleep-deprived donor cat obtained from the midbrain reticular formation (MRF) into the MRF of an awaked recipient cat, the latter began to show the typical behavioral preparatory attitude of sleep (Drucker-Colín et al., 1970; Drucker-Colín, 1973). The results showed that the MRF was a specific area of the brain involved in the regulation of the SWC and gave the stepping stone to the discovery of the neurotransmitters involved in the maintenance of sleep and vigilance. Nowadays, we know that an alert, active, and responsive awake state depends upon influences ascending from the brainstem to the cerebral cortex to stimulate cortical activation and descending from the brainstem to the spinal cord to stimulate behavioral arousal with muscle tone (Olszewski and Baxter, 1954; Butler and Hodos, 1996; Jones, 2008).

Amongst the neurotransmitters that regulate the SWC, acetylcholine (ACh) has been known to play a critical role in stimulating cortical activation since very early pharmacological studies (Holmes and Jones, 1994), during waking and also in REM sleep. Cholinergic neurons can therefore stimulate cortical activation irrespective of behavioral arousal (Gnadt and Pegram, 1986; Hallanger et al., 1987).

Another major group is the locus coeruleus (LC) noradrenergic neurons, which differ from neurons of the MRF and from the cholinergic neurons of the brainstem and basal forebrain in that they have either excitatory or inhibitory actions upon postsynaptic neurons, and have the capacity to directly excite the thalamocortical relay neurons and the cholinergic basal-cortical neurons, as well as cortical pyramidal neurons through $\alpha 1$ -adrenergic receptors (AR), while inhibiting sleep-promoting neurons through $\alpha 2$ -ARs (McCormick, 1992). Hence, when LC neurons are active, they can simultaneously stimulate cortical activation and behavioral arousal. In contrast to cholinergic neurons, LC noradrenergic neurons discharge selectively during waking and cease firing during sleep to be completely off during REM sleep (Hobson et al., 1975; Aston-Jones and Bloom, 1981).

Albeit having a general knowledge of the principal chemical substrates that regulate the SWC, it appeared that arousal systems, which also include histaminergic and serotonergic neurons are highly redundant and it appears that none of them is necessary for the maintenance of a waking state (Jones, 2003).

THE DISCOVERY OF OREXINS

One of the most important breakthroughs came with the coincidently discovery by two different groups of two neuropeptides residing in the lateral hypothalamus (LH); one group named this peptide orexin for its presumed role in appetite whereas another group named it hypocretin for its possible resemblance to secretin, found by orphan receptor technologies and subtractive cDNA cloning, respectively (de Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998).

Orexins are exclusively synthesized in the LH, derived from a single protein precursor named prepro-orexin. Prepro-orexin is enzymatically matured into two peptides, orexin-A and orexin-B which are 33- and 28-amino-acid peptides, respectively. Two cloned orexin receptors OX1R and OX2R are serpentine G-protein-coupled receptors, both of which bind orexins and are

coupled to Ca²⁺ mobilization (Sakurai et al., 1998). Orexins neurons project within the LH throughout the central nervous system to nuclei involved in the control of feeding, sleep-wakefulness, neuroendocrine homeostasis, and autonomic regulation (Peyron et al., 1998; Marcus et al., 2001).

Orexin neurons are active during wakefulness as indicated by the expression of Fos (Estabrooke et al., 2001), and extracellular concentrations of orexin are higher during periods of wakefulness (Yoshida et al., 2001). Electrophysiological recordings from the orexin neuron region identified many wake-active neurons, with particularly high firing rates when an animal is physically active (Steininger et al., 1999; Alam et al., 2002).

In vitro, orexin excites the LC and other aminergic neurons (Hagan et al., 1999; Bayer et al., 2001; Brown et al., 2001). *In vivo*, injections of orexin into the lateral ventricles or near specific arousal regions such as the LC increase wakefulness and markedly suppress REM sleep (Hagan et al., 1999; Bourgin et al., 2000).

Interestingly, the orexin neuron population was previously described by Jouvet's group in 1989 as prolactin-secreting neurons (Paut-Pagano et al., 1989), later on it was described that the prolactin antiserum was recognizing an epitope carried by a particular fragment of the prepro-orexin gene (Risold et al., 1999).

NARCOLEPSY AND OREXINS: THE MISSING ELEMENT

The interest of investigators in orexins has focused on narcolepsy, this initiated with a bright but incidental observation. The general rationale was that genes expressed in the hypothalamus might have medically useful effects due to the role of the hypothalamus in control of appetite, thirst, pituitary hormones and many other autonomic and arousal functions. In order to determine orexin peptides role in food consumption Yanagisawa's group constructed a mice with a deletion of the gene coding for prepro-orexin, as they were originally believed to be primarily important in the regulation of appetite. Although they did not observe significant changes in food consumption between wildtype and orexin knockout mice, they did scrutinize with video recording analysis that orexin knockout mice displayed severe sleepiness and cataplexy like events (Chemelli et al., 1999). This association was coincidentally confirmed in the same year when Mignot's group sought to identify the gene that caused canine narcolepsy by a systematic chromosomal analysis. They identified that dogs with inherited narcolepsy had an exon-skipping mutation in the type OX2R gene (Lin et al., 1999).

In follow up work, Yanagisawa's team created mice lacking either of the two identified orexin receptors. They found that knockout mice of the OX2R experienced cessations of activity which they concluded were sleep attacks. They also found that mice deficient of the OX1R had disrupted sleep but showed fewer of the signs of narcolepsy than the OX2R knockout mice (Chemelli et al., 2000; Willie et al., 2003).

In order to confirm if specific orexin-cell loss derives in narcolepsy, Shiromani's team suggested that since orexin neurons are located only in the LH but neither electrolytic nor pharmacological lesions of this region have produced narcoleptic-like sleep, specific neurons need to be destroyed. They specifically damaged

orexin neurons in the LH by means of the endogenous ligand orexin-B conjugated to the ribosome-inactivating protein saporin. The lesioned rats presented an increase in slow-wave sleep, REM sleep, and REM sleep intrusions during wakefulness, characteristic of a narcoleptic phenotype (Gerashchenko et al., 2001). However, in the vast majority of the cases, human narcolepsy is not secondary to lesions as in saporin-lesioned rats.

Meanwhile, Yanagisawa's group were trying to deal with this problem, to come up with an animal model that strictly resembled human narcolepsy. They generated transgenic mice in which orexin-containing neurons are ablated by orexinergic-specific expression of a truncated Machado–Joseph disease gene product (ataxin-3) with an expanded polyglutamine stretch. These mice presented a gradual orexin-cell neurodegeneration and showed a phenotype strikingly similar to human narcolepsy, including behavioral arrests, premature entry into REM sleep and poorly consolidated sleep patterns (Hara et al., 2001).

OREXINS AND HUMAN NARCOLEPSY

Even though murine and canine narcolepsy were demonstrated to be caused by alterations of the orexinergic circuit, most human narcolepsy is not familial, is discordant in identical twins, and has not been linked to mutations of the orexin system, Mignot's group sought to make this association, they measured immunoreactive orexin in cerebrospinal fluid (CSF) and reported major deficiencies in orexin CSF levels among narcoleptic patients (110 pg/ml, one-third of mean control value; Nishino et al., 2000) implying either a large orexin-cell loss or a complete cessation of orexin production in these cells.

In a parallel work they also described the virtual absence of orexin in narcoleptic brains by means of *in situ* hybridization and peptide radioimmunoassay techniques (Peyron et al., 2000). In the same year, while Mignot's team reported a total loss of orexinergic neurons, Siegel reported an 85–95% decrease in orexin-containing neurons in brains of patients with narcolepsy (Thannickal et al., 2000). This finding was quite selective, as the MCH neurons, which are intermingled with the orexin cells, were completely spared, and it probably represented cell loss rather than downregulation of orexin expression as there was concomitant loss of other markers (dynorphin and neuronal activity-related pentraxin) of the orexin-cell population.

Regardless of having elucidated the association of human narcolepsy and a deficit in orexin peptide production, only in a single narcoleptic patient has been reported a mutation of the gene responsible for orexin production (Peyron et al., 2000). Hence, the most widely accepted view regarding the mechanism of the orexin deficiency is that a degenerative process, probably immune in origin, selectively destroys orexin-releasing neurons, thereby producing the clinical syndrome of narcolepsy.

LOSS OF OREXIN NEURONS: THE UNANSWERED MYSTERY

Facts have now established that narcolepsy is caused by a selective loss of orexin signaling in the brain; however, loss of orexin signaling might not be due to a simple genetic abnormality, as narcolepsy is in most of the cases acquired during young adulthood, and the vast majority of people with narcolepsy do not have mutations of the genes encoding the orexin peptides or their OX1 or OX2

receptors (Guilleminault and Anognos, 2000). Loss of orexin signal is most likely not a simple failure in producing orexin peptides alone.

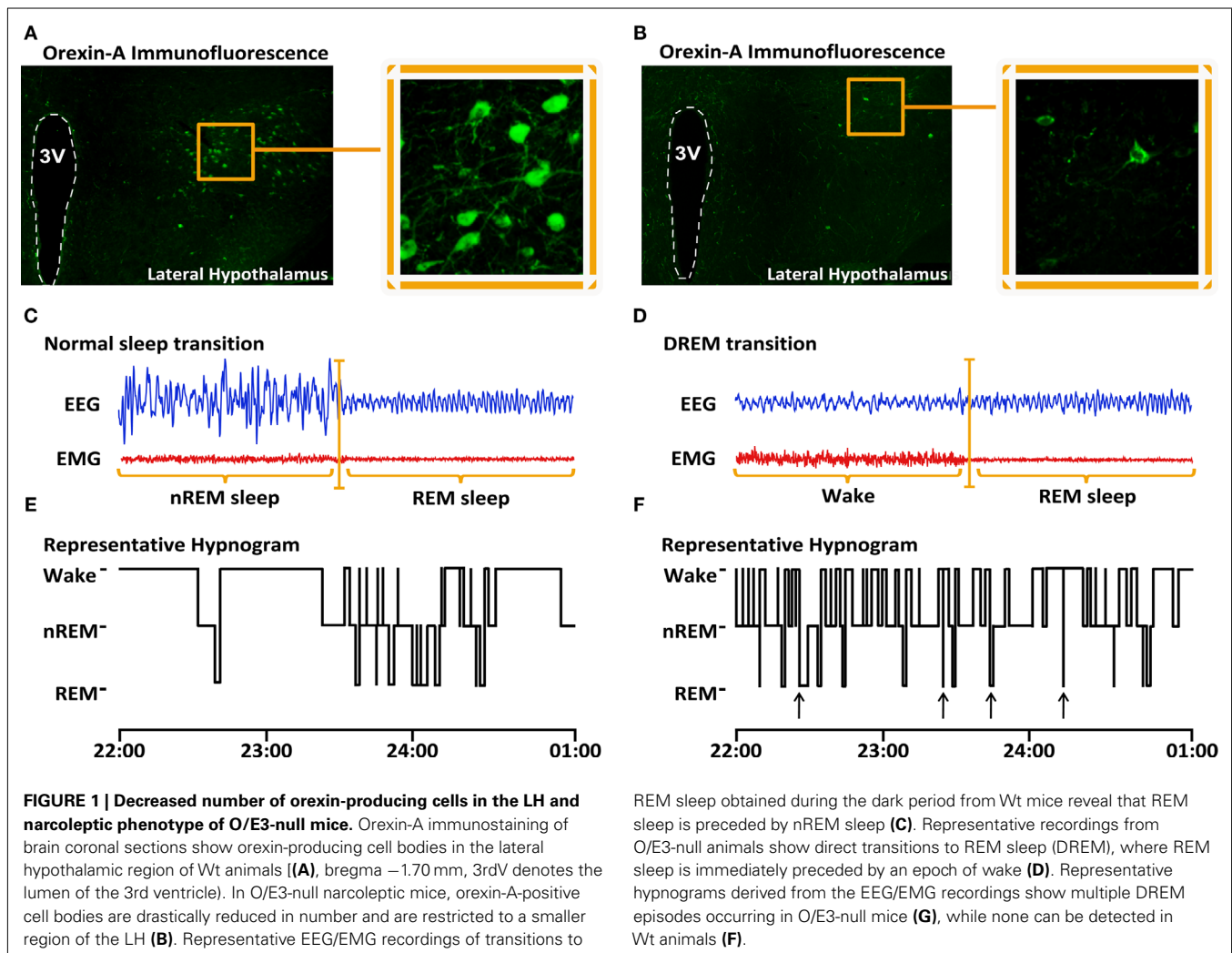
The question that arose from this particular riddle was: what other genes might be altered and cause orexin neuron deficiency in narcolepsy? Approximately 90% of patients with narcolepsy have human leukocyte antigen DQB1 *0602 and DQA1 *0102 (Mignot et al., 2001; Scammell, 2003), leading many researchers to hypothesize that the loss of orexin neurons may be immune-mediated.

In order to analyze this, Mignot's team performed gene expression profiling in the hypothalamus to identify novel genes dysregulated in a rodent model of narcolepsy (orexin-ataxin-3 mice), as these could be the target of autoimmune attack or modulate orexin gene expression. They found a novel gene which colocalized in orexin cells named insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3) that was dysregulated in the orexin-ataxin-3 mice and colocalized in the remaining orexin neurons. They postulated that excessive IGFBP3 expression might initiate orexin-cell death and cause narcolepsy (Honda et al., 2009).

Almost simultaneously, our group was working with a mouse carrying a deletion of the gene coding for the transcription factor

O/E3 (also called *ebf2*), which is normally highly expressed in the central nervous system and regulates neuronal differentiation in the hypothalamus. While determining the role of O/E3 in olfactory circuit architecture; we observed that these O/E3-null mice presented what appeared to be a sudden and transient episode of loss of muscle tone during an active period of vigilance, which indicated it could be a direct transition from vigilance to REM sleep and that O/E3-null mice might have a narcoleptic phenotype. By means of electrophysiological analysis of the SWC and immunostaining against orexin, we found that O/E3 knockout mice presented direct transitions from vigilance to REM sleep characteristic of a narcoleptic phenotype (Figures 1D,G) and a fragmented SWC (Figure 1F), whereas their wildtype littermates presented a normal sleep pattern (Figure 1E) and normal sleep transitions (from nREM to REM, Figure 1C). Additionally, O/E3-null mice presented a loss of approximately 80% of orexin neurons (Figure 1B) compared to their wildtype littermates (Figure 1A; De la Herrán-Arita et al., 2011).

Worthy of notice, O/E3 was one of the downregulated genes in the narcoleptic orexin-ataxin-3 mice in the work published by Mignot's group (Honda et al., 2009), confirming that O/E3



is expressed in the LH, where it might regulate prepro-orexin gene expression. By using a sequence alignment approach we were able to identify two conserved sequences within the promoter regions of the prepro-orexin genes of four different species, which appear to correspond to putative olf-1-responsive sequences (De la Herrán-Arita et al., 2011). Olf-1 binding sites have been demonstrated to serve as targets for members of the O/E transcription factor family (Wang et al., 1993). One of the olf-1 sites in the prepro-orexin gene is superposed to the OE1 element, which suggests that O/E3 could directly regulate prepro-orexin gene expression (Figure 2).

Taken together, the data demonstrated that O/E3 is the newest discovered member in the regulation of orexin-cell physiology. Interestingly, the narcoleptic phenotype of O/E3-null mice differs from orexin-null (Chemelli et al., 1999) and orexin-ataxin-3 transgenic mice (Hara et al., 2001), since O/E3-null mice have less wakefulness, more nREM sleep and an increase in REM sleep during the dark period (Table 1). These differences could be partially due to the genetic background in which the distinct mutations are maintained: while the orexin-modified mouse lines are C57BL/6 hybrids, crossed to either DBA/1 (orexin-ataxin) or 129/SvEv (orexin knockout) strains, O/E3-null mice

are kept within a 129S2/Sv background. It has been demonstrated that even a single chromosome substitution within a given background can alter the SWC parameters of mouse strains (Yang et al., 2009).

This finding brings us closer to determine the factors involved in the regulation of the SWC and the basis of the narcolepsy-cataplexy syndrome, which in the near future might help the development of a proper therapeutic solution for narcolepsy.

THE STRUGGLE AGAINST OREXIN DEFICIT

Narcolepsy is now identified to be a neurodegenerative disease characterized by a massive specific loss of orexin neurons in the LH. Even though the cause of orexin neuronal loss is still unknown, different approaches to revert the absence of these neuropeptides have been attempted.

Gene transfer has proven to be an effective neurobiological tool in a number of neurodegenerative diseases; since narcolepsy is a disease where the orexin precursor prepro-orexin is missing, a viral vector was constructed to transfer the gene to the LH of orexin knockout mice. During the 4-day life-span of the vector, the incidence of cataplexy declined by 60%, and the levels of REM sleep were similar to wildtype mice, indicating that narcoleptic



olfactory epithelium. One of these olf-1-like elements overlaps with one of the regions (OE1, underlined) that appear to restrict prepro-orexin expression in the lateral hypothalamus. The second olf-1-like element lies at position-7 from the putative transcription start site (arrow indicating direction of transcription). A conserved TATA box can also be identified at position-24 in all these genes. Translation start site (ATG) is indicated in italics.

Table 1 | Time during the dark phase.

Murine model of Narcolepsy	Stage (minute)			Episode duration			Additional remarks	
	Wake	nREM	REM	Wake	nREM	REM	Orexin loss	Phenotype
Orexin knockout mouse	350.0 ± 20.2	327.2 ± 19.8	41.0 ± 2.3	284.0 ± 59.9 s	235.9 ± 39.0 s	83.8 ± 3.0 s	Total	Normal
Orexin-ataxin-3 mouse	384.4 ± 9.1	287.9 ± 9.6	46.4 ± 2.0	247.0 ± 17.6 s	188.7 ± 8.8 s	85.7 ± 2.8 s	Total	Obese
Saporin-lesioned rat	NA	NA	NA	3.8 ± 0.5 min	3.2 ± 0.3 min	1.9 ± 0.1 min	>60%	NA
O/E3 knockout mouse	300 ± 19.2	329.8 ± 18.4	88.9 ± 2.5	249.5 ± 4.7 s	282.25 ± 5.3 s	83.5 ± 1.7 s	<80%	Dwarf

sleep–wake behavior in orexin knockout mice can be improved by targeted gene transfer (Liu et al., 2008).

In another effort to reverse the narcoleptic phenotype in a transgenic animal, Mieda et al. (2004, 2005) produced a transgenic mouse that overexpress a prepro-orexin transgene under the control of a β -actin/cytomegalovirus hybrid promoter (CAG-orexin transgenic mice), and crossed them to orexin–ataxin-3 mice to produce offspring that carry both transgenes (double hemizygous mice). Their results showed that orexin–ataxin-3/CAG–orexin double transgenic littermates exhibited longer, more consolidated bouts of wakefulness and normalized amounts of REM sleep during the dark phase than their orexin–ataxin-3 littermates. Most outstandingly, no direct transitions from vigilance to REM sleep were ever detected in any double transgenic mice. However, chronic overproduction of orexins in CAG–orexin mice caused destabilization of sleep.

In a different experimental approach, they examined whether acute intra-cerebroventricular administrations of orexin peptide might also rescue the narcoleptic phenotype. When orexin–ataxin-3 mice were administered orexin-A peptide, the frequency of arrests and overall time spent in cataplexy were significantly reduced in a 3-h period (Mieda et al., 2004). The result was later confirmed by our research in a similar experiment where O/E3-null mice were given the same dose of orexin-A peptide (De la Herrán-Arita et al., 2011), however, O/E3-null mice presented a total REM sleep abolition, probably due to the different genetic background in which the distinct mutations were maintained. Thus, administration of orexin-A is sufficient to acutely suppress behavioral arrests in narcoleptic mice, but a simpler method for administration should be developed. With these results, it is demonstrated that high level of orexin peptides, as well as a lack of orexins, results in an inadequate regulation of the SWC.

Given that narcolepsy is secondary to a loss of orexin-producing neurons, a logical inference would be to replace the missing neurons in order to reverse the symptoms. Following that thought, our group decided to evaluate the survival of orexin neuron grafts, based on the premise that studies made by others and us have demonstrated that grafted tissue survives, integrates within the host brain, and provides functional recovery following brain injury in various animal models (Perlow et al., 1979; Drucker-Colín et al., 1984; Björklund and Lindvall, 2000). By analyzing the survival of orexin-containing neurons grafted into the pontine reticular formation, a region traditionally regarded to be essential for REM sleep generation; our group found that orexin-immunoreactive somata with processes and varicosities were present in the graft zone 36 days after the implant (Arias-Carrión et al., 2004). However, efforts should be made to increase

survival of these neurons and to evaluate the effect of these grafts in narcoleptic animals.

DISCUSSION

Key elements of narcolepsy have been revealed in the last decade. Sleep research is an intricate area; unraveling and identifying the mechanisms involved in the regulation of the SWC has been a difficult attempt, due its nature as an intricate system.

Identifying the cause of a sleep disorder is a complex task. Narcolepsy may be one of the few neurological disorders in which the pathological process has been identified.

A giant leap in the way to unravel the mystery of this disease was taken with the finding of orexin peptides and its association with SWC regulation. Novel evidence demonstrates that impaired orexin signaling is the major, if not the sole cause of the pathogenesis of Narcolepsy, thus contributing to the idea that it is actually a neurodegenerative disease.

Clearly, alterations in the orexin system are fundamental for this disorder. Nonetheless, clarification of the mechanisms responsible for the loss of orexinergic neurons still needs to be determined; this may shed light on new tools for diagnosing and treating this disease and will have important implications for the comprehension of the orexin system and analysis of human narcolepsy. Narcoleptic animal models will aid in solving this dilemma, the variations between the murine narcolepsy models offer us a broad perspective of the Narcolepsy syndrome. The difference in the time spent in each stage of the SWC in these narcoleptic animals is caused by exclusive alterations of the orexinergic circuit. This divergence opens new ways to fully understand how the orexinergic circuit is formed and provides the means for a deeper analysis of the genes that are altered in narcolepsy or implicated in orexin regulation.

Genetic profile in narcolepsy may have implications for future therapies, which might involve orexin gene therapy, transplantation of orexin neurons, stem cell precursors, or engineered cells to produce orexin peptides. Moreover, narcolepsy can be added to the list of the few neurologic disorders which arise from the selective loss of a single population of neurons.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by UNAM-DGAPA-PAPIIT grants IN225209 to R. Drucker-Colín. We would like to thank Diana Millán-Aldaco, Marcela Palomero-Rivero, Teresa Torres-Peralta, and Francisco Pérez-Eugenio for their technical assistance and support in the reviewing of this manuscript. We would also like to thank the Doctorado en Ciencias Biomédicas of the Universidad Nacional Autónoma de México and the DGIP of the Universidad Autónoma de Sinaloa for their support.

REFERENCES

- Alam, M. N., Gong, H., Alam, T., Jaganath, R., McGinty, D., and Szymusiak, R. (2002). Sleep-waking discharge patterns of neurons recorded in the rat perifornical lateral hypothalamic area. *J. Physiol.* 538, 619–631.
- Aldrich, M. S. (1996). The clinical spectrum of narcolepsy and idiopathic hypersomnia. *Neurology* 46, 393–401.
- Anic-Labat, S., Guilleminault, C., Kraemer, H. C., Meehan, J., Arrigoni, J., and Mignot, E. (1999). Validation of a cataplexy questionnaire in 983 sleep-disorders patients. *Sleep* 22, 77–87.
- Arias-Carrión, O., Murillo-Rodriguez, E., Xu, M., Blanco-Centurion, C., Drucker-Colín, R., and Shiromani, P. J. (2004). Transplantation of hypocretin neurons into the pontine reticular formation: preliminary results. *Sleep* 27, 1465–1470.
- Aserinsky, E., and Kleitman, N. (1953). Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science* 118, 273–274.
- Aston-Jones, G., and Bloom, F. E. (1981). Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *J. Neurosci.* 1, 876–886.
- Bayer, L., Eggermann, E., Serafin, M., Saint-Mleux, B., Machard, D., Jones, B., and Mühlethaler, M. (2001). Orexins (hypocretins) directly excite

- tuberomammillary neurons. *Eur. J. Neurosci.* 14, 1571–1575.
- Björklund, A., and Lindvall, O. (2000). Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat. Neurosci.* 3, 537–544.
- Bourgin, P., Huitrón-Réndiz, S., Spier, A. D., Fabre, V., Morte, B., Criado, J. R., Sutcliffe, J. G., Henriksen, S. J., and de Lecea, L. (2000). Hypocretin-1 modulates rapid eye movement sleep through activation of locus coeruleus neurons. *J. Neurosci.* 20, 7760–7765.
- Broughton, R., Dunham, W., Newman, J., Lutley, K., Duschesne, P., and Rivers, M. (1998). Ambulatory 24 hour sleep-wake monitoring in narcolepsy-cataplexy compared to matched controls. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 70, 473–481.
- Brown, R. E., Sergeeva, O., Eriksson, K. S., and Haas, H. L. (2001). Orexin A excites serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the rat. *Neuropharmacology* 40, 457–459.
- Butler, A. B., and Hodos, W. (1996). *The Reticular Formation. Comparative Vertebrate Neuroanatomy. Evolution and Adaptation.* New York: Wiley-Liss, 165.
- Chemelli, R. M., Sinton, C. M., and Yanagisawa, M. (2000). Polysomnographic characterization of orexin-2 receptor knockout mice. *Sleep* 23, 296–297.
- Chemelli, R. M., Willie, J. T., Sinton, C. M., Elmquist, J. K., Scammell, T., Lee, C., Richardson, J. A., Williams, S. C., Xiong, Y., Kisanuki, Y., Fitch, T. E., Nakazato, M., Hammer, R. E., Saper, C. B., and Yanagisawa, M. (1999). Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 98, 437–451.
- Dahlitz, M., and Parkes, J. D. (1993). Sleep paralysis. *Lancet* 341, 406–407.
- De la Herrán-Arita, A. K., Zomosa-Signoret, V. C., Millán-Aldaco, D. A., Palomero-Rivero, M., Guerra-Crespo, M., Drucker-Colín, R., and Vidaltamayo, R. (2011). Aspects of the narcolepsy–cataplexy syndrome in O/E3 (Ebf2)-null mutant mice. *Neuroscience*. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.03.029. [Epub ahead of print].
- de Lecea, L., Kilduff, T. S., Peyron, C., Gao, X., Foye, P. E., Danielson, P. E., Fukuhara, C., Battenberg, E. L., Gautvik, V. T., Bartlett, F. S. II, Frankel, W. N., van den Pol, A. N., Bloom, F. E., Gautvik, K. M., and Sutcliffe, J. G. (1998). The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 322–327.
- Drucker-Colín, R. (1973). Crossed perfusion of a sleep inducing brain tissue substance in conscious cats. *Brain Res.* 56, 123–134.
- Drucker-Colín, R., Aguilar-Roblero, R., García-Hernández, F., Fernández-Cancino, E., and Bermúdez-Rattoni, F. (1984). Fetal suprachiasmatic nucleus transplants: diurnal rhythm recovery of lesioned rats. *Brain Res.* 311, 353–357.
- Drucker-Colín, R., Rojas-Ramírez, J. A., Vera-Trueba, J., Monroy-Ayala, G., and Hernandez-Peón, R. (1970). Effect of crossed-perfusion of the midbrain reticular formation upon sleep. *Brain Res.* 23, 269–273.
- Economou, C. (1917). Encephalitis lethargica. *Wien. Klin. Wochenschr.* 30, 581–585.
- Estabrooke, I. V., McCarthy, M. T., Ko, E., Chou, T. C., Chemelli, R. M., Yanagisawa, M., Saper, C. B., and Scammell, T. E. (2001). Fos expression in orexin neurons varies with behavioral state. *J. Neurosci.* 21, 1656–1662.
- Fisher, F. (1878). Epileptoid schlafzustände. *Arch. Psychiatr. Nervenkr.* 8, 200–203.
- Gélineau, J. B. (1880). De la narcolepsie. *Gaz. Hôp. Civ. Mil. Empire Ottoman* 53, 626–628.
- Gerashchenko, D., Kohls, M. D., Greco, M., Waleh, N. S., Salin-Pascual, R., Kilduff, T. S., Lappi, D. A., and Shiromani, P. J. (2001). Hypocretin-2-saporin lesions of the lateral hypothalamus produce narcoleptic-like sleep behavior in the rat. *J. Neurosci.* 21, 7273–7283.
- Gnadt, J. W., and Pegram, G. V. (1986). Cholinergic brainstem mechanisms of REM sleep in the rat. *Brain Res.* 384, 29–41.
- Guilleminault, C., and Anognos, A. (2000). “Narcolepsy,” in *Principles and Practice of Sleep Medicine*, eds M. H. Kryger, T. Roth, and W. C. Dement (Philadelphia: W.B. Saunders), 676–686.
- Guilleminault, C., and Gelb, M. (1995). Clinical aspects and features of cataplexy. *Adv. Neurol.* 67, 65–77.
- Hagan, J. J., Leslie, R. A., Patel, S., Evans, M. L., Wattam, T. A., Holmes, S., Benham, C. D., Taylor, S. G., Routledge, C., Hemmati, P., Munton, R. P., Ashmeade, T. E., Shah, A. S., Hatcher, J. P., Hatcher, P. D., Jones, D. N., Smith, M. I., Piper, D. C., Hunter, A. J., Porter, R. A., and Upton, N. (1999). Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 10911–10916.
- Hallanger, A. E., Levey, A. I., Lee, H. J., Rye, D. B., and Wainer, B. H. (1987). The origins of cholinergic and other subcortical afferents to the thalamus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 262, 105–124.
- Hara, J., Beuckmann, C. T., Nambu, T., Willie, J. T., Chemelli, R. M., Sinton, C. M., Sugiyama, F., Yagami, K., Goto, K., Yanagisawa, M., and Sakurai, T. (2001). Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron* 30, 345–354.
- Harsh, J., Peszka, J., Hartwig, G., and Mitler, M. (2000). Night-time sleep and daytime sleepiness in narcolepsy. *J. Sleep Res.* 9, 309–316.
- Hobson, J. A., McCarley, R. W., and Wyzinski, P. W. (1975). Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science* 189, 55–58.
- Holmes, C. J., and Jones, B. E. (1994). Importance of cholinergic, GABAergic, serotonergic and other neurons in the medullary reticular formation for sleep-wake states studied by cytotoxic lesions in the cat. *Neuroscience* 62, 1179–1200.
- Honda, M., Eriksson, K. S., Zhang, S., Tanaka, S., Lin, L., Salehi, A., Hesla, P. E., Maehlen, J., Gaus, S. E., Yanagisawa, M., Sakurai, T., Taheri, S., Tsuchiya, K., Honda, Y., and Mignot, E. (2009). IGFBP3 colocalizes with and regulates hypocretin (orexin). *PLoS ONE* 4, e4254. doi: 10.1371/journal.pone.0004254
- Jones, B. E. (2003). Arousal systems. *Front. Biosci.* 8, 438–451.
- Jones, B. E. (2008). Modulation of cortical activation and behavioral arousal by cholinergic and orexinergic systems. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1129, 26–34.
- Lin, L., Faraco, J., Kadotani, H., Rogers, W., Lin, X., Qui, X., de Jong, P., Nishino, S., and Mignot, E. (1999). The REM sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor gene. *Cell* 98, 365–376.
- Liu, M., Thankachan, S., Kaur, S., Begum, S., Blanco-Centurion, C., Sakurai, T., Yanagisawa, M., Neve, R., and Shiromani, P. J. (2008). Orexin (hypocretin) gene transfer diminishes narcoleptic sleep behavior in mice. *Eur. J. Neurosci.* 7, 1382–1393.
- Longstreth, W. T. Jr., Koepsell, T. D., Ton, T. G., Hendrickson, A. F., and van Belle, G. (2007). The epidemiology of narcolepsy. *Sleep* 30, 13–26.
- Löwenfeld, L. (1902). Über Narkolepsie. *Münch. Med. Wochenschr.* 49, 1041–1045.
- Marcus, J. N., Aschkenasi, C. J., Lee, C. E., Chemelli, R. M., Saper, C. B., Yanagisawa, M., and Elmquist, J. K. (2001). Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 435, 6–25.
- McCormick, D. A. (1992). Neurotransmitter actions in the thalamus and cerebral cortex and their role in neuromodulation of thalamocortical activity. *Prog. Neurobiol.* 39, 337–388.
- Mieda, M., Willie, J. T., Hara, J., Sinton, C. M., Sakurai, T., and Yanagisawa, M. (2004). Orexin peptides prevent cataplexy and improve wakefulness in an orexin neuron-ablated model of narcolepsy in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 13, 4649–4654.
- Mieda, M., Willie, J. T., and Sakurai, T. (2005). Rescue of narcoleptic orexin neuron-ablated mice by ectopic overexpression of orexin peptides. *Contemporary Clin. Neurosci.* V 359–366.
- Mignot, E., Lin, L., Rogers, W., Honda, Y., Qiu, X., Lin, X., Okun, M., Hohjoh, H., Miki, T., Hsu, S., Lefell, M., Grumet, F., Fernandez-Vina, M., Honda, M., and Risch, N. (2001). Complex HLA-DR and -DQ interactions confer risk of narcolepsy-cataplexy in three ethnic groups. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 686–699.
- Moruzzi, G., and Magoun, H. W. (1949). Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 1, 455–473.
- Nishino, S., Ripley, B., Overeem, S., Lammers, G. J., and Mignot, E. (2000). Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *Lancet* 355, 39–40.
- Olszewski, J., and Baxter, D. (1954). *Cytoarchitecture of the Human Brain Stem.* Philadelphia: Lippincot.
- Paut-Pagano, L., Valatx, J. L., Kitahama, K., and Jouvet, M. (1989). Prolactin-secreting neurons in the dorsolateral hypothalamus in Sprague-Dawley rats. *C. R. Acad. Sci. III, Sci. Vie* 309, 369–376.
- Perlow, M., Freed, W. J., Hoffer, B., Seiger, A., Olson, L., and Wyatt, R. J. (1979). Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system. *Science* 204, 643–647.
- Peyron, C., Faraco, J., Rogers, W., Ripley, B., Overeem, S., Charnay, Y., Nevsimalova, S., Aldrich, M., Reynolds, D., Albin, R., Li, R., Hungs, M., Pedrazzoli, M., Padigaru, M., Kucherlapati, M., Fan, J., Maki, R., Lammers, G. J., Bouras, C., Kucherlapati, R., Nishino, S., and Mignot, E. (2000). A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat. Med.* 6, 991–997.

- Peyron, C., Tighe, D. K., van den Pol, A. N., de Lecea, L., Heller, H. C., Sutcliffe, J. G., and Kilduff, T. S. (1998). Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J. Neurosci.* 18, 9996–10015.
- Risold, P. Y., Griffond, B., Kilduff, T. S., Sutcliffe, J. G., and Fellmann, D. (1999). Preprohypocretin (orexin) and prolactin-like immunoreactivity are coexpressed by neurons of the rat lateral hypothalamic area. *Neurosci. Lett.* 259, 153–156.
- Rubboli, G., d'Orsi, G., Zaniboni, A., Gardella, E., Zamagni, M., Rizzi, R., Meletti, S., Valzania, F., Tropeani, A., and Tassinari, C. A. (2000). A videopolygraphic analysis of the cataleptic attack. *Clin. Neurophysiol.* 111(Suppl. 2), S120–S128.
- Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R. M., Tanaka, H., Williams, S. C., Richardson, J. A., Kozlowski, G. P., Wilson, S., Arch, J. R., Buckingham, R. E., Haynes, A. C., Carr, S. A., Annan, R. S., McNulty, D. E., Liu, W. S., Terrett, J. A., Elshourbagy, N. A., Bergsma, D. J., and Yanagisawa, M. (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92, 573–585.
- Scammell, T. E. (2003). The neurobiology, diagnosis, and treatment of narcolepsy. *Ann. Neurol.* 53, 154–166.
- Siegel, J. M., Nienhuis, R., Fahringer, H. M., Paul, R., Shiromani, P., Dement, W. C., Mignot, E., and Chiu, C. (1991). Neuronal activity in narcolepsy: identification of cataplexy-related cells in the medial medulla. *Science* 252, 1315–1318.
- Steininger, T. L., Alam, M. N., Gong, H., Szymusiak, R., and McGinty, D. (1999). Sleep-waking discharge of neurons in the posterior lateral hypothalamus of the albino rat. *Brain Res.* 840, 138–147.
- Thannickal, T. C., Moore, R. Y., Nienhuis, R., Ramanathan, L., Gulyani, S., Aldrich, M., Cornford, M., and Siegel, J. M. (2000). Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron* 27, 469–474.
- Vogel, G. W. (1976). Mentation reported from naps of narcoleptics. *Adv. Sleep* 3, 161–168.
- Wang, M. M., Tsai, R. Y., Schrader, K. A., and Reed, R. R. (1993). Genes encoding components of the olfactory signal transduction cascade contain a DNA binding site that may direct neuronal expression. *Mol. Cell. Biol.* 13, 5805–5813.
- Westphal, C. (1887). Zwei Krankheitsfälle. *Arch. Psychiatr. Nervenkr.* 7, 631–635.
- Willie, J. T., Chemelli, R. M., Sinton, C. M., Tokita, S., Williams, S. C., Kisanuki, Y. Y., Marcus, J. N., Lee, C., Elmquist, J. K., Kohlmeier, K. A., Leonard, C. S., Richardson, J. A., Hammer, R. E., and Yanagisawa, M. (2003). Distinct narcolepsy syndromes in Orexin receptor-2 and Orexin null mice: molecular genetic dissection of Non-REM and REM sleep regulatory processes. *Neuron* 38, 715–730.
- Yang, H. S., Vitaterna, M. H., Laposky, A. D., Shimomura, K., and Turek, F. W. (2009). Genetic analysis of daily physical activity using a mouse chromosome substitution strain. *Physiol. Genomics* 39, 47–55.
- Yoshida, Y., Fujiki, N., Nakajima, T., Ripley, B., Matsumura, H., Yoneda, H., Mignot, E., and Nishino, S. (2001). Fluctuation of extracellular hypocretin-1 (orexin A) levels in the rat in relation to the light-dark cycle and sleep-wake activities. *Eur. J. Neurosci.* 14, 1075–1081.

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 24 February 2011; paper pending published: 08 March 2011; accepted: 04 April 2011; published online: 18 April 2011.

Citation: De la Herrán-Arita AK, Guerra-Crespo M and Drucker-Colín R (2011) Narcolepsy and orexins: an example of progress in sleep research. *Front. Neur.* 2:26. doi: 10.3389/fneur.2011.00026

This article was submitted to *Frontiers in Sleep and Chronobiology*, a specialty of *Frontiers in Neurology*.

Copyright © 2011 De la Herrán-Arita, Guerra-Crespo and Drucker-Colín. This is an open-access article subject to a non-exclusive license between the authors and *Frontiers Media SA*, which permits use, distribution and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited and other *Frontiers* conditions are complied with.

Expert Opinion

1. Physiopathology of narcolepsy
2. Narcolepsy models: the springboard for successful drug discovery
3. Integrating animal models of narcolepsy into treatment innovation
4. Appraisal of orexin supplementation for treating animal models of narcolepsy
5. Narcolepsy and autoimmunity: the other side of the coin
6. Conclusion
7. Expert opinion

Models for narcolepsy with cataplexy drug discovery

Alberto K. De la Herrán-Arita & René Drucker-Colín[†]

[†]*Departamento de Neuropatología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México*

Introduction: Narcolepsy is a chronic sleep disorder, characterized by a disrupted nocturnal sleep, excessive daytime sleepiness (EDS) and symptoms of dissociated rapid eye movement (REM) sleep. These symptoms are often disabling, confining the patients to a life-long pharmacologic symptomatic treatment. Nowadays, it is well known that narcolepsy results from alterations in the genes involved in the physiology of the orexin ligand or its receptor.

Areas covered: This review recapitulates on the current approaches for treating narcolepsy with cataplexy and the use of narcolepsy models in order to address different aspects of the disease.

Expert opinion: Animal models are required for the study of human diseases when it is impractical or unethical to use humans; these models are useful for studying the underlying causes of a disease and are a common research tool for identifying potential drug targets. Current treatment for human narcolepsy is symptomatically based; interestingly, the existing approaches do not target the orexinergic circuit. The discovery of novel drug targets for treating narcolepsy remains the primary focus of study in sleep medicine research. New therapies will arise through the discovery of new animal models of narcolepsy, which will offer new insights into the understanding of its physiopathology.

Keywords: autoimmune, drug discovery, molecular markers, narcolepsy, orexins

Expert Opin. Drug Discov. [Early Online]

1. Physiopathology of narcolepsy

In order to understand the primary symptoms of narcolepsy, basic sleep physiology will be briefly discussed.

Normal sleep is a structured process that is divided into two distinct states; non-rapid eye movement (NREM) sleep and REM sleep [1,2]. NREM sleep is characterized by the slow oscillation wave activity of thalamocortical neurons. Based on characteristic electroencephalogram (EEG) signals, NREM sleep is divided into three stages (S1, S2 and S3) in humans. Human sleep alternates sequentially between NREM stages S1 and S3, followed by REM sleep; this sleep cycle takes place approximately every 90 min and is repeated four to five times a night. During the course of a normal night of sleep, there is a change from a predominance of slow-wave NREM sleep during the first part of the night to a predominance of REM sleep during the second part of the night [1]. The electromyogram (EMG) activity seen during NREM sleep expresses a characteristic reduction of muscle tone, whereas a complete muscle atonia is observed during REM sleep.

It has been proposed that sleep involves the reciprocal interaction of sleep-promoting centers with the arousal centers in the brain [1-3]. Wakefulness is promoted by an ascending arousal pathway that begins in the rostral pons and runs through the midbrain reticular formation. Brainstem and hypothalamic neurons that secrete acetylcholine, norepinephrine, dopamine, serotonin, histamine, excitatory amino acids and orexin may compose this ascending arousal pathway [1,2]. These neurotransmitters

informa
healthcare

Article highlights.

- Current narcolepsy models present genetic disruptions of the orexinergic circuit.
- Narcolepsy is associated with HLA-DQB1*0602, suggesting that it could be an autoimmune disease.
- Orexin-producing neurons express several molecular markers that may be the target of an autoimmune process.
- Preventive immunopharmacology for narcolepsy may avert the onset of orexin cell degeneration in the near future.

This box summarizes key points contained in the article.

are also likely to be involved in the control of muscle tone during sleep, by a direct and/or an indirect mechanism. Each of these wake-promoting nuclei can increase wakefulness, by a coordinated activity that supports alertness and cortical activation [1]. A switch in the hypothalamus shuts off this arousal system during sleep [2,3]. Sleep and wake states must be in balance in order to achieve adequate sleep-wake architecture. Narcolepsy represents a major neurologic malfunction of this control system after a disruption of the orexinergic circuit.

Knowledge of the pathological mechanisms of narcolepsy has evolved over the last half of the century [4]. In the 1960s, many of its features were shown to be related to dysregulation of REM sleep; specifically, narcoleptic patients entered directly into REM sleep without an entry into NREM sleep; this event is called sleep-onset REM period (SOREMP) [5]. Cataplexy, sleep paralysis and hypnagogic hallucinations associated with narcolepsy may all result from REM sleep intruding into wakefulness [6,7].

1.1 Orexin signaling and narcolepsy

Orexins were simultaneously discovered by two different groups; one group named this peptide orexin for its presumed role in appetite [7] and the other group named it hypocretin for its resemblance to secretin [8].

Orexins are exclusively synthesized in the lateral hypothalamus (LH); they are derived from a single protein precursor named prepro-orexin. Prepro-orexin is enzymatically matured into two peptides, orexin-A (hypocretin 1) and orexin-B (hypocretin 2), which are 33- and 28-amino-acid peptides, respectively. Orexin neurons project within the LH throughout the central nervous system to nuclei involved in the control of feeding, sleep-wakefulness, neuroendocrine homeostasis and autonomic regulation.

Two cloned orexin receptors have been described: OX1R and OX2R, which are serpentine G-protein-coupled receptors, both of them bind orexins and are coupled to Ca^{2+} mobilization [8]. OX1R binds orexin-A with high affinity (IC_{50} 20 nM in a competitive binding assay), but it has considerably less affinity for orexin-B (IC_{50} 420 nM). OX2R shares 64% amino acid homology with OX1R, but it is less

selective, binding both orexin-A and -B with high affinity (IC_{50} 38 and 36 nM, respectively) [8-10].

Orexin neurons are active during wakefulness, as indicated by the expression of Fos [11] and a higher extracellular concentration of orexin during periods of wakefulness [12]. Electrophysiological recordings from the orexin neuron region identified many wake-active neurons, with particularly high firing rates when an animal is physically active [13,14].

In vitro, orexin excites the locus coeruleus (LC) and other aminergic neurons [15-17]. *In vivo*, injections of orexin into the lateral ventricles or near specific arousal regions such as the LC increase wakefulness and markedly suppress REM sleep [15,18].

These experiments confirmed the role of the orexinergic circuit in the facilitation of wakefulness; however, studies linking human narcolepsy and orexin deficiency came only after the discovery that the orexin knockout mice presented a narcoleptic phenotype [19] and narcoleptic dogs, which inherit the disease, suffered from a null mutation in the OX2R [20]. Subsequently, studies in humans demonstrated a low or undetectable level of orexin-A (110 pg/ml, one-third of mean control value) in the cerebrospinal fluid of patients with narcolepsy [21,22], implying either a large orexin-cell loss or a complete cessation of orexin production in these cells; this was later confirmed by a post-mortem analysis of patients with narcolepsy, which presented a loss of orexinergic neurons [23,24].

From this knowledge, it was concluded that loss of function of the orexin system was the cause for manifestations of cataplexy and EDS in narcolepsy; moreover, it encouraged many researchers to investigate the potential of orexin supplementation as a treatment modality for narcolepsy.

2. Narcolepsy models: the springboard for successful drug discovery

Deficient orexin transmission produces narcolepsy, as we will describe here, animal models with dysregulated orexin signaling exhibit a narcolepsy-like phenotype. Remarkably, these narcoleptic models have different alterations of the orexinergic circuit; this diversity provides us with the means to have a better understanding of orexin cell physiology and different insights for treating human narcolepsy.

Well-characterized mouse models of narcolepsy have been produced with deletion of the prepro-orexin gene [19], transgenic expression of a toxic protein (ataxin-3) that selectively kills the orexin-producing neurons [25,26], deletion of the OX2R [27] and with deletion of transcription factor O/E3, which regulates neuronal differentiation in the LH [28].

These mice have cataplexy-like behavioral arrests, poor maintenance of wakefulness and fragmented sleep. Cataplexy in mice shares many similarities with human cataplexy. At the onset, these mice abruptly cease vigorous motor activity and often have a staggering gait; at the end of an episode, they rapidly recover normal muscle tone and often resume vigorous activity.

Corresponding to what it has been described in mice, two phenotypic forms of narcolepsy have been reported in canines. Familial narcolepsy has been maintained in lines of Doberman pinschers and Labrador retrievers, while sporadic nonfamilial narcolepsy has been studied to a lesser extent in other small breeds. Both Doberman and Labrador lines are now understood to carry null mutations of the OX2R gene [29], while sporadically narcoleptic dogs, like the majority of narcoleptic patients, are deficient in orexin peptides [30]. The breeding of these animals led to the first successful genetic transmission of narcolepsy and provided the first evidence of orexin signaling deficiency in the physiopathology of narcolepsy [20].

Together, studies of dogs and mice suggest that orexin signaling disruption leads to a spectrum of intermediate narcolepsy phenotypes. This variety of narcolepsy models, with different alterations in the orexinergic circuit, grants us with different approaches for developing new pharmacologic targets for treating narcolepsy.

3. Integrating animal models of narcolepsy into treatment innovation

The process for modern preclinical drug discovery can be divided into two major components: target recognition and target validation. Target identification refers to the process of identifying gene products that, when modulated by a drug, can have a positive impact on disease-state progression. Once a possible gene target is identified, the target validation process begins by determination of protein function and assessment of the viability of the target and drug interaction.

3.1 Target identification

Genes that disrupt the formation of specific neuronal classes may represent important targets for neurodegenerative disorders such as narcolepsy. Analysis of mutations that affect the orexinergic circuit may help identify targets for modulation of the narcolepsy symptoms. Genes that are expressed specifically in the LH may also represent novel targets for that disease. Sequencing the genes from these libraries can be useful for the identification of novel tissue-specific genes that may represent targets for drugs intended to affect a single tissue or cell type. For this purpose, Honda and collaborators performed gene expression profiling in the LH to identify novel genes dysregulated in narcolepsy, as these could be the target of autoimmune attack or modulate orexin gene expression. As expected, they found that orexin was the most downregulated gene, in addition to dynorphin and neuronal activity-regulated pentraxin (NARP). Among many additional candidates, one of the most promising targets was the insulin-like growth factor-binding protein 3 (IGFBP3), which was downregulated in both human and mouse models and co-expressed in orexin neurons [31]. In addition, it was reported that another gene was downregulated in the LH of narcoleptic mice; this was the transcription factor O/E3, which was later reported to be involved in orexin cell physiology [28].

These studies identified plausible molecular targets, through which a drug might mediate therapeutic activities in narcoleptic patients. However, only orexin has been tested as target for narcolepsy treatment. Since a large majority of human narcolepsy patients are ligand deficient, orexin replacement therapy may be a new therapeutic option. This may be effective for both sleepiness and cataplexy. Little is known about the kinetics of orexins, but orexin-A seems to induce longer-lasting behavioral effects, perhaps because of the posttranslational modifications.

3.2 Target validation

Once novel targets are identified, the next step is to certify the molecule as 'adequate' for a treatment modality. Many researchers have begun investigating the potential of orexin supplementation as a treatment for narcolepsy. The value of the narcolepsy model system for drug screening will depend on whether they react to drugs in a way that will be predictive of the action of these drugs in humans. Conservation of drug action between humans and animal models of narcolepsy has been reported.

4. Appraisal of orexin supplementation for treating animal models of narcolepsy

4.1 Orexin peptide restitution

It has been demonstrated that systemic administration of orexin-A produces an increase in activity levels, wake times, reduces sleep fragmentation and has a dose-dependent reduction in cataplexy in canines with narcolepsy [32].

Orexin-A administered systemically has to cross the blood-brain barrier (BBB) by diffusion in order to reach the central nervous system (CNS). Studies have shown that the permeability of orexin-A through the BBB is low, limiting its bioavailability to the CNS when injected peripherally; even more disappointingly, orexin-B does not cross at all the BBB [33,34].

Intracerebroventricular (ICV) replacement of orexin-A has been studied and observed as being effective in narcoleptic mice, but not in OX2R-null dogs [26,28,33]; in mice, it was determined that it produced a normalization of sleep/wake patterns and behavioral arrest episodes (Table 1). However, ICV administration is considered as a dreadfully invasive method, difficult to extrapolate to narcolepsy patients.

A technique that circumvents the technical difficulties of ICV administration and the blockade of the BBB is the intranasal delivery approach. With this alternative, orexin can bypass the BBB with the added benefits of an action onset within minutes and fewer peripheral side effects [35]. The mechanism of action is extracellular, meaning that it circumvents the need of receptors or axonal transport for drug delivery. Unfortunately, this delivery method presented a similar brain concentration, when compared with the intravenous administration [36]. Likewise, when administered to narcoleptic patients, this approach restored only the olfactory dysfunction [37].

Table 1. Rescue of narcoleptic phenotype in animal models.

Method	Narcolepsy model	Technique	Effects	Ref.
Peptide administration	Orexin-deficient dog	IV	Short reversal of cataplexy	[33]
	Orexin-deficient dog	Intrathecal	None	[33]
	Orexin-ataxin-3 mouse	ICV	Restoration of sleep-wake cycle	[26]
	O/E3-null mouse	ICV	Abolishment of REM sleep	[28]
Gene therapy	Orexin-ataxin-3 mouse	Ectopic expression of a prepro-orexin transgene	Short reversal of cataplexy	[26]
	OX2R-null mouse	Rescue of OX2R	Restoration of sleep-wake cycle	[42]

4.2 OXR selective agonists

The predicament is that orexin itself cannot be administered orally, and when administered systemically, it does not cross the BBB because is a very large molecule. Orexins can exert their actions only by direct injection into the cerebral ventricles. Unless the scientific community can discover a method for orexins to cross the BBB, which is unlikely, the future of an orexin-based treatment will depend on the development of synthetic orexin-like drugs.

Orexin-A, which is a 33-residue peptide with two intramolecular disulfide bridges, shows similar potency for both the OX1R and the OX2R, whereas orexin-B, which is a 28-amino acid-linear peptide, showed about a 10-fold selectivity for the OX2R over the OX1R [8]. Given the diverse functioning in the orexinergic system, selective agonists targeted at OX1 or OX2 receptors could provide crucial tools for reversing the narcoleptic phenotype.

The scarce orexin-A permeability through the BBB could be surmounted with the development of orexin peptide analogs, which could be even more specific to OXRs than orexin peptides themselves. It has been determined that the entire orexin protein is not necessary for biological activity and selectivity for the receptors [38-40]. Instead, only the C-terminal of orexin-A and orexin-B is essential for these properties [40].

If an orexin agonist could be found, another advantage would be that it would produce a sort of physiological wakefulness as compared with dexamphetamine and other psychostimulants currently in use. Psychostimulants basically activate a wide variety of neurons in a rather nonselective way and force the brain to wake up, while an orexin receptor agonist would create a more specific physiological wakefulness.

These analogs are thrilling alternatives in the development of orexin agonists for the treatment of narcolepsy.

4.3 Gene therapy

The orexinergic population is exclusively localized in the LH from where they project to the entire brain and spinal cord; in narcolepsy, these neurons are absent. Surrogate neurons in the brain transfected with the prepro-orexin gene or the OXR could alleviate the dysfunction by increasing orexin activity.

Expression of prepro-orexin gene in orexin/ataxin-3 mice has been shown to rescue sleep fragmentation and cataplexy in orexin/ataxin-3 mouse model before the neurodegeneration of

the orexinergic population begins (in the orexin-ataxin-3 mice, the accumulation of polyglutamine cytotoxicity destroys the orexin neurons by the time the mice are 3 weeks of age) [41]. This result means that this method is effective only after constitutive expression of orexin in every cell from conception; unfortunately, such a rescue is not feasible in humans.

In an attempt to rescue the narcoleptic phenotype, another approach was attempted. The new strategy was to induce a focal restoration of OX2R in neurons of the tuberomammillary nucleus and adjacent parts of the LH (Table 1). This rescue of OX2R signaling completely reversed the sleepiness in these mice, but their fragmented sleep was unimproved [42].

These results provide a better understanding of how orexins promote wakefulness; nonetheless, currently, gene therapy for treating narcolepsy is not feasible at the time.

5. Narcolepsy and autoimmunity: the other side of the coin

Contrary to the idea that neurons play only a passive role, many of their products play a role in inflammation; such is the case for neuropeptides and neurotransmitters, as well as the neuronal membrane proteins CD22, CD47, CD200, CX3CL1, intercellular adhesion molecule (ICAM)-5, neural cell adhesion molecule (NCAM), semaphorins and C-type lectins. In addition, neurons express low levels of major histocompatibility complex (MHC) molecules and actively promote T-cell apoptosis via the Fas-Fas ligand pathway (CD95 - CD95L) [43]. Neurons also favor the differentiation of T-regulatory cells, by providing a local microenvironment dominated by transforming growth factor- β 1 [44]. Damaged neurons, however, are less able to maintain this protective shield, allowing further insults. In summary, once primed to antigens in the CNS, the immune-privileged status of the brain and spinal cord is lost despite all efforts to suppress such responses. Currently, the notion that narcolepsy could be secondary to an autoimmune response is gaining great recognition.

Although most narcolepsy cases are sporadic, the risk of narcolepsy in first-degree relatives of patients is 10 - 40 times higher than the general population [1]. The onset is frequently associated with nonspecific environmental factors, such as head trauma, stroke and changes in the sleep-wake cycle [45]. Moreover, recent studies have shown an association with

streptococcal infection [46,47], H1N1 vaccination or infection [47] and exposure to heavy metals, insecticides and weed killers [48].

The disease is also associated with HLA-DQB1*0602 [49,50] and the T-cell receptor alpha locus [51,52]. Furthermore, auto-antibodies against Tribbles homolog 2 (Trib2), a protein expressed in orexin cells, have recently been detected in the sera of recent-onset narcoleptic patients [52-54]. Moreover, narcolepsy is as well related with a threefold lower expression of the purinergic receptor P2RY11, which is involved in immune cell survival [55].

Several investigations identified several molecules that colocalize in orexin-containing neurons, such as dynorphin, NARP [56,57], IGFBP3 [31] and most recently O/E3 [28]. Since these substances are deficient in the LH in rodent narcolepsy models, selective loss of orexin neurons is inferred (Table 2).

These findings strongly suggest that narcolepsy could be secondary to an autoimmune attack against the orexinergic neurons. In humans, more than 20 polymorphic HLA genes encode multiple subtypes of MHC, which present foreign peptides to T-cells during infections, triggering immune responses. In the case of autoimmunity, self-peptides are mistakenly seen as foreign, instigating cell destruction. More than 60 autoimmune diseases affecting virtually every organ are known, almost all associated with specific HLA subtypes. Resting auto-reactive T cells and B cells may have reactivity toward orexinergic cells, having escaped negative selection in the thymus [55].

The concept of molecular mimicry has been hypothesized as a possible mechanism for the induction of autoantibodies [58]. Probably, in narcolepsy, autoantibodies are produced against the orexinergic population because the antigen on a pathologic organism closely resembles the structure of an antigen on the orexin cells. When the immune system induces an antibody to target the pathologic organism for destruction, there is enough overlap that an antigen on the orexin cell is also recognized. This probable mistaken recognition would result in a functional loss of self-tolerance and the destruction of orexin neurons by the host's own immune system.

In this fashion, *streptococcus pyogenes* or group A β -hemolytic streptococcus (GABHS) has been considered a potential environmental trigger for narcolepsy. As pathogens they have developed complex virulence mechanisms to avoid host defenses [59]. Recently, elevated anti-streptococcal antibodies have been reported in patients with recent narcolepsy onset [46].

Another impending candidate is the influenza A virus subtype H1N1; this virus caused the 1918 pandemic flu and the subsequent encephalitis lethargic ((EL) also known as sleepy sickness) described by von Economo, in which the patients presented lesions in the hypothalamus [60]; moreover, this virus has been implicated in the development of narcolepsy following H1N1 vaccination [61,62].

Interestingly, it has been described that 55% of those who had EL phenotype suffered from a preceding pharyngitis. These patients had remarkable similarity to the historical descriptions

of EL (somnia, sleep inversion or insomnia); this report inferred that this phenotype could be a post-infectious autoimmune CNS disorder secondary to GABHS [63]. In addition, it has been suggested that concurrent influenza A and GABHS pharyngo-amygdalitis are a relatively common mixed bacterial-viral infection [64].

Narcolepsy could develop in a susceptible host, which suffers from alterations in the molecules mentioned before (Table 2), which have been infected by a specific GABHS and/or H1N1 serotype, priming the host's immune system and causing an abnormal response toward the orexinergic cells. With this in mind, drugs that prevent the immune response against the orexin population should be developed in order to avert narcolepsy. Unfortunately, attempts to modify immune processes, including use of steroids, plasmapheresis and intravenous immunoglobulin, have been met with limited and short-term success [65-67].

Everything seems to point at that narcolepsy may be an autoimmune disorder. In addition, another way by which environmental factors could influence the orexin cell loss is through epigenetic modifications of the DNA, which can occur early during development or later during the adult life of the individual. The term 'epigenetics' refers to heritable modifications that lead to a change in phenotype without affecting the DNA sequence itself. Epigenetic modifications that might affect the functioning of genes include nucleosome positioning, post-translational histone modifications, the action of small RNAs and DNA methylation.

6. Conclusion

Our understanding of the pathogenesis of narcolepsy continues to advance with the advent of new narcolepsy models and the identification of molecular markers that could trigger the loss of the orexinergic population. We believe that the substantial evidence suggests that narcolepsy is an autoimmune disease that targets the orexin neurons. Almost certainly, in narcolepsy, genetic predispositions as well as environmental triggers play a role in the development of the disease; the identity of these factors has been largely elusive, but we are currently in the path of elucidating them. The identification of the most common genetic and environmental factors that set off autoimmunity may lead to a better understanding of the ensuing pathogenesis and will offer improved therapies and, ultimately, cures.

There is an established pharmacotherapy for symptomatic treatment of narcolepsy; nonetheless, cures for this disease have not yet been found. Consequently, a large research effort is sustained in this field.

Orexin peptide has proven to reverse the narcoleptic phenotype in rodents; however, there is still much ground to cover regarding orexin administration before beginning with clinical trials. One major problem with this approach could be signaling trafficking (also called biased agonism or agonist trafficking of receptor responses), which refers to the ability of each agonist to induce a particular receptor conformation

Table 2. Molecular markers that may induce an autoimmune reaction on orexin cells.

Molecule	Function	Ref.
Tribbles homolog 2	Regulates activation of intracellular signaling pathways	[52-54]
P2RY11	Purinergic G-protein-coupled receptor stimulated by nucleotides	[55]
Orexin	Promotes wakefulness	[8,73]
NARP	Synaptic protein that has been implicated in modulating synaptic transmission	[56]
Dynorphin	Opioid peptide	[57]
IGFBP3	Prolongs the half-life of insulin growth factors and alters their interaction with cell surface receptors	[31]
O/E3	Regulates neuronal differentiation in the hypothalamus	[28]

with a distinct signaling profile (i.e., G-protein activation spectrum). Amplification differences can affect the relative potency of the responses if some of the ligands show partial agonism, like orexin A.

With the advent of gene profiling and other breakthrough techniques, the recognition of new molecules that are involved in orexin cell physiology will eventually allow us to unveil the narcolepsy conundrum and, in due course, develop a successful treatment for narcolepsy.

7. Expert opinion

In the past few decades, the mouse has become the model of choice for experimental sleep medicine. Interestingly, the percentage of mouse genes without any homolog currently detectable in the human genome (and vice versa) has been estimated to be less than 1%, a fact that strengthens the validity of mouse models of human diseases. However, one has to be careful in directly applying data obtained from animal models to human diseases. Using mouse models has its pitfalls; many differences, both obvious and subtle, exist between mice and humans. Those differences are, however, outweighed by the power of the experimental system offered by the mouse.

At the present time, we possess a large number of narcolepsy models that provided the facts to understand the disease; however, the knowledge of the mechanisms by which narcolepsy is established is still minute. Ideally, a narcolepsy model in which a selective autoimmune process against the orexinergic neurons takes place would represent a great advance in the understanding of narcolepsy. This model would also be useful for the development of drugs that prevent the orexinergic cell loss.

Spontaneous autoimmune disorders typically result from polyclonal immune responses against many antigens. The disease has a relatively strong genetic association, and multiple environmental risk factors are involved in triggering its onset. In genetically predisposed individuals, such environmental factors could disrupt tolerance mechanisms that normally protect orexinergic cells from autoimmunity. This may lead to the emergence of orexigenic T cells, attacking orexin-producing cells.

To summarize, we are still in the path of understanding narcolepsy and the mechanisms that promote the specific

orexin cell loss. We believe that the future for narcolepsy drug discovery will rely on the development of a narcolepsy model that presents a degeneration of the orexinergic population secondary to an autoimmune process, which seems to be the case for narcoleptic patients.

In such case, we propose that this narcolepsy model could be designed for two purposes for narcolepsy drug discovery: identification of drugs that specifically reverse the narcolepsy symptoms and development of drugs that prevent the onset of the disease (Figure 1).

In order to address the first principle, we believe that a specific orexin agonist should be developed; a synthetic orexin agonist with an acceptable profile would herald the future of narcolepsy treatment. In rodent models of narcolepsy, orexin peptide administration has proven to reverse the narcoleptic phenotype; however, this is effective only via ICV administration. In the near future, OXR-specific agonists that successfully cross the BBB through systemic or oral administration will represent a novel and more adequate therapy for narcolepsy. In addition, this drug would reverse the entire repertoire of narcolepsy symptoms and would circumvent the appearance of side effects, contrary to current narcolepsy pharmacological treatments in which the combination of multiple drugs is necessary to address all symptoms (Figure 1A) or where one drug (sodium oxybate) is active for all narcoleptic symptoms but presents several adverse reactions.

To attend the second rationale, we consider that, if narcolepsy turns out to be an autoimmune disease, the development of a drug that prevents the degeneration of orexin neurons and the subsequent appearance of symptoms will be the quintessential treatment for narcolepsy.

Although non-antigen-specific, monoclonal antibodies-based immunosuppressive approaches have shown benefits in clinical trials in autoimmune diseases [68], these strategies bear the inherent risk of compromising immunity to infections and cancer.

An approach that shows great promise could be the 'antigen-specific immunopharmacology' (ASI). Traditionally, vaccination refers to prevention of an infectious disease by exposing the immune system to a weakened or dead infectious agent. Alternatively, 'inverse vaccination' (the inhibition of an

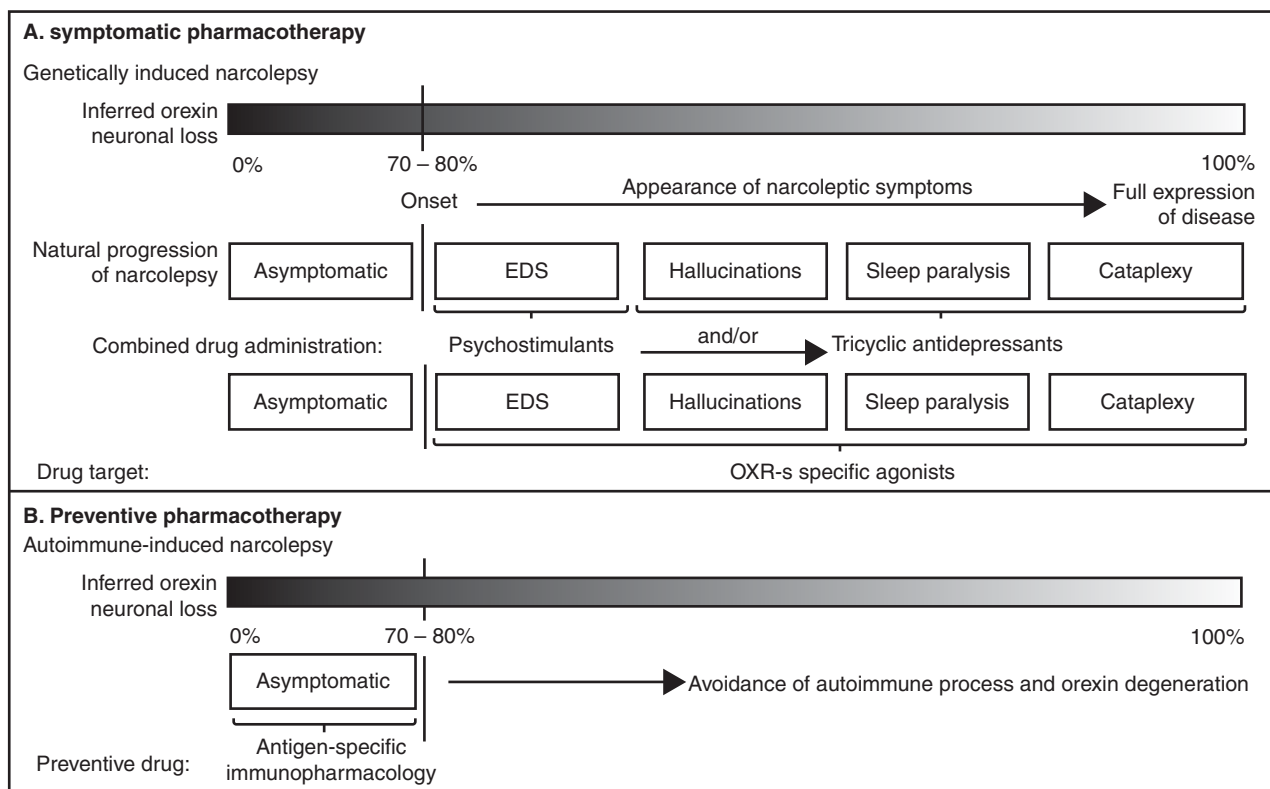


Figure 1. Narcolepsy drug discovery. The appearance of narcolepsy symptoms is thought to sprout after a 70 – 80% loss of the orexinergic population. Usually the first symptom to appear is the excessive daytime sleepiness (EDS). **A.** Current treatment for narcolepsy is pharmacologically based, focused in treating the EDS and the symptoms of dissociated rapid eye movement (REM) sleep (hallucinations, sleep paralysis and cataplexy) via a combination of drugs. OXR-specific agonists are on the verge of being developed; they are expected to address every symptom of narcolepsy. **B.** New targets for drug discovery will arise after the development of an autoimmune narcolepsy model. These novel drugs should prevent the autoimmune process against the orexinergic population and hence prevent the appearance of the narcoleptic symptoms. Once the effect of these drugs is characterized in the autoimmune narcolepsy model, they could be administered in susceptible individuals such as HLA-DQB1*0602 patients and those with high Trib2 sera levels that present EDS. *Even though narcolepsy might arise from genetic alterations that trigger an autoimmune process against the orexinergic cells; at this moment, the genetic alterations that elicit narcolepsy cannot be reversed; on the other side, it is plausible to impede the autoimmune process with deterrent drugs and prevent the degeneration of the orexinergic population.*

immune response) arrests autoimmunity through manipulation of the innate and adaptive arms of the immune system [69]. Current options for treatment autoimmunity such as immunosuppressive drugs (e.g., cyclosporine) and anti-T-cell antibodies (e.g., anti-CD3 antibodies) have shown varying degrees of success in the suppression of β -cell autoimmunity in diabetic mice. However, these strategies require repeated drug administration and may cause nonspecific harmful effects such as interference with normal immune system functions [70,71]. By contrast, ASI makes use of inverse vaccination for a specific autoantigen. Application of ASI has a major advantage of permitting selective inactivation of autoreactive T cells without interfering with normal immune function [72]. This therapy could prevent the degeneration of the orexinergic population and, thus, the appearance of narcolepsy symptoms (Figure 1B). Vaccine development for orexin-specific autoimmune disease will be an ongoing

challenge; however, we still have to determine if the orexin cell loss is secondary to an autoimmune reaction and the molecules involved in such process.

Acknowledgements

We would like to thank D Millán-Aldaco, M Palomero-Rivero and F Pérez-Eugenio for their technical assistance. We would also like to thank doctors and biomedical scientists of the Universidad Nacional Autónoma de México and the DGIP of the Universidad Autónoma de Sinaloa for their support.

Declaration of interest

These authors are supported by UNAM-DGAPA-PAPIIT grant IN225209-3 and by the Universidad Nacional Autónoma de México

Bibliography

Papers of special note have been highlighted as either of interest (●) or of considerable interest (●●) to readers.

1. Nishino S. Clinical and neurobiological aspects of narcolepsy. *Sleep Med* 2007;8:373-99
2. Espana RA, Scammell TE. Sleep neurobiology for the clinician. *Sleep* 2004;27:811-20
3. Saper CB, Scammell TE, Lu J. Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature* 2005;437:1257-63
- **An exhaustive review on the mechanisms that regulate the sleep-wake cycle.**
4. De la Herran-Arita AK, Guerra-Crespo M, Drucker-Colin R. Narcolepsy and orexins: an example of progress in sleep research. *Front Neurol* 2011;2:26
- **A thorough review of the progress in the understanding of the physiopathology of narcolepsy.**
5. Nishino S, Mignot E. Pharmacological aspects of human and canine narcolepsy. *Prog Neurobiol* 1997;52:27-78
6. Aldrich MS, Chervin RD, Malow BA. Value of the multiple sleep latency test (MSLT) for the diagnosis of narcolepsy. *Sleep* 1997;20:620-9
7. Takeuchi T, Miyasita A, Sasaki Y, et al. Isolated sleep paralysis elicited by sleep interruption. *Sleep* 1992;15:217-25
8. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 1998;92:573-85
- **The first description of orexins and its receptors.**
9. Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, et al. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 1998;18:9996-10015
10. Marcus JN, Aschkenasi CJ, Lee CE, et al. Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J Comp Neurol* 2001;435:6-25
11. Estabrooke IV, McCarthy MT, Ko E, et al. Fos expression in orexin neurons varies with behavioral state. *J Neurosci* 2001;21:1656-62
12. Yoshida Y, Fujiki N, Nakajima T, et al. Fluctuation of extracellular hypocretin-1 (orexin A) levels in the rat in relation to the light-dark cycle and sleep-wake activities. *Eur J Neurosci* 2001;14:1075-81
13. Steininger TL, Alam MN, Gong H, et al. Sleep-waking discharge of neurons in the posterior lateral hypothalamus of the albino rat. *Brain Res* 1999;840:138-47
14. Alam MN, Gong H, Alam T, et al. Sleep-waking discharge patterns of neurons recorded in the rat perifornical lateral hypothalamic area. *J Physiol* 2002;538:619-31
15. Hagan JJ, Leslie RA, Patel S, et al. Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:10911-16
16. Bayer L, Eggermann E, Serafin M, et al. Orexins (hypocretins) directly excite tuberomammillary neurons. *Eur J Neurosci* 2001;14:1571-5
17. Brown RE, Sergeeva O, Eriksson KS, et al. Orexin A excites serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the rat. *Neuropharmacology* 2001;40:457-9
18. Bourgin P, Huitron-Resendiz S, Spier AD, et al. Hypocretin-1 modulates rapid eye movement sleep through activation of locus coeruleus neurons. *J Neurosci* 2000;20:7760-5
19. Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, et al. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 1999;98:437-51
- **A breakthrough study demonstrating the importance of orexins in the regulation of the sleep-wake cycle.**
20. Lin L, Faraco J, Kadotani H, et al. The REM sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor gene. *Cell* 1999;98:365-76
- **The first study to associate alterations in the orexinergic circuit with narcolepsy.**
21. Nishino S, Ripley B, Overeem S, et al. Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *Lancet* 2000;355:39-40
- **An original study relating orexin deficiency and human narcolepsy.**
22. Mignot E, Lammers GJ, Ripley B, et al. The role of cerebrospinal fluid hypocretin measurement in the diagnosis of narcolepsy and other hypersomnias. *Arch Neurol* 2002;59:1553-62
23. Peyron C, Faraco J, Rogers W, et al. A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat Med* 2000;6:991-7
- **An original study relating orexin cell loss and human narcolepsy.**
24. Thannickal TC, Moore RY, Nienhuis R, et al. Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron* 2000;27:469-74
- **An original study relating orexin cell loss and human narcolepsy.**
25. Beuckmann CT, Sinton CM, Williams SC, et al. Expression of a poly-glutamine-ataxin-3 transgene in orexin neurons induces narcolepsy-cataplexy in the rat. *J Neurosci* 2004;24:4469-77
26. Mieda M, Willie JT, Hara J, et al. Orexin peptides prevent cataplexy and improve wakefulness in an orexin neuron-ablated model of narcolepsy in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:4649-54
27. Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, et al. Distinct narcolepsy syndromes in Orexin receptor-2 and Orexin null mice: molecular genetic dissection of Non-REM and REM sleep regulatory processes. *Neuron* 2003;38:715-30
28. De la Herran-Arita AK, Zomosa-Signoret VC, Millan-Aldaco DA, et al. Aspects of the narcolepsy-cataplexy syndrome in O/E3 (Ebf2)-null mutant mice. *Neuroscience* 2011;183:134-43
29. Hungs J, Fan L, Lin X, et al. Identification and functional analysis of mutations in the hypocretin (orexin) genes of narcoleptic canines. *Genome Res* 2001;11:531-9
30. Ripley N, Fujiki M, Okura E, et al. Hypocretin levels in sporadic and familial cases of canine narcolepsy. *Neurobiol Dis* 2001;8:525-34
31. Honda M, Eriksson KS, Zhang S, et al. IGFBP3 colocalizes with and regulates hypocretin (orexin). *PLoS ONE* 2009;4:e4254
- **A study characterizing downregulated molecules in the lateral hypothalamus of narcolepsy patients and narcoleptic mice.**

Expert Opin. Drug Discov. Downloaded from informahealthcare.com by Instituto de Biologia on 01/12/12 For personal use only.

32. John J, Wu MF, Siegel JM. Systemic administration of hypocretin-1 reduces cataplexy and normalizes sleep and waking durations in narcoleptic dogs. *Sleep Res Online* 2000;3:23-8
33. Fujiki N, Yoshida Y, Ripley B, et al. Effects of IV and ICV hypocretin-1 (orexin A) in hypocretin receptor-2 gene mutated narcoleptic dogs and IV hypocretin-1 replacement therapy in a hypocretin-ligand-deficient narcoleptic dog. *Sleep* 2003;26:953-9
34. Kastin AJ, Akerstrom V. Orexin A but not orexin B rapidly enters brain from blood by simple diffusion. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;289:219-23
35. Hanson LR, Martinez PM, Taheri M, et al. Intranasal administration of hypocretin 1 (orexin A) bypasses the blood-brain barrier and target the brain: a new strategy for the treatment of narcolepsy. *Drug Deliv Technol* 2004;4:1-10
36. Dhuria SV, Hanson LR, Frey WH 2nd. Intranasal drug targeting of hypocretin-1 (orexin-A) to the central nervous system. *J Pharm Sci* 2009;98:2501-15
37. Baier PC, Weinhold SL, Huth V, et al. Olfactory dysfunction in patients with narcolepsy with cataplexy is restored by intranasal Orexin A (Hypocretin-1). *Brain* 2008;131:2734-41
38. Asahi S, Egashira S, Matsuda M, et al. Development of an orexin-2 receptor selective agonist, [Ala(11), D-Leu(15)] orexin-B. *Bioorg Med Chem Lett* 2003;13:111-13
39. Zeitler JM, Nishino S, Mignot E. The neurobiology of hypocretins (orexins), narcolepsy and related therapeutic interventions. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27:368-74
40. Lang M, Soll RM, Durrenberger F, et al. Structure-activity studies of orexin a and orexin B at the human orexin 1 and orexin 2 receptors led to orexin 2 receptor selective and orexin 1 receptor preferring ligands. *J Med Chem* 2004;47:1153-60
41. Liu M, Blanco-Centurion C, Konadhode R, et al. Orexin gene transfer into zona incerta neurons suppresses muscle paralysis in narcoleptic mice. *J Neurosci* 2011;31:6028-40
42. Mochizuki T, Arrigoni E, Marcus JN, et al. Orexin receptor 2 expression in the posterior hypothalamus rescues sleepiness in narcoleptic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:4471-6
43. Nishino S, Okura M, Mignot E. Narcolepsy: Genetic predisposition and neuropharmacological mechanisms. *Sleep Med Rev* 2000;4:57-99
44. Tian L, Rauvala H, Gahmberg CG. Neuronal regulation of immune responses in the central nervous system. *Trends Immunol* 2009;30:91-9
45. Mignot E. Genetic and familial aspects of narcolepsy. *Neurology* 1998;50:S16-22
- **An exhaustive review of genetic predisposition in narcolepsy.**
46. Aran A, Lin L, Nevsimalova S, et al. Elevated anti-streptococcal antibodies in patients with recent narcolepsy onset. *Sleep* 2009;32:979-83
47. Longstreth WT Jr, Ton TG, Koepsell TD. Narcolepsy and streptococcal infections. *Sleep* 2009;32:1548
48. Ton TG, Longstreth WT Jr, Koepsell TD. Environmental toxins and risk of narcolepsy among people with HLA DQB1*0602. *Environ Res* 2010;110:565-70
49. Mignot E, Lin L, Rogers W, et al. Complex HLA-DR and -DQ interactions confer risk of narcolepsy-cataplexy in three ethnic groups. *Am J Hum Genet* 2001;68:686-99
50. Hor H, Kotalik Z, Dauvilliers Y, et al. Genome-wide association study identifies new HLA class II haplotypes strongly protective against narcolepsy. *Nat Genet* 2010;42:786-9
51. Hallmayer J, Faraco J, Lin L, et al. Narcolepsy is strongly associated with the T-cell receptor alpha locus. *Nat Genet* 2009;41:708-11
52. Cvetkovic-Lopes V, Bayer L, Dorsaz S, et al. Elevated tribbles homolog 2-specific antibody levels in narcolepsy patients. *J Clin Invest* 2010;120:713-19
53. Kawashima M, Lin L, Tanaka S, et al. Anti-tribbles homolog 2 (TRIB2) autoantibodies in narcolepsy are associated with recent onset of cataplexy. *Sleep* 2010;33:869-74
54. Toyoda H, Tanaka S, Miyagawa T, et al. Anti-Tribbles homolog 2 autoantibodies in Japanese patients with narcolepsy. *Sleep* 2010;33:875-8
55. Kornum BR, Kawashima M, Faraco J, et al. Common variants in P2RY11 are associated with narcolepsy. *Nat Genet* 2011;43:66-71
56. Blouin AM, Thannickal TC, Worley PF, et al. Narp immunostaining of human hypocretin (orexin) neurons: loss in narcolepsy. *Neurology* 2005;65:1189-92
57. Crocker A, Espana RA, Papadopoulou M, et al. Concomitant loss of dynorphin, NARP, and orexin in narcolepsy. *Neurology* 2005;65:1184-8
58. Rose NR. The role of infection in the pathogenesis of autoimmune disease. *Semin Immunol* 1998;10:5-13
59. Snider LA, Swedo SE. Post-streptococcal autoimmune disorders of the central nervous system. *Curr Opin Neurol* 2003;16:359-65
60. von Economo C. Encephalitis lethargica. Its sequelae and treatment. Translated by Newman KO. Oxford University Press; London: 1931
- **A classic work describing the onset of narcolepsy after an H1N1 pandemic.**
61. Dauvilliers Y, Montplaisir J, Cochen V, et al. Post-H1N1 narcolepsy-cataplexy. *Sleep* 2010;33:1428-30
- **A work demonstrating the association between H1N1 exposure and narcolepsy.**
62. Han F, Lin L, Warby SC, et al. Narcolepsy onset is seasonal and increased following the 2009 H1N1 pandemic in China. *Ann Neurol* 2011;70:410-17
- **A work demonstrating the association between H1N1 exposure and narcolepsy.**
63. Dale RC, Church AJ, Surtees RA, et al. Encephalitis lethargica syndrome: 20 new cases and evidence of basal ganglia autoimmunity. *Brain* 2004;127:21-33
64. Brook I, Gober AE. Concurrent influenza A and group A beta-hemolytic streptococcal pharyngotonsillitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2008;117:310-12
65. Plazzi G, Poli F, Franceschini C, et al. Intravenous high-dose immunoglobulin treatment in recent onset childhood narcolepsy with cataplexy. *J Neurol* 2008;255:1549-54
66. Valko PO, Khatami R, Baumann CR, et al. No persistent effect of intravenous immunoglobulins in patients with

Models for narcolepsy with cataplexy drug discovery

- narcolepsy with cataplexy. *J Neurol* 2008;255:1900-3
67. Knudsen S, Mikkelsen JD, Bang B, et al. Intravenous immunoglobulin treatment and screening for hypocretin neuron-specific autoantibodies in recent onset childhood narcolepsy with cataplexy. *Neuropediatrics* 2010;41:217-22
68. Kaufman A, Herold KC. Anti-CD3 mAbs for treatment of type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2009;25:302-6
69. Steinman L. Inverse vaccination, the opposite of Jenner's concept, for therapy of autoimmunity. *J Intern Med* 2010;267:441-51
70. Bougneres PF, Landais P, Boisson C, et al. Limited duration of remission of insulin dependency in children with recent overt type I diabetes treated with low-dose cyclosporin. *Diabetes* 1990;39:1264-72
71. Chatenoud L, Thervet E, Primo J, et al. Anti-CD3 antibody induces long-term remission of overt autoimmunity in nonobese diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:123-7
72. Wang B, Tisch R. Parameters influencing antigen-specific immunotherapy for Type 1 diabetes. *Immunol Res* 2008;42:246-58
73. de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, et al. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:322-7
- **The first description of orexins.**

Affiliation

Alberto K. De la Herrán-Arita &

René Drucker-Colín[†]

[†]Author for correspondence

Departamento de Neuropatología Molecular,

Instituto de Fisiología Celular,

Universidad Nacional Autónoma de México,

Apdo. Postal 70-600,04510,

México D.F, México

E-mail: drucker@servidor.unam.mx

REFERENCIAS

Aldrich, M.S., Chervin, R.D., Malow, B.A. (1997) Value of the multiple sleep latency test (MSLT) for the diagnosis of narcolepsy. *Sleep*, 20, 620-629.

Aldrich, M.S. (1998) Narcolepsy. *Neurology*, 42, 34-43.

American Academy of Sleep Medicine. International Classification of Sleep Disorders: Diagnostic and Coding Manual, Revised. Rochester, Minn: American Sleep Academy of Sleep Medicine; 2005.

Anic-Labat, S., Guilleminault, C., Kraemer, H.C., Meehan, J., Arrigoni, J., Mignot, E. (1999) Validation of a cataplexy questionnaire in 983 sleep disorders patients. *Sleep*, 22, 77-87.

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

Baghdoyan, H.A., Rodrigo-Angulo, M.L., McCarley, R.W., Hobson, J.A. (1984) Sitespecific enhancement and suppression of desynchronized sleep signs following cholinergic stimulation of three brainstem regions. *Brain Res*, 306, 39-52.

Baghdoyan, H.A., Rodrigo-Angulo, M.L., McCarley, R.W., Hobson, J.A. (1987) A neuroanatomical gradient in the pontine tegmentum for the cholinceptive induction of desynchronized sleep signs. *Brain Res*, 414, 245-261.

Baker, T.L., Dement, W.C. (1985) Canine narcolepsy-cataplexy syndrome: evidence for an inherited monoaminergic-cholinergic imbalance. In: Brain mechanisms of sleep (McGinty, D.J., Drucker-Colin, R., Morrison, A., Parmegiani, P.) New York: Raven Press, 199-233.

Bally-Cuif, L., Dubois, L., Vincent, A. (1998) Molecular cloning of Zcoe2, the zebrafish homolog of Xenopus Xcoe2 and mouse EBF-2, and its expression during primary neurogenesis. *Mech Dev*, 77, 85-90.

Batini, C., Magni, F., Palestini, M., Rossi, G.F., Zanchetti, A. (1959) Neural mechanisms underlying the enduring EEG and behavioral activation in the midpontine pretrigeminal cat. *Arch Ital Biol*, 97, 13-25.

Berger, H. (1929) Über das elektrenkephalogramm des Menschen. *Arch f Psychiat*, 87, 527-536.

Beuckmann, C.T., Sinton, C.M., Williams, S.C., Richardson, J.A., Hammer, R.E., Sakurai, T., Yanagisawa, M. (2004) Expression of a poly-glutamine-ataxin-3 transgene in orexin neurons induces narcolepsy-cataplexy in the rat. *J Neurosci*, 24, 4469-4477.

Bier, M.J., McCarley, R.W. (1994) REM-enhancing effects of the adrenergic antagonist idazoxan infused into the medial pontine reticular formation of the freely moving cat. *Brain Res*, 634, 333-338.

-
- Boehme, R., Baker, T., Mefford, I., Barchas, J., Dement, W. C., Ciaranello, R. (1984) Narcolepsy: cholinergic receptor changes in an animal model. *Life Sci*, 34, 1825–1828.
- Bowersox, S., Kilduff, T., Faul, K., Demerit, W. C., Ciaranerlo, R. D. (1987) Brain dopamine receptor levels elevated in canine narcolepsy. *Brain Res*, 402, 4448.
- Bremer, F. (1937) L'activité cérébrale au cours du sommeil et de la narcose. Contribution à l'étude du mécanisme du sommeil. *Bull Acad roy Méd Belg*, 4, 68-86.
- Broberger, C., De Lecea, L., Sutcliffe, J.G., Hökfelt, T. (1998) Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *J Comp Neurol*, 402, 460-674.
- Broughton, R., Valley, V., Aguirre, M., Roberts, J., Suwalski, W., Dunham, W. (1986) Excessive daytime sleepiness and the pathophysiology of narcolepsy-cataplexy: a laboratory perspective. *Sleep*, 9, 205–15.
- Camacho-Evangelista, A., Reinoso-Suárez, F. (1964) Activating and synchronizing centers in cat brain. *Science*, 146, 268-269.
- Chemelli, R.M., Willie, J.T., Sinton, C.M., Elmquist, J.K., Scammell, T., Lee, C., Richardson, J.A., Williams, S.C., Xiong, Y., Kisanuki, Y., Fitch, T.E., Nakazato, M., Hammer, R.E., Saper, C.B., Yanagisawa, M. (1999) Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell*, 98, 437-451.
- Chemelli, R.M., Sinton, C.M., Yanagisawa, M. (2000) Polysomnographic characterization of Orexin-2 receptor knockout mice. *Sleep*, 296-297.
- Chung, S.H., Marzban, H., Croci, L., Consalez, G.G., Hawkes, R. (2008) Purkinje cell subtype specification in the cerebellar cortex: early B-cell factor 2 acts to repress the zebrin II-positive Purkinje cell phenotype. *Neuroscience*, 153, 721-732.
- Cirelli, C., Tononi, G. (2004) Locus coeruleus control of state-dependent gene expression. *J Neurosci*, 24, 5410-5419.
- Corradi, A., Croci, L., Broccoli, V., Zecchini, S., Previtali, S., Wurst, W., Amadio, S., Maggi, R., Quattrini, A., Consalez, G.G. (2003) Hypogonadotropic hypogonadism and peripheral neuropathy in Ebf2-null mice. *Development*, 130, 401-410.
- Couve, E., Cabello, J.F., Krsulovic, J., Roncagliolo, M. (1997) Binding of microtubules to transitional elements in oligodendrocytes of the myelin mutant taiep rat. *J Neurosci Res*, 47, 573–581.
- Croci, L., Chung, S.H., Masserdotti, G., Gianola, S., Bizzoca, A., Gennarini, G., Corradi, A., Rossi, F., Hawkes, R., Consalez, G.G. (2006) A key role for the HLH transcription factor EBF2COE2, O/E-3 in Purkinje neuron migration and cerebellar cortical topography. *Development*, 133, 2719-2729.

-
- Czeisler, C.A., Duffy, J.F., Shanahan, T.L., Brown, E.N., Mitchell, J.F., Rimmer, D.W., Ronda, J.M., Silva, E.J., Allan, J.S., Emens, J.S., Dijk, D.J., Kronauer, R.E. (1999) Stability, precision, and near-24-hour period of the human circadian pacemaker. *Science*, 284, 2177-2181.
- Date, Y., Ueta, Y., Yamashita, H., Yamaguchi, H., Matsukura, S., Kangawa, K., Sakurai, T., Yanagisawa, M., Nakazato, M. (1999) Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 748-753.
- Dauvilliers, Y., Montplaisir, J., Molinari, N., Carlander, B., Ondze, B., Besset, Billiard, M. (2001) Age at onset of narcolepsy in two large populations of patients in France and Quebec. *Neurology*, 57, 2029-2033.
- De la Roza, C., Reinoso-Suárez, F. (2000) Ultrastructure and synaptic organization of axon terminals of the ventral part of the oral pontine reticular nucleus. *J Comp Neurol*, 418, 93-105.
- de Lecea, L., Kilduff, T.S., Peyron, C., Gao, X., Foye, P.E., Danielson, P.E., Fukuhara, C., Battenberg, E.L., Gautvik, V.T., Bartlett, F.S. 2nd, Frankel, W.N., van den Pol, A.N., Bloom, F.E., Gautvik, K.M., Sutcliffe, J.G. (1998) The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 322-327.
- Dement, W., Kleitman, N. (1957) The relation of eye movements during sleep to dream activity: an objective method for the study of dreaming. *J Exp Psychol*, 53, 339-346.
- Duncan, I.D., Lunn, K.F., Holmgren, B., Urbá-Holmgren, R., Brignolo-Holmes, L. (1992) The taiep rat: a myelin mutant with an associated oligodendrocyte microtubular defect. *J Neurocytol*, 21, 870-884.
- Eguibar, J.R., Cortés Mdel, C. (2010) The myelin mutant taiep as a model for absence crisis. *Gac Med Mex*, 146, 11-8.
- Fisher, F. (1878) Epileptoide schlafzustände. *Arch für Psychiatl*, 8, 200-203.
- Garcia-Dominguez, M., Poquet, C., Garel, S., Charnay, P. (2003) Ebf gene function is required for coupling neuronal differentiation and cell cycle exit. *Development*, 130, 6013-6025.
- Garel, S., Marin, F., Mattei, M.G., Vesque, C., Vincent, A., Charnay, P. (1997) Family of Ebf/Olf-1-related genes potentially involved in neuronal differentiation and regional specification in the central nervous system. *Dev Dyn*, 210, 191-205.
- Garzón, M., De Andrés, I., Reinoso-Suárez, F. (1996) Sleep patterning after cholinergic and glutamatergic stimulation in the ventral oral pontine tegmentum. *J Sleep Res*, 5 (suppl 1), 72.
- Gélineau, J. (1880) De la narcolepsie. *Gazette des hôpitaux*. 53, 626-628.
- Gélineau, J. (1881) De la narcolepsie. *Surgères, Charente-Inférieure: Imprimerie de Surgères*, 64, 1881.

Gerashchenko, D., Murillo-Rodriguez, E., Lin, L., Xu, M., Hallett, L., Nishino, S., Mignot, E., Shiromani, P.J. (2003) Relationship between CSF hypocretin levels and hypocretin neuronal loss. *Exp Neurol*, 184, 1010-1016.

Guilleminault, C., Demerit, W. C., Passouant, P. (1976) Narcolepsy (Advances in Sleep Research Vol. 3). Spectrum Publications: New York.

Guilleminault, C., Anognos, A. (2005): Narcolepsy. In: Principles and Practice of Sleep Medicine. (Kryger, M.H., Roth, T., Dement, W.C.) Philadelphia: Elsevier Saunders, 676-686.

Hagan, J.J., Leslie, R.A., Patel, S., Evans, M.L., Wattam, T.A., Holmes, S., Benham, C.D., Taylor, S.G., Routledge, C., Hemmati, P., Munton, R.P., Ashmeade, T.E., Shah, A.S., Hatcher, J.P., Hatcher, P.D., Jones, D.N., Smith, M.I., Piper, D.C., Hunter, A.J., Porter, R.A., Upton, N. (1999) Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 10911-10916.

Hara, J., Beuckmann, C.T., Nambu, T., Willie, J.T., Chemelli, R.M., Sinton, C.M., Sugiyama, F., Yagami, K., Goto, K., Yanagisawa, M., Sakurai, T. (2001) Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron*, 30, 345-354.

Hess, W.R. (1931) Le sommeil. *C R Soc Biol Paris*, 107, 1333-1360.

Heinemeyer, T., Wingender, E., Reuter, I., Hermjakob, H., Kel, A.E., Kel, O.V., Ignatieva, E.V., Ananko, E.A., Podkolodnaya, O.A., Kolpakov, F.A., Podkolodny, N.L., Kolchanov, N.A. (1998) Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic Acids Res*, 26, 362-7.

Hishikawa, Y., Nan'no, H., Tachibana, M. (1968) The nature of sleep attack and other symptoms of narcolepsy. *Electroencephalogr. Clin Neurophysiol*, 24, 1-10.

Hobson, J.A., Lydic, R., Baghdoyan, H.A. (1986) Evolving concepts of sleep cycle generation: From brain centers to neuronal populations. *The behavioral and brain sciences*, 9, 371-448.

Holmgren, B., Urbá-Holmgren, R., Riboni, L., Vega-SaenzdeMiera, E.C. (1989) Sprague Dawley rat mutant with tremor, ataxia, tonic immobility episodes, epilepsy and paralysis. *Lab Anim Sci*, 39, 226-228.

Honda, Y., Asake, A., Tanaka, Y., Jujui, T. (1983) Discrimination of narcolepsy by using genetic markers and HLA. *Sleep Res*, 12, 254.

Honda, M., Eriksson, K.S., Zhang, S., Tanaka, S., Lin, L., Salehi, A., Hesla, P.E., Maehlen, J., Gaus, S.E., Yanagisawa, M., Sakurai, T., Taheri, S., Tsuchiya, K., Honda, Y., Mignot, E. (2009), IGFBP3 colocalizes with and regulates hypocretin (orexin). *PLoS One* 4:e4254.

Horner, R.L., Kubin, L. (1999) Pontine carbachol elicits multiple rapid eye movement sleep-like neural events in urethane-anaesthetized rats. *Neuroscience*, 93, 215-226.

Huang, E.J., Reichardt, L.F. (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*, 24, 677-736.

Hubbard, T.J., Aken, B.L., Ayling, S., Ballester, B., Beal, K., Bragin, E., Brent, S., Chen, Y., Clapham, P., Clarke, L., Coates, G., Fairley, S., Fitzgerald, S., Fernandez-Banet, J., Gordon, L., Graf, S., Haider, S., Hammond, M., Holland, R., Howe, K., Jenkinson, A., Johnson, N., Kahari, A., Keefe, D., Keenan, S., Kinsella, R., Kokocinski, F., Kulesha, E., Lawson, D., Longden, I., Megy, K., Meidl, P., Overduin, B., Parker, A., Pritchard, B., Rios, D., Schuster, M., Slater, G., Smedley, D., Spooner, W., Spudich, G., Trevanion, S., Vilella, A., Vogel, J., White, S., Wilder, S., Zadissa, A., Birney, E., Cunningham, F., Curwen, V., Durbin, R., Fernandez-Suarez, X.M., Herrero, J., Kasprzyk, A., Proctor, G., Smith, J., Searle, S., Flicek, P. (2009), Ensembl 2009. *Nucleic Acids Res*, 37, D690-7.

Iwakiri, H., Matsuyama, K., Mori, S. (1993) Extracellular levels of serotonin in the medial pontine reticular formation in relation to sleep-wake cycle in cats: A microdialysis study. *Neurosci Res*, 18, 157-170.

Jimenez, M.A., Akerblad, P., Sigvardsson, M., Rosen, E.D. (2007) Critical role for Ebf1 and Ebf2 in the adipogenic transcriptional cascade. *Mol Cell Biol*, 27, 743-757.

John, J., Wu, M.F., Boehmer, L.N., Siegel, J.M. (2004) Cataplexy-active neurons in the hypothalamus: implications for the role of histamine in sleep and waking behavior. *Neuron*, 42, 619-634.

Jouvet, M. (1961) Telencephalic and rhombencephalic sleep in the cat. In: Wolstenholme GEW (*The nature of sleep*) O'Connor, 188-206.

Kaitin, K. I., Kilduff, T. S., Dement, W. C. (1986) Sleep fragmentation in genetically narcoleptic dogs. *Sleep*, 9, 116-119.

Kieslinger, M., Folberth, S., Dobрева, G., Dorn, T., Croci, L., Erben, R., Consalez, G.G., Grosschedl, R. (2005) EBF2 regulates osteoblast-dependent differentiation of osteoclasts. *Dev Cell*, 9, 757-767.

Kisanuki, Y.Y., Chemelli, R.M., Sinton, C.M., Williams, S.C., Richardson, J.A., Hammer, R.E., Yanagisawa, M. (2000) The role of orexin receptor Type-1 (OX1R) in the regulation of sleep. *Sleep*, 23(Suppl. 2):A91.

Kiyashchenko, L.I., Mileykovskiy, B.Y., Maidment, N., Lam, H.A., Wu, M.F., John, J., Peever, J., Siegel, J.M. (2002) Release of hypocretin (orexin) during waking and sleep states. *J Neurosci*, 22, 5282-5286.

Knecht, C. D., Oliver, J., E., Redding, R., Selcer, R., Johnson, G. (1973) Narcolepsy in a dog and a cat. *J Am Vet Med Assoc*, 162, 1052-1053.

Kohlmeier, K.A., Burns, J., Reiner, P.B., Semba, K. (2002) Substance P in the descending cholinergic projection to REM sleep-induction regions of the rat pontine reticular formation: Anatomical and electrophysiological analyses. *Eur J Neurosci*, 15, 176-196.

Konopka, R.J., Benzer, S. (1971) Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68, 2112-2116.

-
- Kornum, B.R., Kawashima, M., Faraco, J., Lin, L., Rico, T.J., Hesselson, S., Axtell, R.C., Kuipers, H., Weiner, K., Hamacher, A., Kassack, M.U., Han, F., Knudsen, S., Li, J., Dong, X., Winkelmann, J., Plazzi, G., Nevsimalova, S., Hong, S.C., Honda, Y., Honda, M., Högl, B., Ton, T.G., Montplaisir, J., Bourgin, P., Kemlink, D., Huang, Y.S., Warby, S., Einen, M., Eshragh, J.L., Miyagawa, T., Desautels, A., Ruppert, E., Hesla, P.E., Poli, F., Pizza, F., Frauscher, B., Jeong, J.H., Lee, S.P., Strohl, K.P., Longstreth, W.T. Jr., Kvale, M., Dobrovolska, M., Ohayon, M.M., Nepom, G.T., Wichmann, H.E., Rouleau, G.A., Gieger, C., Levinson, D.F., Gejman, P.V., Meitinger, T., Peppard, P., Young, T., Jennum, P., Steinman, L., Tokunaga, K., Kwok, P.Y., Risch, N., Hallmayer, J., Mignot, E. (2011) Common variants in P2RY11 are associated with narcolepsy. *Nat Genet*, 43, 66-71.
- Krieger, D.T., Perlow, M.J., Gibson, M.J., Davies, T.F., Zimmerman, E.A., Ferin, M., Charlton, H.M. (1982) Brain grafts reverse hypogonadism of gonadotropin releasing hormone deficiency. *Nature*, 298, 468-471.
- Krsulovic, J., Couve, E., Roncagliolo, M. (1999) Dysmyelination, demyelination and reactive astrogliosis in the optic nerve of the taiep rat. *Biol Res*, 32, 253-262.
- Kshatri, A.M., Baghdoyan, H.A., Lydic, R. (1998) Cholinomimetics, but not morphine, increase antinociceptive behavior from pontine reticular regions regulating rapid-eye-movement sleep. *Sleep*, 21, 677-685.
- Kushida, C.A., Baker, T.L., Dement, W.C. (1985) Electroencephalographic correlates of cataplectic attacks in narcoleptic canines. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 61, 61-71.
- Latchman, D.S. (1997) "Transcription factors: an overview". *Int. J. Biochem. Cell Biol*, 29, 1305-1312.
- Lee, T.I., Young, R.A. (2000) Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet*, 34, 77-137.
- Lin, L., Faraco, J., Li, R., Kadotani, H., Rogers, W., Lin, X., Qiu, X., de Jong, P.J., Nishino, S., Mignot, E. (1999) The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell*, 98, 365-376.
- Loomis, A.L., Harvey E.N., Hobart, G.A. (1937) III Cerebral states during sleep, as studied by human brain potentials. *J Exp Psychol*, 21, 127-144.
- Löwenfeld, L. (1902) Uber Narkolepsie. *Munch Med Wochenschr*, 49, 1041-1045.
- Lucas, E.A., Foutz, A.S., Dement, W.C., Mitler, M.M. (1979) Sleep cycle organization in narcoleptic and normal dogs. *Physiology & Behavior*, 23, 4737-4743.
- Lugaresi, E., Montagna, P., Gambetti, P. (1993) The thalamus regulates the sleepwake cycle and autonomic and endocrine functions. In: *Thalamic networks for relay and modulation.* (Minciacchi, D., Molinari, M., Macchi, G., Jones, E.G.) Oxford: Pergamon Press, 395-400.
- Lunn, K.F., Clayton, M.K., Duncan, I.D. (1997) The temporal progression of the myelination defect in the taiep rat. *J Neurocytol* 26, 267-281.

-
- Malgaretti, N., Pozzoli, O., Bosetti, A., Corradi, A., Ciarmatori, S., Panigada, M., Bianchi, M.E., Martinez, S., Consalez, G.G. (1997) Mmot1, a new helix-loop-helix transcription factor gene displaying a sharp expression boundary in the embryonic mouse brain. *J Biol Chem*, 272, 17632-17639.
- Malik, S., Boeve, B.F., Krahn, L.E., Silber, M.H. (2001) Narcolepsy associated with other central nervous system disorders. *Neurology*, 57, 539-541.
- Marini, G., Mancina, M. (1993) Thalamic nuclei and control of sleep related events. En: Thalamic networks for relay and modulation (Minciacchi, D., Molinari, M., Macchi, G., Jones, E.G.) *Oxford: Pergamon Press*, 401-408.
- Martínez-Rodríguez, J.E., Lin, L., Iranzo, A., Genis, D., Martí, M.J., Santamaria, J., Mignot, E. (2003) Decreased hypocretin-1 (Orexin-A) levels in the cerebrospinal fluid of patients with myotonic dystrophy and excessive daytime sleepiness. *Sleep*, 26, 287-290.
- Matsuki, K., Grumet, F. C., Lin, X., Guilleminault, C., Dement, W. C. (1992) DQ rather than DR gene marks susceptibility to narcolepsy. *Lancet*, 339, 1052.
- Mefford, I., Foutz, A., McNerney, V., Mitler, M., Dement, W. (1982) Distribution of norepinephrine, epinephrine, dopamine, serotonin, 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid, homovanillic acid and 5-hydroxyindole-3-acetic acid in dog brain. *Brain Res*, 236, 339-349.
- Mieda, M., Willie, J.T., Hara, J., Sinton, C.M., Sakurai, T., Yanagisawa, M. (2004) Orexin peptides prevent cataplexy and improve wakefulness in an orexin neuron-ablated model of narcolepsy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 4649-4654.
- Mignot, E., Lin, X., Arrigoni, J., Macaubas, C., Olive, F., Hallmeyer, J., Undershill, P., Guilleminault, C., Demerit, W. C., Grumet, F. C. (1994) DQB1 *0602 and DQA1 *0102(DQ1) are better markers than DR2 for narcolepsy in caucasian and black Americans. *Sleep*, 17, S61-S67
- Mignot, E. (1998) Genetic and familial aspects of narcolepsy. *Neurology*, 50, S16-22.
- Mignot, E., Lammers, G.J., Ripley, B., Okun, M., Nevsimalova, S., Overeem, S., Vankova, J., Black, J., Harsh, J., Bassetti, C., Schrader, H., Nishino, S. (2002) The role of cerebrospinalfluid hypocretin measurement in the diagnosis of narcolepsy and other hypersomnias. *Arch Neurol*, 59, 1553-1562.
- Mignot, E., Lin, L., Rogers, W., Honda, Y., Qiu, X., Lin, X., Okun, M., Hohjoh, H., Miki, T., Hsu, S., Leffell, M., Grumet, F., Fernandez-Vina, M., Honda, M., Risch, N. (2001) Complex HLA-DR and -DQ interactions confer risk of narcolepsy-cataplexy in three ethnic groups. *Am J Hum Genet* 68, 686-699.
- Mitler, M., Boysen, M., Campbell, L., Dement, W. C. (1974) Narcolepsy-Cataplexy in a female dog. *Exp Neurol*, 45, 332-340.
- Mitler, M., Demerit, W. C. (1974) Cataplexy-like behavior in cats after microinjection of carbachol in pontine reticular formation. *Brain Res*, 68, 335-343.
-

-
- Moriguchi, T., Sakurai, T., Takahashi, S., Goto, K., Yamamoto, M. (2002) The human prepro-orexin gene regulatory region that activates gene expression in the lateral region and represses it in the medial regions of the hypothalamus. *J Biol Chem*, 277, 16985-16992
- Morrison, R.S., Dempsey, E.W. (1942) A study of thalamo-cortical relations. *Am J Physiol*, 135, 282-292.
- Moruzzi, G., Magoun, H.W. (1949) Brainstem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1, 455-473.
- Nambu, T., Sakurai, T., Mizukami, K., Hosoya, Y., Yanagisawa, M., Goto, K. (1999) Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res.*, 827, 243-260.
- Nauta, W.J.H. (1946) Hypothalamic regulation of sleep in rats. An experimental study. *J Neurophysiol*, 9, 285-316.
- Nicolelis, M.A., Fanselow, E.E. (2002) Thalamocortical [correction of Thalamocortical] optimization of tactile processing according to behavioral state. *Nat Neurosci*, 5, 517-523.
- Nishino, S., Reid, M., Dement, W, C., Mignot, E. (1994) Neuropharmacology and neurochemistry of canine narcolepsy. *Sleep*, 17, S84-S92.
- Nishino, S., Mignot, E. (1997) Pharmacological aspects of human and canine narcolepsy. *Prog Neurobiol*, 52, 27-78.
- Nishino, S., Ripley, B., Overeem, S., Lammers, G.J., Mignot, E. (2000) Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *Lancet*, 355, 39-40.
- Núñez, A., De Andrés, I., García-Austt, E. (1991) Relationships of nucleus reticularis pontis oralis neuronal discharge with sensory and carbachol evoked hippocampal theta rhythm. *Exp Brain Res*, 87, 303-308.
- Ohayon, M.M., Priest, R.G., Zulley, J., Smirne, S., Paiva, T. (2002) Prevalence of narcolepsy symptomatology and diagnosis in the european general population. *Neurology*, 58, 826-833.
- Paré, D., Dossi, R.C., Datta, S., Steriade, M. (1990) Brainstem genesis of reserpine-induced ponto-geniculo-occipital waves. An electrophysiological and morphological investigation. *Exptl Brain Res*, 81, 533-544.
- Parkes, D. (1985) Sleep and its disorders. Philadelphia: Saunders WB
- Parkes, J.D. (1998) Genetic factors in human sleep disorders with special reference to Norrie disease, Prader-Willi syndrome and Moebius syndrome. *J Sleep Res*, 8, 14-22.
- Pawson. T. (1993) Signal transduction: a conserved pathway from the membrane to the nucleus. *Developmental genetics*, 14, 333-338.
- Peyron, C., Faraco, J., Rogers, W., Ripley, B., Overeem, S., Charnay, Y., Nevsimalova, S., Aldrich, M., Reynolds, D., Albin, R., Li, R., Hungs, M., Pedrazzoli, M., Padigaru, M., Kucherlapati, M., Fan, J., Maki, R., Lammers, G.J., Bouras, C., Kucherlapati, R., Nishino, S.,

Mignot, E. (2000) A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat Med*, 6, 991-997.

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

Polleux, F., Ince-Dunn, G., Ghosh, A. (2007) Transcriptional regulation of vertebrate axon guidance and synapse formation. *Nat Rev Neurosci*, 8, 331-340.

Ptashne, M., Gann, A. (1997) Transcriptional activation by recruitment. *Nature*, 386, 569-577.

Radulovacki, M., Virus, R.M., Djuricic-Nedelson, M., Green, R.D. (1984) Adenosine analogs and sleep in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 228, 268-274.

Ralph, M.R., Foster, R.G., Davis, F.C., Menaker, M. (1990) Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*, 247, 975-978.

Rechtschaffen, A., Dement, W. (1967) Studies on the relation of narcolepsy, cataplexy and sleep with low voltage random EEG activity. pp 488-505. In: Kety S, Evarts E, Williams H (Eds.). *Sleep and Altered States of Consciousness*. Baltimore, Williams and Wilkins.

Reinoso-Suárez, F. (1960) Modifications of the potential evoked by acoustic stimuli by means of diathermo-coagulation in the diencephalon. *J Comp Neurol*, 114, 207-215.

Reinoso-Suárez, F., de Andrés, I., Rodrigo-Angulo, M.L., Garzón, M. (2001) Brain structures and mechanisms involved in the generation of rem sleep. *Sleep Med Rev*, 5, 63-78.

Reppert, S.M., Weaver, D.R. (2001) Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol*, 63, 647-676.

Rodrigo-Angulo, M.L., Rodríguez-Veiga, E., Reinoso-Suárez, F. (2000) Serotonergic connections to the ventral oral pontine tegmentum. Implication in paradoxical sleep modulation. *J Comp Neurol*, 418, 93-105.

Rose, N.R. (1998) The role of infection in the pathogenesis of autoimmune disease. *Semin Immunol*, 10, 5-13.

Rosenfeld, M.R., Eichen, J.G., Wade, D.F., Posner, J.B., Dalmau, J. (2001) Molecular and clinical diversity in paraneoplastic immunity to Ma proteins. *Ann Neurol*, 50, 339-348.

Sakai, K. (1985) Anatomical and physiological basis of paradoxical sleep. In: *Brain mechanisms of sleep* (McGinty, D.J., Drucker-Colin, R., Morrison, A., Parmegiani, P.) Raven Press, 111-137.

Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R.M., Tanaka, H., Williams, S.C., Richardson, J.A., Kozlowski, G.P., Wilson, S., Arch, J.R., Buckingham, R.E., Haynes, A.C., Carr, S.A., Annan, R.S., McNulty, D.E., Liu, W.S., Terrett, J.A., Elshourbagy, N.A.,

Bergsma, D.J., Yanagisawa, M. (1998) Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, 92, 573-585.

Saper, C.B., Chou, T.C., Scammell, T.E. (2001) The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness. *Trends Neurosci*, 24, 726-731.

Scammell, T.E., Willie, J.T., Guilleminault, C., Siegel, J.M. (2009) A consensus definition of cataplexy in mouse models of narcolepsy. *Sleep*, 32, 111-116

Sherin, J.E., Shiromani, P.J., McCarley, R.W., Saper, C.B. (1996) Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. *Science*, 271, 216-219.

Shiromani, P.J., Kilduff, T.S., Bloom, F.E., McCarley, R.W. (1992) Cholinergically induced REM sleep triggers Fos-like immunoreactivity in dorsolateral pontine regions associated with REM sleep. *Brain Res*, 580, 351-357.

Siegel, J. M., Nienhuis, R., Fahringer, H. M., Chiu, C., Dement, W. C., Mignot, E., Lufkin, R. (1992) Activity of medial mesopontine units during cataplexy and sleepwalking states in the narcoleptic dog. *J Neurosci*, 13, 1640-1646.

Siegel, J.M., Nienhuis, R., Gulyani, S., Ouyang, S., Wu, M.F., Mignot, E., Switzer, R.C., McMurry, G., Cornford, M. (1999) Neuronal degeneration in canine narcolepsy. *J Neurosci*, 19, 248-257.

Sillito, A.M., Jones, H.E., Gerstein, G.L., West, D.C. (1994) Feature-linked synchronization of thalamic relay cell firing induced by feedback from the visual cortex. *Nature*, 369, 479-482.

Steriade, M., Curró-Dossi, R., Núñez ,A. (1991) Network modulation of a slow intrinsic oscillation of cat thalamocortical neurons implicated in sleep delta waves: Cortically induced synchronization and brainstem cholinergic suppression. *J Neurosci*, 11, 3200-3217.

Steriade, M., Domigh, L., Oakson, G., Deschenes, M. (1987) The deafferented reticular thalamic nucleus generates spindle rhythmicity. *J Neurophysiol*, 57, 260-273.

Sterman, M.B., Clemente, C.D. (1962) Forebrain inhibitory mechanisms: cortical synchronization induced by basal forebrain stimulation in the behaving cat. *Expl Neurol*, 6, 91-102.

Sutcliffe, J.G., De Lecea, L. (2002) The hypocretins: setting the arousal threshold. *Nat Neurosci*, 3, 339-349.

Taheri, S., Sunter, D., Dakin, C., Moyes, S., Seal, L., Gardiner, J., Rossi, M., Ghatei, M., Bloom, S. (2000) Diurnal variation in orexin A immunoreactivity and prepro-orexin mRNA in the rat central nervous system. *Neurosci Lett*, 279, 109-112.

Thannickal, T.C. (2009) A decade of hypocretin/orexin: accomplishments in sleep medicine. *Sleep Med Rev.*, 13, 5-8.

Thannickal, T.C., Moore, R.Y., Nienhuis, R., Ramanathan, L., Gulyani, S., Aldrich, M., Cornford, M., Siegel, J.M. (2000) Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron*, 27, 469-74.

Thannickal, T.C., Moore, R.Y., Nienhuis, R., Ramanathan, L., Gulyani, S., Aldrich, M., Cornford, M., Siegel, J.M. (2000) Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron*, 27, 469-474.

Tian, L., Rauvala, H., Gahmberg, C.G. (2009) Neuronal regulation of immune responses in the central nervous system. *Trends Immunol*, 30, 91–99

Trivedi, P., Yu, H., MacNeil, D.J., Van der Ploeg, L.H., Guan, X.M. (1999) Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Lett*, 438, 71-75.

Tsujino, N., Sakurai, T. (2009) Orexin/hypocretin: a neuropeptide at the interface of sleep, energy homeostasis, and reward system. *Pharmacol Rev*, 61, 162-176.

van den Pol, A.N., Gao, X.B., Obrietan, K., Kilduff, T.S., Belousov, A.B. (1998) Presynaptic and postsynaptic actions and modulation of neuroendocrine neurons by new hypothalamic peptide, hypocretin/orexin. *J Neurosci*, 18:7962-7971.

Vankova, J., Stepanova, I., Jech, R., Elleder, M., Ling, L., Mignot, E., Nishino, S., Nevsimalova, S. (2003) Sleep disturbances and hypocretin deficiency in Niemann-Pick disease type C. *Sleep*, 26, 427-430.

Vanni-Mercier, G., Sakai, K., Lin, J.S., Jouvet, M. (1989) Mapping of cholinceptive brainstem structures responsible for the generation of paradoxical sleep in the cat. *Arch Ital Biol*, 127, 133-164.

Vertes, R.P. (1981) An analysis of ascending brain stem systems involved in hippocampal synchronization and desynchronization. *J Neurophysiol*, 46, 1140-1159.

Vogel G. (1960) Studies in psychophysiology of dreams III. The dream of narcolepsy. *Arch Gen Psychiatry*, 3, 421-428.

von Economo, C. (1918) Die encephalitis lethargica. Wien: Deuticke.

Wang, H.L., Morales, M. (2009) Pedunculo-pontine and laterodorsal tegmental nuclei contain distinct populations of cholinergic, glutamatergic and GABAergic neurons in the rat. *Eur J Neurosci*, 29, 340-358.

Wang, M.M., Tsai, R.Y., Schrader, K.A., Reed, R.R. (1993) Genes encoding components of the olfactory signal transduction cascade contain a DNA binding site that may direct neuronal expression. *Mol Cell Biol.*, 13, 5805-5813.

Wang, S.S., Lewcock, J.W., Feinstein, P., Mombaerts, P., Reed, R.R. (2004) Genetic disruptions of O/E2 and O/E3 genes reveal involvement in olfactory receptor neuron projection. *Development*, 131, 1377-1388.

Wang, J.C. (2005). Finding primary targets of transcriptional regulators. *Cell Cycle*, 4, 356–358.

Wang, S.S., Tsai, R.Y., Reed, R.R. (1997) The characterization of the Olf-1/EBF-like HLH transcription factor family: implications in olfactory gene regulation and neuronal development. *J Neurosci.*, 17, 4149-4158.

Westphal, C. (1877) Eigenthümliche mit Einschlafen verbundene Anfälle. *Arch. Psychiat*, 7, 631-635.

Williams, R.W., Rakic, P. (1988) Three-dimensional counting: an accurate and direct method to estimate numbers of cells in sectioned material. *J Comp Neurol*, 278, 344-352.

Willie, J.T., Chemelli, R.M., Sinton, C.M., Tokita, S., Williams, S.C., Kisanuki, Y.Y., Marcus, J.N., Lee, C., Elmquist, J.K., Kohlmeier, K.A., Leonard, C.S., Richardson, J.A., Hammer, R.E., Yanagisawa, M. (2003) Distinct narcolepsy syndromes in Orexin receptor-2 and Orexin null mice: molecular genetic dissection of Non-REM and REM sleep regulatory processes. *Neuron*, 38, 715-730.

Yamamoto, K., Mamelak, A.N., Quattrochi, J.J., Hobson, J.A. (1990) A cholinceptive desynchronized sleep induction zone in the anterodorsal pontine tegmentum: spontaneous and drug-induced neuronal activity. *Neuroscience*, 39, 295-304.

Yoshida, Y., Fujiki, N., Nakajima, T., Ripley, B., Matsumura, H., Yoneda, H., Mignot, E., Nishino, S. (2001) Fluctuation of extracellular hypocretin-1 (orexin A) levels in the rat in relation to the light-dark cycle and sleep-wake activities. *Eur J Neurosci*, 14, 1075-1081.

Yoss, R. E., Daly, D. D. (1957) Criteria for the diagnosis of the narcoleptic syndrome. *Prac Staffl Mlg Mayo*, 32, 320-328.